

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Milica S. Potrebić

**Uticaj socijalne izolacije na emocionalne
reakcije, psihomotornu aktivnost i
antioksidativni status perifernih organa
peripubertetskih pacova**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Milica S. Potrebić

**The influence of social isolation on emotional
reactions, psychomotor activity, and
antioxidative status of peripheral organs in
peripubertal rats**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

MENTOR

dr Vesna Pešić, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Jelena Đorđević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Sanja Dacić, docent

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Anđela Šoškić, docent

Univerzitet u Beogradu, Fakultet za obrazovanje učitelja i vaspitača

dr Teodora Vidonja Uzelac, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Željko Pavković, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerziteta u Beogradu, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, u okviru projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije” (broj 173056) i projekata 451-03-68/2020-14/200007, 451-03-9/2021-14/200007, 451-03-68/2022-14/200007, 451-03-47/2023-01/200007 i 451-03-66/2024-03/200007 finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, odnosno Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije.

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem svojoj Mentorki **dr Vesni Pešić** na strpljenju, trudu i posvećenosti pri svakom koraku koji je prethodio odbrani ove disertacije. Hvala na timskom radu i nesebičnom prenošenju znanja, koji su mi bili glavna pokretačka snaga da ovaj poduhvat sprovedem do kraja.

Posebnu zahvalnost dugujem **dr Selmi Kanazir** koja je verovala u mene i kada ja nisam, prihvatila me u svoju grupu i pružila mi priliku da unutar nje opravdam, koliko mogu, svoje mesto.

Dr Željku Pavkoviću hvala na svakoj pomoći, a pre svega prijateljskoj naklonosti i podršci, bez kojih bi ova teza bila mnogo teži poduhvat.

Profesorkama i članovima komisije **dr Jeleni Đorđević, dr Sanji Dacić, dr Anđeli Šoškić i dr Teodori Vidonja Uzelac** se zahvaljujem na uloženom trudu, vremenu i svim korisnim savetima u završnim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Koleginicama iz Laboratorije za neurobiologiju i ponašanje **Aleksandri, Desi i Milki** dugujem veliku zahvalnost na svakoj sugestiji i nesebično pruženoj pomoći, kada god mi je trebala. Posebno hvala mojim dragim koleginicama i kolegama: **Smilji, Jeci, Srkiju, Maji, Valentini, Nikoli, Ireni, Milencetu, Olgji, Anđi i mom Miciju**, koji su uvek bili tu za mene i bez kojih bi ova teza bila nemoguća misija.

Posebno hvala **dr Verici Milošević** na poverenju koje mi je pružila i svim životnim lekcijama kojima me je naučila. Zahvalnost dugujem i ostalim kolegama sa **Odeljenja za Citologiju**, a posebno **dr Marku Mileru, dr Vladimiru Ajdžanoviću i dr Jasmini Živanović** na vedrini i znanju koje su sa mnom nesebično podelili u mom naučnom početku.

Dr Ivani Jarić hvala na jednoj poruci i čokoladi, koje su zauvek promenile moj naučni put.

Profesorki dr Neli Puškaš hvala na gostoprimstvu koje mi je ukazala tokom gostovanja u njenoj laboratoriji i pomoći oko izvođenja eksperimentalnog dela teze.

Dr Dušku Blagojeviću, dr Aleksandri Nikolić-Kokić i dr Zorani Oreščanin-Dušić sa **Odeljenja za fiziologiju** zahvaljujem na velikoj pomoći pri izradi i tumečenju rezultata tokom izrade dela disertacije.

Na kraju, želim da se zahvalim svojoj porodici: **mami, tati, Milanu, Kati, Izi, Iki, Veljku i Tanji**, kao i najboljim prijateljima **Jovi, Ici, Nati, Aleksiću i Luku** na beskrajnom strpljenju, utesi i podršci kada mi je najviše trebala (a trebala mi je mnogo) i bez kojih ništa od ovoga ne bi imalo smisla. Posebno hvala mom **Fići**, na podršci koju mi je pružio tokom čitavog mog školovanja, što je uvek verovao u mene i motivisao me da izguram ovaj težak podvig do kraja.

Posvećeno mom Duci,

Nadam se da negde, nekako, znaš da sam ipak uspela.

Uticaj socijalne izolacije na emocionalne reakcije, psihomotornu aktivnost i antioksidativni status perifernih organa peripubertetskih pacova

Sažetak

Tokom evolucije socijalnih vrsta formiranje grupa je bilo snažno favorizovano od strane prirodne selekcije, što je za rezultat imalo favorizovanje unutrašnjih mehanizama koji upućuju individuu na socijalnu grupu, ali isto tako dovode do emotivnog distresa u odsustvu socijalnog kontakta. Adolescentne jedinke socijalnih sisara provode više vremena u socijalnoj komunikaciji sa svojim vršnjacima nego u bilo kom drugom životnom periodu. Sumnja se da je redukcija direktnih društvenih kontakata sa vršnjacima tokom adolescencije faktor rizika za simptome depresije, ali pouzdane rane ponašajne manifestacije još uvek nedostaju. Ova teza je realizovana sa ciljem da doprinese razumevanju značaja socijalne pripadnosti vršnjačkoj grupi tokom perioda adolescencije, kroz detaljno ispitivanje ponašajnog, fiziološkog i biohemijskog odgovora na odsustvo direktnih socijalnih kontakata (model socijalne izolacije) kod peripubertetskih mužjaka pacova kao model-sistema. Dobijeni rezultati naglašavaju da je ishod odsustva direktnog društvenog kontakata sa vršnjacima tokom peripuberteta dinamičan, sa klasterom atipičnih ranih simptoma koji tokom vremena evoluiraju u sindrom koji se teško detektuje rutinskim merenjem i analizom ponašanja i biomarkera stresa, a koji u velikoj meri odgovara simptomima atipične depresije. Studija je ukazala na prioritet društvenih potreba, odnosno da je za postojanje motivisanog ponašanja ka socijalnoj novini neophodno da su prethodno zadovoljene potrebe pripadnosti, što je od izuzetne važnosti za bolje razumevanje osnovnih bioloških principa socijalne kognicije kod socijalnih sisara. Isticanje specifičnosti dobijenih rezultata u kontekstu starosti eksperimentalnih jedinki od velikog je značaja za produblivanje vrednosti animalnih modela u biološkoj psihijatriji.

Ključne reči: adolescencija, socijalne potrebe, motivacija, anhedonija, depresija, anksioznost, antioksidativni enzimi, prefrontalni deo kore velikog mozga, dopamin, biomarkeri socijalnog stresa

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Neurobiologija, Animalna i humana fiziologija

The influence of social isolation on emotional reactions, psychomotor activity, and antioxidative status of peripheral organs in peripubertal rats

Abstract

Throughout the evolution of social species, natural selection strongly favored the formation of groups, leading to the development of internal mechanisms guiding individuals towards social connections. However, this inclination also brought emotional distress when social contact was lacking. Adolescent individuals of social mammals spend more time in social communication with their peers than in any other period of life. It is believed that a reduction in direct social interactions during adolescence could contribute to depressive symptoms, although clear early behavioral manifestations remain elusive. This study aimed to enhance our understanding of the importance of adolescent peer group belonging by examining the behavioral, physiological, and biochemical responses of peripubertal male rats to the absence of direct social contacts with peers (model of social isolation). The results highlighted the dynamic outcome of the absence of direct social contact with peers during peripuberty, with the cluster of atypical early symptoms that evolve into the syndrome challenging to identify through regular behavioral observation and stress biomarker analysis, and that largely resemble the symptoms of atypical depression. The study emphasized the priority of social needs, that is, that satisfied needs for familiarity are a prerequisite for motivated behavior towards social novelty, which is of extreme importance for a better understanding of the basic biological principles of social cognition in social mammals. Emphasizing the specificity of the obtained results in the context of the age of experimental animals is essential for enhancing the relevance of animal models in biological psychiatry.

Key words: adolescence, social needs, motivation, anhedonia, depression, anxiety, antioxidative enzymes, prefrontal cortex, dopamine, social stress biomarkers

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Neurobiology, Animal and human physiology

Lista skraćenica

5HT - serotonin

5HT3aR - serotoniniski receptor 3a

AM - amigdala

ASD - spektar autističnih poremećaja (engl. *autism spectrum disorders*)

BM - prazna plastična kutijica bez socijalnog mirisa

BOM - model orijentacije pripadnosti (engl. *belongingness orientation model*)

BSA - goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)

CA - Amonov rog (lat. *cornū Ammōnis*)

CNS - centralni nervni sistem

DAT - dopaminski transporter

D-AMPH - dekstroamfetamin

DG - dentatni girus (lat. *Gyrus dentatus*)

DI - diskriminacioni indeks

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

E/I balans - balans ekscitatorne (E) i inhibitorne (I) neurotransmisije

GABA - gama aminobuterna kiselina

GR - glutation reduktaza

GSH - glutation

GSH-Px - glutation peroksidaza

GSSG - oksidovani glutation

H₂O₂ - vodonik peroksid

Hb - hemoglobin

HLD - lipoproteini visoke gustine

HPA osovina - hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osovina (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*)

Iba-1 - jonizovani kalcijum-vezujući adapter molekula-1

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina

KAT - katalaza

LDL-C - lipoproteini male gustine

M1 - plastična kutijica napunjena šuškom kao izvor socijalnog mirisa 1

M2 - plastična kutijica napunjena šuškom kao izvor socijalnog mirisa 2

mPFC - medijalna prefrontalna kora (engl. *medial prefrontal cortex*)

N1 - nova jedinka 1

N2 - nova jedinka 2

NAc - lat. *nucleus accumbens*

O - prazan kavez/objekat

OFC - orbitofrontalna kora (engl. *orbitofrontal cortex*)

P - postnatalni dan

PBS - fosfatom puferisan fiziološki rastvor (engl. *Phosphate-buffered saline*)

PCP4 - Purkinjeov ćelijski protein 4

PFC - prefrontalna kora (engl. *prefrontal cortex*)

PV - parvalbumin

PV⁺ - parvalbumin pozitivni interneuroni

PVI - parvalbuminski interneuroni

ROS - reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*)

SDS - natrijum dodecil sulfat

SDS-PAGE - (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEM - standardna greška merenja (engl. *standard error of measurement*)

SOD - superoksid dismutaza

SOM - somatostatin

TBS - Tris-puferisani fiziološki rastvor (engl. *Tris-buffered saline*)

TEMED - tetrametil-etilen-diamin

ToM - teorija uma (engl. *Theory of Mind*)

vSTR - ventralni stijatam

zif26/egr1 - (engl. *zinc finger binding protein clone 268/early growth response gene 1*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Potreba za pripadanjem	1
1.2. Model orijentacije pripadnosti.....	1
1.3. Socijalna memorija i motivacija.....	2
1.4. Uloga hipokampusa i parvalbuminskih interneurona u socijalnom ponašanju i formiranju socijalne memorije.....	3
1.5. Mapiranje socijalnog prostora u fizičkom prostoru.....	4
1.6. Socijalna igra - značaj direktnog socijalnog kontakta.....	4
1.7. Adolescencija.....	5
1.7.1. Opšte karakteristike adolescentnog perioda	5
1.7.2. Specifični oblici ponašanja karakteristični za adolescenciju.....	6
1.7.3. Razvoj nervnog sistema tokom adolescencije	7
1.7.4. Maturacija sistema odgovornih za racionalno odlučivanje i nagrađivanje (engl. rewarding system).....	7
1.7.5. Uticaj socijalnog okruženja na aktivnost sistema odgovornih za racionalno odlučivanje i nagrađivanje	8
1.8. Socijalna izolacija - model za socijalni stres i depresiju u adolescenciji	9
1.9. Anhedonija kao višedelni konstrukt i njena uloga u depresivnim poremećajima	10
1.10. Test akutnog izlaganja D-amfetaminu u prepoznavanju atipične depresije.....	11
1.11. Motorna aktivnost izazvana primenom D-amfetamina kod glodara kao indikator nagrađujućeg efekta tretmana - uloga neuronske aktivnosti prefrontalne kore i strijatuma	12
1.11.1. Značaj blagovremenog prepoznavanja anhedonije kao simptoma adolescentne depresije	13
1.12. Neuroinflamacija kao posledica socijalnog stresa u adolescenciji.....	14
1.12.1. Mikroglia kao važan medijator neuroinflamacije	14
1.12.2. Neuroinflamacija, mikroglia i mentalna oboljenja/psihopatologije	15
1.13. Sistemski efekti socijalnog stresa	16
1.13.1. Aktivnost antioksidativnih enzima	16
1.13.1.1. Superoksid dismutaza	16
1.13.1.2. Glutation peroksidaza i glutacion reduktaza	17
1.13.1.3. Katalaza	17
1.13.2. Uloga antioksidativnih enzima u jetri, bubrezima, srcu i testisima.....	19
1.13.3. Biomarkeri depresije i depresiji-sličnih stanja	19

1.14. Uticaj socijalne izolacije na potomstvo - transgeneracijski efekat.....	21
1.14.1. Rani motorni razvoj.....	21
2. CILJEVI.....	23
3. MATERIJAL I METODE.....	24
3.1. Etička izjava	24
3.2. Eksperimentalne životinje i podela okota na eksperimentalne grupe.....	24
3.3. Eksperimentalna procedura	25
3.4 Testovi za praćenje ponašanja eksperimentalnih životinja.....	28
3.4.1. Test otvorenog polja	28
3.4.2. Test novog objekta	29
3.4.3. Test uzdignutog krstastog (plus) lavirinta	30
3.4.4. Bazalna motorna aktivnost i motorni odgovor na D-amfetamin	31
3.4.5. Trokomorni test	32
3.4.6. Socijalni olfaktorni test.....	34
3.4.7. Test preference saharoznog rastvora	35
3.5. Izolacija moždanog tkiva, perifernih organa i krvi.....	36
3.5.1. Izolacija moždanog tkiva.....	36
3.5.2. Izolacija perifernih organa.....	36
3.5.3. Izolacija krvi.....	36
3.6. Izolacija proteina i Western blot analiza	37
3.6.1. Izolacija proteina i određivanje njihove koncentracije.....	37
3.6.2. Elektroforeza proteina na poliakrilamidnom gelu	37
3.6.3. Transfer proteina na poliviniliden fluoridnu membranu	38
3.6.4. Detekcija proteina pomoću specifičnih primarnih i sekundarnih antitela	38
3.6.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova	38
3.7. Priprema preseka za histološku analizu.....	38
3.7.1. Imunofluorescentno bojenje i kvantitativna imunohistohemijska analiza	39
3.7.1.1. Bojenje parvalbumin pozitivnih interneurona u dorzalnem hipokampusu	39
3.7.1.2. Kvantitativna analiza parvalbumin pozitivnih ćelija u dorzalnem hipokampusu	39
3.7.1.3. Bojenje mikrogljijskih ćelija u dentatnom girusu.....	39
3.7.1.4. Kvantitativna analiza mikrogljijskih ćelija u dentatnom girusu	40
3.8. Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima u perifernim tkivima i krvi	41
3.8.1. Određivanje koncentracije heoglobina u krvi i uklanjanje hemoglobina iz lizata	41
3.8.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima.....	41

3.8.3. Određivanje ukupne superoksid dismutaze	41
3.8.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza 1 i 2	42
3.8.5. Određivanje aktivnosti katalaze.....	42
3.8.6. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze	43
3.8.7. Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze	43
3.9. Statistička obrada podataka	44
4. REZULTATI.....	46
4.1. Promene u psihomotornom i emocionalnom odgovoru na novinu kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije	47
4.2. Psihomotorni i neuronski odgovor na dekstroamfetamin kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije	50
4.3. Konzumatorna hipohedonija i konzumiranje hrane kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije	53
4.4. Socijalno ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije - preferenca socijalnog u odnosu na nesocijalni kontekst u Trokomornom testu.....	57
4.4.1. Broj ulaza i vreme provedeno u odeljku sa novom jedinkom u odnosu na odeljak sa objektom (socijalna orijentacija - preferenca socijalnog prostora).....	57
4.4.2. Broj direktnih prilaza, kao i vreme provedeno u direktnom kontaktu sa novom jedinkom u odnosu na objekat (socijabilnost)	59
4.5. Socijalno ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije - preferenca socijalne novine u trokomornom testu	61
4.5.1. Broj ulaza i vreme provedeno u odeljku sa novom jedinkom u odnosu na odeljak sa poznatom jedinkom (orijentacija ka socijalnoj novini)	61
4.5.2. Broj direktnih prilaza i vreme provedeno u direktnom kontaktu sa novom u odnosu na staru jedinku (preferenca za socijalnom novinom)	62
4.6. Ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije u socijalnom olfaktornom testu - faza preference socijalnog mirisa.....	65
4.7. Ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije u socijalnom olfaktornom testu - faza preference novog socijalnog mirisa..	67
4.8. Broj parvalbumim (PV) imunoreaktivnih neurona u dorzalnog hipokampusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije	69

4.9. Aktivacioni fenotip mikrogljijskih ćelija u dentatnom girusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije.....	77
4.10. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u perifernim organima i eritrocitima, kao i biohemijski parametri iz krvi i promene u telesnoj masi peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji i dodatno izlaganih prekonocnom gladovanju	80
4.10.1. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u perifernim organima i eritrocitima	80
4.10.1.1. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u jetri.....	80
4.10.1.2. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u bubregu	82
4.10.1.3. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u testisima.....	84
4.10.1.4. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u srcu	87
4.10.1.5. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u eritrocitima	88
4.10.2. Biohemijski parametri iz krvi i promene u telesnoj masi.....	92
4.11. Koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona u krvi peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji.....	95
4.12. Karakteristike majki gajenih u grupi ili izolaciji tokom peripuberteta i njihovog potomstva.....	98
4.12.1. Reproduktivne karakteristike i telesna masa ženki.....	98
4.12.2. Telesna masa potomstva oba pola	99
4.12.3. Otvaranje očiju i rani motorni odgovor potomstva na nepoznatu arenu	100
4.12.4. Karakteristike muških potomaka SI i GG roditelja socijalno izolovanih tokom peripuberteta	100
5. DISKUSIJA.....	107
5.1. Uticaj socijalne izolacije na emocionalnu reaktivnost jedinki u odgovoru na novu sredinu sa različitim anksiozenim potencijalom.....	107
5.2. Uticaj socijalne izolacije na dekstroamfetaminom-indukovani psihomotorni odgovor i aktivaciju neurona strijatuma i prefrontalne zone kore velikog mozga.....	110
5.3. Konzumatorna hipohedonija i motivisani unos hrane u testu preference saharoznog rastvora.....	111
5.4. Uticaj socijalne izolacije na socijalno ponašanje: odgovor na prisustvo živih jedinki i socijalnih mirisa.....	112
5.4.1. Socijalni odgovor na prisustvo živih jedinki - socijalna orijentacija i socijabilnost	113
5.4.2. Socijalni odgovor na prisustvo živih jedinki - preferenca socijalne novine kao indikator socijalne memorije	114
5.4.3. Socijalni odgovor na prisustvo socijalnih mirisa.....	116
5.5. Uticaj socijalne izolacije na broj parvalbumin-pozitivnih interneurona i aktivacioni fenotip mikrogljijskih ćelija hipokampusa.....	116

5.5.1. Uticaj socijalne izolacije na broj parvalbumin-pozitivnih interneurona u hipokampusu	117
5.5.2. Uticaj socijalne izolacije na aktivacioni fenotip mikroglijskih ćelija dentatnog girusa.....	118
5.6. Uticaj društvenog okruženja i prekonoćnog gladovanja na antioksidativni status perifernih organa, biohemijskih parametara krvi i telesnu masu peripubertetskih mužjaka pacova.....	119
5.6.1. Uticaj društvenog okruženja na antioksidativni status perifernih organa peripubertetskih pacova	119
5.6.1.1. Efekat socijalnog okruženja na aktivnosti enzima antioksidativne zaštite - eritrociti i srce.....	119
5.6.1.2. Efekat socijalnog okruženja na aktivnost enzima antioksidativne zaštite - metabolički organi i testisi.....	120
5.6.1.3. Modulatoreni uticaj socijalne sredine na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u uslovima izlaganja dodatnom stresoru.....	122
5.6.2. Biohemijski parametri iz krvi i promene u telesnoj masi.....	122
5.7. Koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona u krvi peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji.....	124
5.8. Uticaj socijalne izolacije na psihofizičke karakteristike potomstva roditelja socijalno izolovanih tokom peripuberteta	125
5.9. Ograničenja studije i preporuke za buduća istraživanja	126
6. ZAKLJUČCI.....	128
LITERATURA	129

1. UVOD

„Ni jedna osoba nije ostrvo.” - Džon Don (1975)

1.1. Potreba za pripadanjem

Formiranje grupa i organizovanih, složenih socijalnih zajednica bilo je snažno favorizovano tokom evolucije socijalnih vrsta (Baumeister, Leary, 1995). Članovi grupe mogu deliti rad, resurse i informacije, povećavajući time šansu za savladavanje različitih stresora iz okolne sredine (Hogan i sar., 1985), pri čemu se socijalna kohezija značajno povećava u prisustvu nepovoljnih sredinskih uslova. Čini se vrlo mogućim da je *potreba za pripadanjem deo biološkog nasleđa socijalnih vrsta*, a ovako urođena težnja mogla bi biti od značaja za evolutivnu selekciju, jer želja za formiranjem i održavanjem socijalnih veza ima benefite i za reprodukciju i za preživljavanje (Bowlby, 1982; Moreland, 1987; Ainsworth, 1989). Rezultat ovakve evolutivne selekcije bio bi favorizovanje unutrašnjih mehanizama koji upućuju individuu na socijalnu grupu i orijentišu je ka drugim članovima društva, ali isto tako i doprinose izražavanju emotivnog distresa u odsustvu socijalnog kontakta (Baumeister, Leary, 1995).

Pored reproduktivnog i parentalnog ponašanja, istraživačkog i ponašanja vezanih za ishranu, ponašajni sistem na kome se zasniva *afektivna vezanost* (engl. *attachment theory*, Bowlby, 1982) opisan je kao fundamentalan kod mnogih životinjskih vrsta, iako sam po sebi nije izveden iz navedenih oblika ponašanja (Ainsworth, 1989). On je zasnovan na neurofiziološkim procesima koji podležu razvojnim promenama i pod uticajem su kako genetičkih, tako i sredinskih faktora (Ainsworth, 1989).

Tokom najranijih faza detinjstva ponašajni sistem koji je u osnovi afektivne vezanosti prvenstveno se manifestuje kroz aktivnosti značajne za zaštitu i preživljavanje, kao što je plakanje bebe radi posezanja da bude uzeta kada je uplašena ili nepodmirena - uznemirena, gladna, mokra. Međutim, kako sa razvojem dete postaje svesno socijalnog okruženja i socijalnih odnosa, ponašanje koje manifestuje afektivnu vezanost postaje značajno fleksibilnije i osetljivije na različite kontekste (Mikulincer, Shaver, 2010). Dete koje je naučilo da očekuje adekvatnu reakciju *objekata vezanosti* (roditelja ili staratelja) nesputano eksplicira svoje emocije, koherentno i jasno ispoljava svoje potrebe i osećanja i kroz ovakav obrazac ponašanja ostvaruje veće šanse za zadovoljenjem svojih potreba kroz socijalne odnose u kasnijim fazama života (Mikulincer, Shaver, 2010).

Emotivna veza koja se formira kod deteta u ranom detinjstvu, a koja je bazirana na tome kako socijalna sredina odgovara na potrebe deteta, značajno utiče na to kako će kasnije adolescent emotivno sazreti i razviti svoj odnos sa svojim vršnjacima (Oldfield i sar., 2016). Ustanovljeno je da su adolescenti sa snažnim, stabilnim vezama, kako sa roditeljima, tako i sa vršnjacima prilagodljiviji i da retko ispoljavaju depresiju ili agresivno ponašanje, jer u adolescenciji *vršnjaci imaju značajnu ulogu kao objekti vezanosti* (Furman, Buhrmester, 1992). Povećano oslanjanje na vršnjačku emotivnu podršku u adolescenciji i afektivna vezanost sa vršnjacima su rezultat kognitivnog razvoja koji podrazumeva osamostaljivanje i traganje za pouzdanim osobama koje imaju slične interese i koje takođe i same, još istražuju sebe, što rezultuje formiranjem socijalnog identiteta (Laible i sar., 2000).

1.2. Model orijentacije pripadnosti

Prema modelu orijentacije pripadnosti (engl. *belongingness orientation model - BOM*, Lavigne i sar., 2011) pored jasne razlike u jačini potrebe za pripadnošću, važna je i njena kvalitativna karakteristika koja se prepoznaje kroz dva tipa orijentacije: orijentacije rasta (engl. *growth orientation*) i orijentacije smanjenja deficita (engl. *deficit-reduction orientation*). Orijetacija rasta

podrazumeva da osoba ima potrebu za interakcijom sa drugima usled njenog istinskog interesovanja za druge, predanosti i uspostavljanja iskrenih odnosa bez straha od negativnih osuda. Sa druge strane, orijentacija smanjenja deficita ukazuje na postojanje socijalnog deficita, koji, osobe sa ovim tipom orijentacije, stalno nastoje da umanje. Usled toga, u ovom tipu orijentacije težnja za bliskošću sa drugima je rezultat stalnog pokušaja upotpunjavanja lične socijalne praznine, gde osoba pokazuje konstantnu težnju da bude socijalno prihvaćena.

Tvorci ove hipoteze (Lavigne i sar., 2011) smatraju da svaka osoba poseduje, u određenom domenu, obe orijentacije i da će socijalna iskustva diktirati kako će se potreba za pripadnošću realizovati i u koji oblik orijentacije će se razviti. Prethodna socijalna iskustva, prevashodno iskustva iz detinjstva, imaju potencijal da oblikuju individualnu sposobnost za zadovoljavanjem fundamentalnih psiholoških potreba uključujući potrebu za pripadanjem. Osobe lišene poverenja, ljubavi i pažnje koje nisu imale zadovoljenu potrebu za pripadanjem imaju stalnu težnju za zadovoljavanjem iste, što povećava potrebu za bliskošću sa drugima i nosi rizik za formiranje orijentacije smanjenja deficita. Takođe, nedostatak socijalnih kontakata tokom adolescencije može dovesti i do *socijalnog povlačenja* (stidljivosti, nesocijalnosti i/ili socijalnog izbegavanja, Rubin i sar., 2009).

Međutim, jasne indikacije o tome kako razdoblje u kome se dešava specifično socijalno iskustvo utiče na kvalitativne karakteristike orijentacije pripadnosti još ne postoje, što je posledica kompleksnosti svakodnevnog života i poteškoća u metodološkom ujednačavanju sredinskih uslova za veliki broj ispitanika neophodnih da se adekvatno pokriju sve razvojne faze detinjstva i adolescencije (4-20 godina, Dubey i sar., 2017). Takođe, kriva socijalnosti tokom tipičnog razvoja nije jasno definisana, jer postoje kontradiktorni rezultati (Dubey i sar., 2017). Prema novim rezultatima dobijenim na deci i adolescentima (starosti 4-20 godina) sa tipičnim razvojem socijalnost ima oblik U-krive i najniža je u periodu rane adolescencije (Dubey i sar., 2017), što autori studije tumače specifičnom društvenom sklonošću adolescenata prema vršnjacima, a ne uopšteno prema socijalnom kontekstu i drugim uzrasnim kategorijama. Shodno tome, nedostatak motivišućeg vršnjačkog prisustva u periodu adolescencije mogao bi imati specifičan ishod.

1.3. Socijalna memorija i motivacija

Tokom sazrevanja u periodu adolescencije postiže se adultna socijalna kompetentnost, odnosno formiraju se znanja i veštine koje će obezbediti samostalno funkcionisanje adolescenata (Crone, Dahl, 2012). Za formiranje ovakvih socijalnih veština neophodan je *socijalno-kognitivni razvoj*, koji se odnosi na sposobnost razumevanja različitih socijalnih konteksta i *socijalno-afektivni razvoj* koji podrazumeva adekvatan motivacioni i emotivni odnos ka socijalnom kontekstu (Crone, Dahl, 2012). Socijalna motivacija se može okarakterisati kao set psihičkih osobina i bioloških mehanizama koji usmeravaju individuu: ka socijalnom svetu (socijalna orijentacija), ka potražnji i uživanju u socijalnim interakcijama (socijalnost), kao i održavanju socijalnih veza (socijalno održavanje) (Chevallier i sar., 2012). Kod socijalnog ponašanja se može razlikovati *apetitivna komponenta* - samoinicijativna podsticajna motivacija za socijalnim susretima, definisana kao traganje/želja za socijalnim interakcijama i *konzumatorna komponenta*, koja predstavlja socijalnu interakciju samu po sebi, gde je mera „sviđanja” interakcije izražena konzumatornim odgovorom, odnosno vremenom provedenim u direktnoj interakciji/kontaktu sa socijalnim sadržajem (Berridge i sar., 2009). O uticaju socijalne motivacije na razvoj socijalnih veština i socijalne kognicije se nedovoljno zna, a u sticanju novih znanja dosta zaključaka se izvodi na osnovu detaljne analize ponašanja osoba sa atipičnim socijalnim razvojem. Novija istraživanja ukazuju da zapravo motivacioni deficit može nepovoljno uticati na razvoj socijalne kognicije, jer ne dozvoljava uspostavljanje socijalnih veština i ometa socijalno-kognitivni razvoj (Chevallier i sar., 2012).

Sposobnost prepoznavanja poznate individue predstavlja osnov za uočavanje nove individue, ispoljavanje interesovanja ka socijalnoj novini i uspostavljanje novih socijalnih odnosa kod glodara (Ferguson i sar., 2002). Preferenca ka socijalnoj novini se u eksperimentalnom radu na animalnim modelima smatra indikatorom memorije prepoznavanja i bazira se na prirodnoj preferenci ka novom

iskustvu (Antunes, Biala, 2012), mada neki autori ovo pojednostavljeno tumačenje ponašanja dovode u pitanje i stavljaju akcenat na značaj povezanosti sa poznatim (Ennaceur, 2010). U tom smislu, odsustvo preference ka socijalnoj novini može da predstavlja jasan izbor, koji kao motiv ima zadovoljenje osnovnih socijalnih potreba za pripadanjem vršnjačkoj grupi, kao što je to slučaj u humanim studijama, kod osoba koje imaju atipični socijalni razvoj, ali očuvane kognitivne sposobnosti (Chen i sar., 2015).

Ove činjenice ukazuju da ne treba zanemariti socijalnu motivaciju ka poznatom, kao i činjenicu da njeno prisustvo u „nefiziološkom” opsegu može da ukaže na nezadovoljene osnovne potrebe za pripadanjem vršnjačkoj grupi, a ne na problem sa socijalnom memorijom.

1.4. Uloga hipokampusa i parvalbuminskih interneurona u socijalnom ponašanju i formiranju socijalne memorije

Socijalna memorija čini osnovu interakcije između socijalnih jedinki. Da je hipokampus značajan za formiranje socijalne memorije ukazali su eksperimenti sprovedeni na glodarima sa lezijama hipokampusa, jer ovakve životinje nisu imale sposobnost socijalnog prepoznavanja, to jest razlikovanja već poznate i nove jedinke (Maaswinkel i sar., 1996; Kogan i sar., 2000). Iako su ove studije jasno ukazale da dugotrajna socijalna memorija zavisi od hipokampusa, tačna priroda oštećenja socijalnog pamćenja nije bila ustanovljena, ali je pretpostavljano da je u pitanju narušena integracija složenih stimulusa za koje je hipokampus odgovoran (Kogan i sar., 2000).

Hipokampus sisara se sastoji iz dentatnog girusa (lat. *Gyrus dentatus*) i regiona označenih kao Amonov rog (lat. *cornū Ammōnis*, CA) 1, CA2, CA3 (Hainmueller, Bartos, 2020). Novije studije su ukazale da je dorzalni deo hipokampusa označen kao CA2 od najveće važnosti za socijalnu memoriju kod glodara (Hitti, Siegelbaum, 2014; Stevenson, Caldwell, 2014; Meira i sar., 2018; Diethorn, Gould, 2023). Inaktivacija ovog dela hipokampusa utiče na prepoznavanje nove jedinke u testu direktnog suočavanja jedinki (pri čijem izvođenju eksperimentator plasira jedinke u prostor u kome se testiranje obavlja i prati njihovo ponašanje), ali ne utiče na socijabilnost u trokomornom testu (Hitti, Siegelbaum, 2014). Ista studija je takođe pokazala da jedinke kod kojih je primenjena funkcionalna inaktivacija piramidnih neurona CA2 ne menjaju ponašanje u hipokampus-zavisnom testu prostorne memorije, kao i da ovim jedinkama nije izmenjena lokomotorna aktivnost, ponašanje nalik anksioznom ili percepcija mirisa (Hitti, Siegelbaum, 2014).

Novija istraživanja na glodarima su ukazala da su najveći inhibitorni interneuroni mozga, parvalbumin (PV) eksprimirajući interneuroni, koji su ključni za regulaciju senzorne plastičnosti tokom razvoja i adultnog doba, značajni za socijalnu memoriju i da se smanjenje gustine ovih interneurona u CA2 dovodi u vezu sa deficitom socijalne memorije (Piskorowski i sar., 2016). Kao i da socijalna memorija sazreva tokom adolescencije i da veliku ulogu u ovom procesu imaju maturacija perineuronske mreže i inhibitorne aktivnosti PV interneurona ka piramidnim neuronima u CA2 (Domínguez i sar., 2019). Međutim, sredinski faktori koji utiču na sazrevanje socijalne memorije tokom adolescencije i uspostavljanje punog funkcijskog kapaciteta PV interneurona u CA2 još nisu detaljno istraženi, kao i da li i kako deficit socijalnog iskustva tokom adolescencije utiče na socijalnu memoriju PV interneurona u CA2. Na eksperimentima na glodarima nedavno je pokazano da je za funkcijsku maturaciju PV interneurona u kori velikog mozga i socijabilnost u adultnom dobu neophodno socijalno iskustvo tokom juvenilnog perioda (Bicks i sar., 2020), što implicira da bi nedostatak socijalnog iskustva u adolescenciji mogao da utiče i na PV interneurone u hipokampusu.

Istraživanja rađena na ljudima (*post-mortem* istraživanja na mozgovima klinički dijagnostikovanih pacijenata), kao i eksperimentalnim modelima ukazuju na povezanost poremećaja raspoloženja, psihijatrijskih poremećaja i spektra autističnih poremećaja sa promenama u PV interneuronima i impliciraju da bi ove promene mogle biti zajednički uzrok sličnih emocionalnih i/ili kognitivnih promena u ovim različitim patologijama (Perlman i sar., 2021). Međutim, smanjenje broja PV interneurona ne ukazuje na to da li je u pitanju trajni gubitak ovih neurona ili smanjena ekspresija PV u neuronima koji ostaju vijabilni, ali funkcionalno izmenjeni. Intenzivno istraživanje na mišjim modelima autizma ukazuje da je redukovana ekspresija PV uzročno povezana sa

smanjenom socijalnom interakcijom i oslabljenom komunikacijom ovih životinja u testovima socijalnog ponašanja (Filice i sar., 2020).

1.5. Mapiranje socijalnog prostora u fizičkom prostoru

Dorzalni hipokampus je značajan za prostornu memoriju, dok je ventralni hipokampus uključen u procese emocionalne memorije. Pokazano je da pacovi sa lokalizovanim lezijama dorzalnog hipokampusa imaju smanjenu sposobnost prostornog učenja, što nije slučaj kod pacova sa lezijama ventralnog hipokampusa, na osnovu čega je zaključeno da je dorzalni hipokampus važniji od ventralnog za kodiranje novih prostornih informacija (Moser i sar., 1993). Eksperimenti koji su naknadno sprovedeni su potvrdili ovu hipotezu ukazujući da, kod glodara, lezija dorzalnog hipokampusa narušava prostorno učenje i prostornu memoriju, kao što to čini i lezija celokupnog hipokampusa, dok lezija ventralnog hipokampusa neznatno utiče na prostorno učenje testiranih jedinki (Pothuizen i sar., 2004).

Kod socijalnih sisara socijalni kontekst mapira se kao sadržaj specifičan za određeni prostor i kao takav se i pamti, tj. memoriše se socijalni prostor u fizičkom prostoru, zahvaljujući postojanju apstraktnih emocija kakve su socijalna afilijacija i povezanost (Montagrin, Saiote, 2018; Schafer, Schiller, 2018). Ovi podaci ukazuju da bi delovi hipokampusa značajni za prostornu memoriju, kao što je DG (van Dijk, Fenton, 2018), mogli biti od značaja kada se analizira socijalno ponašanje u širem smislu obuhvatajući, uz socijabilnost, i *socijalnu orijentaciju*, tj. motivisanost da se posećuju mesta sa socijalnim kontekstom. Nekoliko mnemoničkih funkcija se pripisuje dentatnom girusu, a među njima su obrada informacija po principu razdvajanja obrazaca (engl. *pattern separation*; slične i preklapajuće informacije se čine jasnijim i nove informacije se kodiraju bez brisanja sličnih prethodno uskladištenih informacija) i završetka obrazaca (engl. *pattern completion*; slične informacije se čine sličnijim u procesu kontrolisane generalizacije senzornih informacija, Yassa, Stark, 2011), detekcija novine, vezivanje informacija za prostorni kontekst i formiranje radne memorije (Hainmueller, Bartos, 2020).

Potreba za pripadanjem je važan motivacioni faktor koji favorizuje memorisanje događaja vezanih za zajednicu kojoj pojedinac pripada (Van Bavel i sar., 2012). Istraživanja na glodarima takođe ukazuju da pacovi formiraju afektivne veze (engl. *affective bonds*) kroz društvene interakcije i stvaraju grupe zasnovane na društvenom iskustvu (Ben-Ami Bartal i sar., 2014). Uloga dentatnog girusa i PV interneurona u prostornom aspektu socijalne memorije, tj. traženju i mapiranju socijalnog sadržaja u fizičkom prostoru, još je nedovoljno istražena, a akcenat u dosadašnjim istraživanjima na animalnim modelima, kao što je već navedeno, stavljen je na rasvetljavanje uloge PV interneurona u CA2 i socijalnoj memoriji koja proizilazi iz direktnog suočavanja jedinki (Domínguez i sar., 2019).

Uticaj socijalne motivacije na učenje i memoriju je novo polje u oblasti neuronauka, a eksperimenti koji ukazuju na značaj merljivih varijabli (parametara ponašanja) od posebnog su značaja (Leblanc, Ramirez, 2020). Stoga je važno razjasniti ulogu PV interneurona u poremećajima ponašanja, za koje se kao zajednička osobina uočava izmenjena anticipacija socijalnih nagrada i oslabljena socijalna kognicija (Pinkham i sar., 2008; Catalano i sar., 2022), uz razdvajanje socijalne orijentacije od socijabilnosti (Jorgensen, Nelson, 2018).

1.6. Socijalna igra - značaj direktnog socijalnog kontakta

Socijalna igra (engl. *social play*) postoji kod većine vrsta sisara, uključujući i ljude. Najprisutnija je u periodu do adolescencije, a prepoznaje se po elementima agresivnog, predatorskog i seksualnog ponašanja, praćenim eksplicitnim fizičkim, facijalnim i/ili glasovnim signalima što je čini uočljivom i merljivom (Vanderschuren i sar., 2016). Iako brojna istraživanja ukazuju da socijalna igra predstavlja visoko nagrađujuću aktivnost, njen značaj za opstanak jedinke i vrste nije tako očigledan, kao što je to slučaj sa ponašanjem vezanim za ishranu ili reprodukciju. Međutim, njen značaj ne treba potcenjivati zbog same činjenice da je aberantna društvena igra ključni simptom poremećaja ponašanja koji se dijagnostikuju u detinjstvu u humanoj populaciji (npr. autizam, poremećaj pažnje sa hiperaktivnošću, rana shizofrenija). Učešće u socijalnoj igri sa vršnjacima kod

životinja pomaže razvoju komunikativnih veština, kognitivnih i socijalnih sposobnosti i doprinosi razvoju ponašajne i mentalne fleksibilnosti (Panksepp i sar., 1984; Vanderschuren i sar., 1997; Spinka i sar., 2001). Zbog toga je vežno razumeti kako nedostatak/uskraćivanje socijalne igre u kritičnim razvojnim fazama utiče na socijalnu motivisanost i kogniciju kasnije tokom života i kako ove dve komponente međusobno intereaguju.

Glodari, kao životinje koje ispoljavaju socijalno ponašanje, predstavljaju dobar animalni model za istraživanje uticaja različitih socijalnih faktora na zdravlje. U odnosu na miševе, pacovi su društveniji (Bryda, 2013; Ellenbroek, Youn, 2016), pa bi mogli predstavljati bolji model sistem za osnovna biološka pitanja vezana za socijalno ponašanje. Kod laboratorijskih glodara socijalna interakcija i organizacija imaju fundamentalnu ulogu u formiranju ponašanja, a različiti faktori poput starosti, pola, pripadnosti i hijerarhijskog položaja jedinke značajno utiču na socijalno ponašanje pojedinačnih članova (Arakawa, 2018). Različiti oblici socijalnog ponašanja su prisutni u različitim fazama života (Von Frijtag i sar., 2002; Arakawa, 2018), pa se samim tim, učestalost socijalnih kontakata značajno menja sa uzrastom (Pellis, Pellis, 1998). Interaktivni oblici socijalnog ponašanja koji podrazumevaju socijalno ispitivanje i kontakte su kod glodara prisutni tokom čitavog života, dok je oponašanje tuče, označeno kao igra borbe (engl. *play fighting*), intenzivno prisutno pre polnog sazrevanja, da bi kasnije bilo suprimirano ostalim oblicima socijalne aktivnosti, kao što su seksualno ponašanje i agresivnost (Vanderschuren i sar., 1997). Igra borbe se smatra ključnom za socijalni razvoj, jer dovodi do formiranja bogatog i fleksibilnog socijalnog repertoara (Pellis, Pellis, 2009; Vanderschuren, Trezza, 2014). Smatra se da je *učenje* o suočavanju sa nepredviđenim okolnostima glavna funkcija socijalne igre u razvoju, jer zapravo priprema jedinku da se na adekvatan način suoči sa nepredvidivim promenama u socijalnim aspektima života (Spinka i sar., 2001).

Mozak sisara se razvija kako strukturno, tako i funkcionalno tokom adolescencije, što ga čini ranjivim na brojne sredinske uticaje (Best, Ban, 2021). Najnovija istraživanja pokazuju da *socijalno okruženje i interakcija* imaju poseban značaj u procesu maturacije tokom senzitivnih perioda razvoja mozga, jer *pripadaju stimulusima koje sistem očekuje da bi se neuronska kola adekvatno funkcionalno formirala* i omogućila fiziološki opseg ponašanja u kasnijim fazama života (Fuhrmann i sar., 2015; Bicks i sar., 2020).

Značaj aktivnog, a ne samo posmatračkog, socijalnog pristupa sve više je u fokusu kao istraživačka tema imajući u vidu sve veću upotrebu digitalnih medija, na uštrb žive igre i druženja, te smanjenje direktnih socijalnih kontakata kod dece i adolescenata preteći da postane široko rasprostranjeni fenomen (Twenge i sar., 2021). Literatura koja naglašava neophodnost socijalnog kontakta tokom ovog perioda za pravilan psihosocijalni razvoj pojedinca nije dovoljno obimna u poređenju sa postojećim podacima o značaju drugih potreba u svakodnevnom životu adolescenata poput neophodne količine sna, mikro i makronutrijenata, itd. Činjenica je da se broj publikacija na temu značaja direktnog socijalnog kontakata značajno povećao nakon COVID-19 pandemije ukazujući da je socijalna izolacija posebno doprinela narušavanju mentalnog zdravlja adolescenata (Breux i sar., 2023).

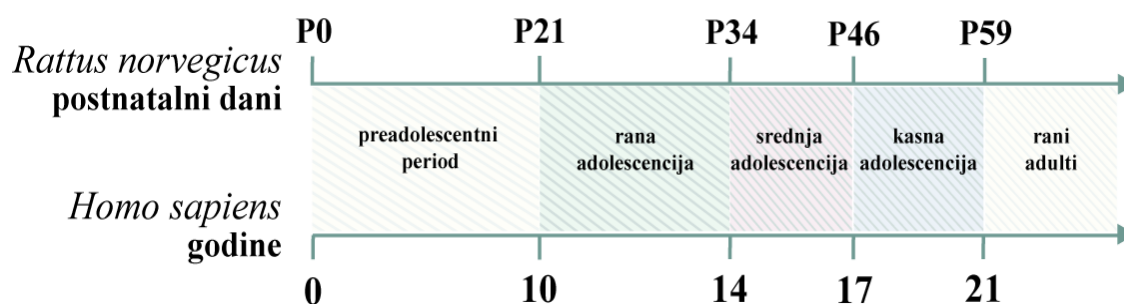
1.7. Adolescencija

1.7.1. Opšte karakteristike adolescentnog perioda

Veliki broj vrsta sisara prolazi kroz specifičnu ontogenetsku tranziciju od potpune zavisnosti od roditelja, u ranom periodu razvoja, do relativne nezavisnosti u kasnijem periodu života (Spear, 2000). Tokom ove tranzicije, individue se suočavaju sa brojnim izazovima koje je neophodno savladati, usled čega veliki broj životinja, uključujući i čoveka, tokom adolescencije razvija specifične ponašajne osobine, poput povećane komunikacije među vršnjacima, povećanog nivoa istraživanja novina, kao i prisustva različitih oblika rizičnog ponašanja. Ovi prolazni oblici ponašanja predstavljaju *ontogenetske adaptacije* (Oppenheim, 1981) koje omogućavaju adolescentu da preživi „rizičan period” između detinjstva i odraslog doba i unapredi veštine neophodne za kasniji period života (Spear, 2000).

Kod eksperimentalnih glodara, pod adolescencijom se označava period od 21. do 59. postnatalnog dana (P) (Laviola i sar., 2003), mada neki autori (Brenhouse, Andersen, 2011) smatraju da nezrelost traje čak i duže. Kod glodara se može razlikovati rana (P21-P34), srednja (P34-P46) i kasna (P46-P59) adolescencija, što je u korelaciji sa periodom rane (10-13 godina), srednje (14-16 godina) i kasne (17-21 godina) adolescencije u humanoj populaciji (Slika 1.1, Braet i sar., 2013). Stoga u studijama na pacovima manipulacije u socijalnom domenu tokom razvojnog perioda P28-42 predstavljaju model za ispitivanje uticaja peripubertetskog stresa na ponašanje kasnije tokom života (Tzanoulinou i sar., 2014; Papilloud i sar., 2018).

Iako se faze puberteta i adolescencije u jednom trenutku preklapaju, pubertet predstavlja period polnog sazrevanja (Spear, 2000), dok je adolescencija period psihosocijalnog i emocionalnog sazrevanja. Adolescencija predstavlja dug proces i, s obzirom da se ne odnosi na diskretni događaj, nije jednostavno definisati početak i kraj ovog perioda (Spear, 2000).



Slika 1.1 Starost pacova (lat. *Rattus norvegicus*) izražena u postnatalnim danima u odnosu na ljudske (lat. *Homo sapiens*) godine. Preuzeto i modifikovano od Sengupta, 2013; Burke i sar., 2017.

1.7.2. Specifični oblici ponašanja karakteristični za adolescenciju

Adolescentne životinje pokazuju veću zainteresovanost za novine u poređenju sa odraslim jedinkama (Douglas i sar., 2003; Laviola i sar., 2003) uključujući novu sredinu/novinu prostora (Stansfield, Kirstein, 2006), kao i povećanu sklonost ka rizičnom ponašanju (McCourt i sar., 1993). Tokom adolescencije, mladi pacovi u divljini prvi put napuštaju svoju jazbinu i suočavaju se sa nepoznatim izazovima spoljašnjeg sveta (Galef Jr, 1981), usled čega se povećan stepen istraživanja novog prostora i socijalnog preferiranja može smatrati evolutivno adaptivnim. Ovakvo adolescentno ponašanje prisutno je i kod drugih vrsta sisara i u velikoj meri podseća na ponašanje adolescenata u humanoj populaciji, sa zajedničkim ciljem da se istraže novine i riskantni domeni i uspostave nove socijalne veze tokom procesa postizanja nezavisnosti (Spear, 2000). Evolutivno, adolescentno ponašanje koje podrazumeva povećano istraživanje novina omogućava disperziju jedinki (uglavnom mužjaka) na nove teritorije čime se smanjuje verovatnoća ukrštanja u srodstvu (Spear, 2000). Takođe, ispoljavanje rizičnog ponašanja kod mužjaka tokom polnog razvića može povećati verovatnoću reproduktivnog uspeha u kompetitivnoj reproduktivnoj sredini, te su ovakvi oblici ponašanja tokom evolutivne istorije vrsta bili neophodni za obezbeđivanje fizičkih resursa i privlačenje partnera (Steinberg, Belsky, 1996).

Adolescenti se razlikuju od adulata po načinu na koji donose odluke, senzitivnosti na nagrađujuće stimulse, kapacitetu inhibitorne kontrole i samokontrole, sklonosti ka impulsivnom reagovanju i osetljivosti na stresne ili emotivne okolnosti (Spear, 2010), što može da rezultuje i negativnim ishodima, uključujući paradoksalno visoku stopu smrtnosti (Dahl, 2004; Spear, 2010). Usled toga je adolescencija označena kao period velikih mogućnosti, ali i ranjivosti i skrenuta je pažnja da je neophodno bolje razumevanje sredinskih faktora/okolnosti koje idu u prilog ranjivosti (Dahl, 2004).

1.7.3. Razvoj nervnog sistema tokom adolescencije

Promene u centralnom nervnom sistemu (CNS) tokom adolescencije evidentirane su kod svih vrsta sisara (De Haan, Gunnar, 2009). Po svojoj prirodi one mogu biti progresivne i regresivne. Progresivne promene podrazumevaju intenzivnu mijelinizaciju aksona koji povezuju različite moždane regione, čime se znatno ubrzava sprovođenje nervnih impulsa, ali i povećava njihova koordinacija (Spear, 2010). Sa druge strane, jedna od regresivnih promena podrazumeva sinaptičko orezivanje, odnosno proces uklanjanja ekscitatornih sinapsi koje po rođenju postoje u većem broju, usled čega su sinaptička gustina i debljina moždane kore veći u prvim godinama života nego u adultnom dobu (Tau, Peterson, 2010; Semple i sar., 2013; Eltokhi i sar., 2020). Proces sinaptičkog orezivanja karakteriše eliminacija slabih i suvišnih sinaptičkih veza (Sowell i sar., 2004; Wang i sar., 2018), a ključan je za povećavanje neuronske transmisije i uspostavljanje fino podešenih petlji koje obezbeđuju efikasno kognitivno procesuiranje u adultnom dobu. Ovako visoko selektivne neuronske promene, u vidu formiranja i iskrajanja sinapsi tokom razvoja, spadaju u *sredinski regulisanu plastičnost mozga*, jer intenzitet promena značajno zavisi od prirode sredinskih uticaja i njihovog vremenskog delovanja (Zuo i sar., 2005; Carpenter-Hyland, Chandler, 2007).

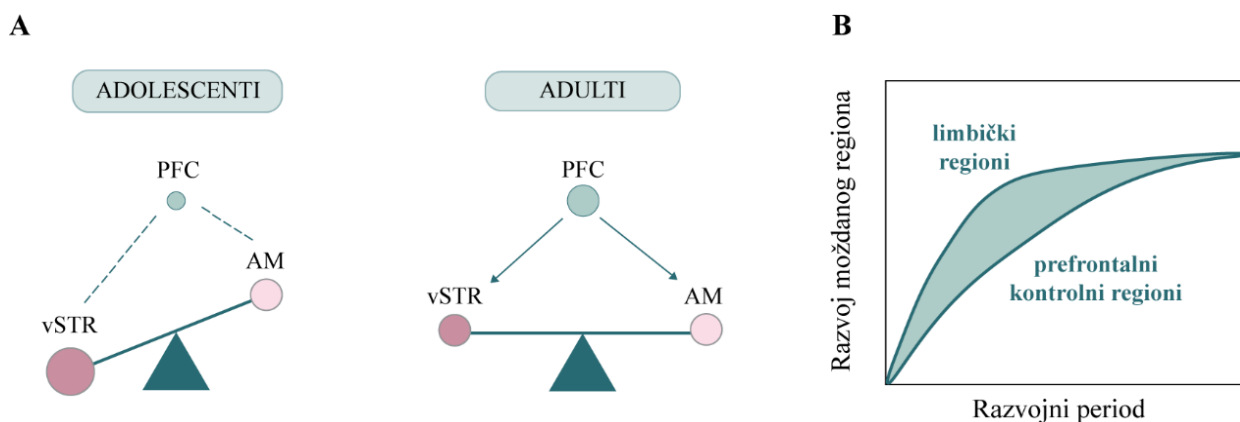
Tokom adolescencije dolazi do maturacije GABA sistema sa ciljem povećanja inhibitorne kontrole i stabilnosti unutar lokalnih neuronskih mreža (Bavelier i sar., 2010; Le Magueresse, Monyer, 2013). Balans ekscitatorne (E) i inhibitorne (I) neurotransmisije (E/I balans) proističe iz složene interakcije između ekscitatornih glutamatskih i inhibitornih neurona GABA sistema. GABA interneuroni čine oko 20% ukupne populacije neurona mozga i mogu se podeliti u 3 veće grupe, na osnovu specifičnih proteina koje eksprimiraju parvalbumin (PV), somatostatin (SOM) i jonotropni receptor za serotonin 3a (5HT3aR) (Selten, van Bokhoven, 2018). Kada je formirana hipoteza da spektar autističnih poremećaja (engl. *autism spectrum disorders* - ASDs) nastaje kao posledica izmenjenog E/I balansa u ključnim neuronskim sistemima (Rubenstein, Merzenich, 2003), veliki broj studija je uspeo da postulira ovu hipotezu i na druge psihijatrijske poremećaje. Postoje indikacije da je prirodno povećana izloženost stresorima u adolescenciji jedan od uzročnika izmenjene E/I ravnoteže (Page, Coutellier, 2019), što zajedno sa činjenicom da neuronski i hormonski sistemi koji posreduju u odgovoru na stres sazrevaju tokom adolescencije (Roberts, Lopez-Duran, 2019), ukazuje da *stresna iskustva tokom adolescencije mogu značajno doprineti razvoju emotivnih nestabilnosti i psihopatoloških poremećaja*. Pitanje zašto se većina psihijatrijskih oboljenja po prvi put klinički ispoljava u adolescenciji je jasno postavljeno pre 15 godina (Paus i sar., 2008), a za odgovorima se i dalje traga kroz brojna istraživanja.

1.7.4. Maturacija sistema odgovornih za racionalno odlučivanje i nagrađivanje (engl. *rewarding system*)

Smatra se da je adolescentno ponašanje u velikoj meri posledica „neusaglašenog” sazrevanja prefrontalne moždane kore (engl. *prefrontal cortex* - PFC), koja sazreva kasno u adolescenciji, a ključna je za rasuđivanje i donošenje odluka i subkortikalnih regiona limbičkog sistema, koji sazrevaju ranije i važna su za procesuiranje emotivnih i nagrađujućih stimulusa (Slika 1.2). Čini se da je opšta karakteristika adolescentnog perioda socijalnih vrsta visoka osetljivost na nagradu, a istraživanja na ljudima i životinjama, uključujući glodare, ukazuju da adolescencija predstavlja jedinstven period u razvoju sistema za nagrađivanje (Ernst i sar., 2006). Stoga su racionalno razmišljanje, procena rizika, kontrola impulsivnosti i regulacija ponašanja pod socijalnim i emotivnim uzbuđenjem otežani u adolescenciji.

Obimna studija na više od 5000 adolescenata iz 11 različitih zemalja Evrope, Amerike, Azije i Afrike pokazala je da se sklonost ka novinama i aktivnostima koje donose uzbuđenje (odnosno traženje senzacija, engl. *sensation seeking behaviour*) povećava u periodu od preadolescencije do kasne adolescencije, dostižući vrhunac u dobi od 19 godina i opadajući nakon toga, dok se sposobnost samokontrole, odnosno kontrole sopstvenog ponašanja i odlučivanja stalno povećava i dostiže plato između 23. i 26. godine života. Ovakvi razvojni obrasci su u velikoj meri slični među ispitanicima iz

različitih zemalja (Steinberg i sar., 2018). Razlike između odraslih i adolescentih lica u emotivnom rasuđivanju i odlučivanju su prepoznate kao značajne i u oblasti zakonodavnog pravnog sistema, postavljajući kao osnovu činjenicu da uzrast u kome se prava i obaveze dodeljuju licima mora da bude u skladu sa njihovim psihičkim kapacitetima i veštinama neophodnim za dobro rasuđivanje u specifičnim kontekstima (Steinberg, Icenogle, 2019).



Slika 1.2 Trijadni model motivisanog ponašanja. (A) Trijadni model je baziran na funkcijskoj ravnoteži između tri sistema: nagrađujućeg sistema ventralnog strijatuma (vSTR), koji podstiče prilaženje stimulusu, kaznenog sistema amigdala (AM), koji podstiče izbegavanje stimulusa, kao i prefrontalne kore (PFC) koja predstavlja kontrolni sistem. Kod adolescenata ravnoteža je usmerena ka nagrađujućem sistemu, što je posledica slabijeg kaznenog sistema i/ili regulatorne kontrole PFC. (B) Razvojni put specifičnih moždanih regiona od detinjstva preko adolescencije do adultnog doba. Regionalne neurohemijske, strukturne i funkcijske promene unutar mozga dovode do neravnoteže unutar moždanih petlji koje za posledicu imaju nelinearne promene u ponašanju tokom adolescencije. Preuzeto i modifikovano od Ernst i sar., 2006, kao i Berridge, 2004; Casey, Jones, 2010.

Prema trijadnom modelu (Ernst i sar., 2006), zasnovanom na istraživanjima kako na životinjama, uključujući glodare i neljudske primat, tako i na ljudima, adaptivno motivisano ponašanje zahteva funkcijsku integraciju nagrađujućeg sistema ventralnog strijatuma (engl. *reward/approach system*), kazneno-izbegavajućeg (engl. *punishment/avoidance*) sistema amigdala i supervizorskog sistema medijalnog PFC (mPFC), koji reguliše druga dva sistema. Kod adolescenata balans je usmeren ka nagrađujućim oblicima ponašanja (tj. pristupanju novinama i aktivnostima koje donose uzbuđenje i osećaj zadovoljstva), usled pojačane aktivnosti ventralnog strijatuma, a relativno manjeg uticaja amigdala i slabije regulatorne kontrole od strane mPFC (Ernst i sar., 2006). Kao što je već navedeno, sklonost ka novinama i rizičnom ponašanju postoji i kod adolescentnih glodara, a novije studije na laboratorijskim pacovima takođe ukazuju da je, kao i kod ljudi, impulsivno ponašanje takođe zastupljenije kod adolescentnih u odnosu na adultne jedinke (Hammerslag, Belagodu, 2019).

1.7.5. Uticaj socijalnog okruženja na aktivnost sistema odgovornih za racionalno odlučivanje i nagrađivanje

Razvojni putevi kognitivne kontrole su veoma složeni i mogu biti modifikovani od strane emotivnih izazova ili nagrađujućih konteksta, poput socijalne ili seksualne interakcije. Prisustvo socijalne igre tokom adolescencije je ključno za modifikaciju nervnih petlji PFC kojima se formira adekvatan odgovor na dalje socijalne i nesocijalne kontekste, što je intenzivno istraživano u eksperimentima na modelima laboratorijskih glodara (Vanderschuren, Trezza, 2014; Pellis i sar., 2014; Burke i sar., 2017).

Ponašanje koje podrazumeva socijalnu igru zavisi od precizne koordinacije neuronskih kola koje leže u osnovi socijalnih, kognitivnih i emotivnih procesa. Pored toga, socijalna igra predstavlja i visoko nagrađujuću aktivnost, usled čega su mehanizmi koje leže u osnovi pozitivnih emocija takođe

uključeni u ovaj vid ponašanja (Vanderschuren, Trezza, 2014). Nedostatak socijalne igre u peripubertetu značajno utiče na strukturnu i funkcionalnu maturaciju PFC i strijatuma i remeti adaptivne ponašajne pristupe u kasnijim fazama života. Socijalna igra je značajna za formiranje neuronskih kola u PFC tokom razvoja, jer učestvuje u finom modelovanju inhibitornih sinapsi unutar mPFC, što je važno za uspostavljanje kognitivnih strategija i koordinaciju pokreta tokom interakcija, a nedostatak socijalne igre utiče na inhibitorne veze unutar ovog regiona kod pacova (Bijlsma i sar., 2023). Sa druge strane, studije ukazuju da ventralni strijatum (*nucleus accumbens* - NAc) ima važnu ulogu u pozitivnom emotivnom doživljaju socijalne igre (Trezza i sar., 2011). Kao i u drugim oblicima motivisanog ponašanja i u socijalnoj igri dopamin je važan za samu motivisanost za socijalnom igrom, dok su opioidni i endokanabinoidni sistemi uključeni u osećaj zadovoljstva, usled nagrađujućih efekata igre. Takođe, dopaminski sistem dorzalnog strijatuma je neophodan za formiranje adekvatnog motornog odgovora u socijalnoj igri, jer njegov nedostatak dovodi do nedostatka složenih defanzivnih strategija tokom igre pacova (Pellis i sar., 1993).

Direktna socijalna interakcija sa vršnjacima kod različitih socijalnih vrsta predstavlja motivacioni signal, koji utiče na strukturnu i funkcionalnu maturaciju sistema odgovornih za racionalno odlučivanje i nagrađivanje. Takođe, direktna socijalna interakcija sa vršnjacima može smanjiti kognitivnu kontrolu kod adolescentnih jedinki u humanoj populaciji i glodara, usled pojačane aktivnosti subkortikalnih regiona limbičkog sistema (koji procesuiraju emotivne i nagrađujuće stimulse kakav je i prisustvo vršnjaka), koje PFC još ne može adekvatno da kontroliše (Casey, Jones, 2010). Zbog toga je značajno da adolescenti nauče da upravljaju svojim ponašanjem u složenim socijalnim situacijama uprkos prisutnim snažnim osećanjima. Važnost postojanja socijalnog iskustva tokom ovog perioda razvoja ogleda se u činjenici da u nedostatku istog, dolazi do kognitivnih i socijalnih deficita kasnije tokom života i kod ljudi i životinja (Burke i sar., 2017). Sve iznete činjenice su u skladu sa već pomenutom hipotezom da socijalno okruženje i interakcija imaju poseban značaj tokom razvoja mozga, jer pripadaju stimulusima koje sistem očekuje da bi se neuronska kola adekvatno funkcionalno formirala i omogućila fiziološki opseg ponašanja u kasnijim fazama života (Fuhrmann i sar., 2015; Bicks i sar., 2020).

1.8. Socijalna izolacija - model za socijalni stres i depresiju u adolescenciji

Razviće životinja koje ispoljavaju socijalno ponašanje pod uticajem je različitih sredinskih faktora koji, između ostalog, podrazumevaju količinu i kvalitet kontakta između dve ili više jedinki, označenog kao socijalna sredina (Varty i sar., 2000). Pozitivne socijalne interakcije u vidu odnosa majke i mladunaca, socijalne igre i seksualne interakcije predstavljaju esencijalni deo ponašajnog repertoara sisara i imaju visoko nagrađujuću vrednost (Trezza i sar., 2011). Naime, *socijalne nagrade aktiviraju iste signalne puteve kao i drugi nagrađujući stimulusi* (Insel, 2003). Prisustvo nagrađujućeg pozitivnog iskustva, dobijenog iz socijalnih interakcija je neophodno tokom razvoja, jer utiče na emotivnu dobrobit, uspostavljanje i održavanje adekvatnih socijalnih struktura i društvenu organizaciju kod glodara (Trezza i sar., 2011).

Eksperimentalni modeli koji podrazumevaju manipulaciju socijalne sredine, poput socijalne izolacije glodara tokom adolescencije (Lapiz i sar., 2003), smatraju se pogodnim translacionim modelom za ispitivanje posledica socijalnih deprivacija koje se javljaju i u humanoj populaciji. Eksperimenti na glodarima su pokazali da socijalna izolacija ima najsnažniji efekat tokom rane faze razvoja, od perioda odvajanja mladunaca od majki (P21) do kasne adolescencije (P60), pri čemu su posledice izolacije dugotrajne (Weiss i sar., 2004; Lukkes i sar., 2009; Matsumoto i sar., 2019; Tanaka i sar., 2019) i postoje i nakon resocijalizacije (Einon, Morgan, 1977; Wright i sar., 1991). Smatra se da je razlog ovako specifičnog odgovora to što različiti neurohemijski sistemi, koji regulišu odgovor na stres i učestvuju u regulaciji raspoloženja, intenzivno sazrevaju u periodu od rane do kasne adolescencije (Spear, 2000). Aktivnost hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne osovine (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis* - HPA), koja predstavlja glavni deo neuroendokrinog sistema koji učestvuje u reakciji organizma na stres i kontroliše brojne sistemske procese, a čija se aktivnost meri nivoom hormona stresa (kortizol kod čoveka, kortikosteron kod glodara) u krvi,

pojačana je tokom adolescencije (McCormick i sar., 2010; Klein, Romeo, 2013). Nakon izlaganja akutnom stresoru ova osovina pokazuje produženi hormonski odgovor u adolescentnom u odnosu na adultni period glodara (Goldman i sar., 1973; Romeo i sar., 2006). Fiziološka implikacija ovako produženog odgovora hormona stresa nije u potpunosti jasna, ali važna uloga kortikosterona u mobilizaciji energije jeste (Sapolsky i sar., 2000; Pecoraro i sar., 2006), što može ukazati na različite metaboličke zahteve prepubertetskih u odnosu na adultne životinje tokom izlaganja stresorima. Različite pretkliničke i kliničke studije ukazuju da prisustvo stresa u adolescenciji značajno remeti pravilno sazrevanje HPA osovine i može prouzrokovati dugoročne promene u ponašanju (Gutman, Nemeroff, 2003; Lapiz i sar., 2003; Nemeroff, 2004; Fone, Porkess, 2008), doprinoseći pojavi različitih psihopatologija u adultnom periodu. Kada se preterano aktivira tokom faza razvoja, HPA osovina može postati trajno nestabilna, hiperstimulisana ili disfunkcionalna (Faravelli i sar., 2010).

Sumnja se da je smanjenje direktnih društvenih kontakata sa vršnjacima tokom rane adolescencije kod ljudi faktor rizika za simptome depresije (Primack i sar., 2017; Twenge i sar., 2019), ali rane ponašajne manifestacije još nisu pouzdano utvrđene. Kliničke studije ukazuju na visok komorbiditet anksioznosti i depresije u adolescenciji (Cummings i sar., 2014), mada je pitanje redosleda pojavljivanja pojedinačnih simptoma još sporno, jer svaki povećava rizik pojave i/ili pogoršanja drugog (Liu i sar., 2018).

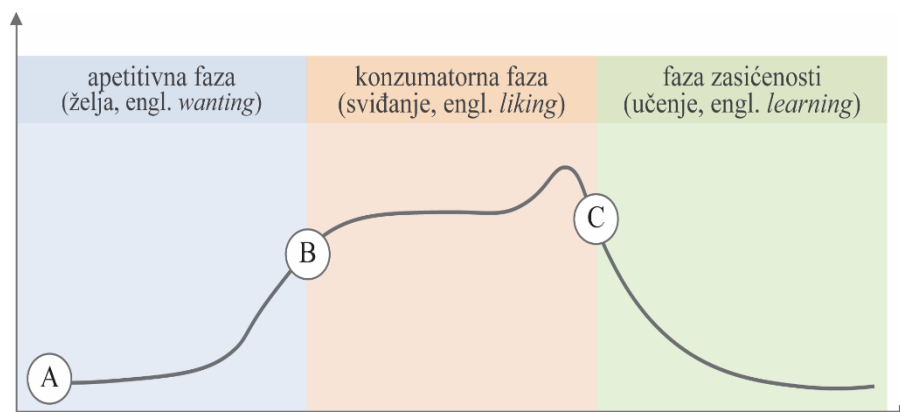
1.9. Anhedonija kao višedelni konstrukt i njena uloga u depresivnim poremećajima

Parametri na osnovu kojih se postavlja dijagnoza depresije jesu prisustvo depresivnog raspoloženja/iritabilnosti i/ili anhedonije, mada depresivni poremećaj kod adolescenata može da se manifestuje drugačije nego kod odraslih (Thapar i sar., 2012). Nedavna otkrića istakla su značaj anhedonije, ali ne i razdražljivosti, kao obeležja adolescentne depresije, bez obzira na starost, pol, indeks telesne mase i etničku pripadnost (Gabbay i sar., 2015). Anhedonija se smatra nepovoljnim parametrom za tok oporavka i ima izuzetan prediktivni značaj (Gabbay i sar., 2015).

Ključni elementi hedonističkog ponašanja kao forme motivisanog ponašanja čine faza želje (apetitivna faza), faza sviđanja (konzumatorna faza) i faza učenja, koji su sastavni deo *ciklusa zadovoljstva*, a koji stimuliše jedinku da praktikuje ponašanja koja su u prirodnim uslovima često povezana sa individualnim opstankom (Slika 1.3, Kringelbach, Berridge, 2016).

Mada se klinički procenjuje kao jedinstveni konstrukt, anhedonija zapravo predstavlja višedelni konstrukt, jer obuhvata tri prethodno navedene komponente: *motivacionu komponentu* (želja, engl. *wanting*; odnosi se na anticipacijsku fazu odnosno motivaciju ka nagradi), *hedonističku komponentu u užem smislu* (sviđanje, engl. *liking*; odnosi se na efekat užitka prilikom konzumiranja nagrade) i *kognitivnu komponentu* (učenje, engl. *learning*; povezuje druge dve komponente i omogućava subjektu da formira asocijacije, reprezentacije i predikcije o budućim nagradama baziranim na prethodnom iskustvu) (Berridge, Robinson, 2016; Berridge, 2018). Deficit u bilo kojoj od tri navedene komponente sprečava individuu u obavljanju aktivnosti usmerenih ka nagradama.

Za osećaj zadovoljstva, odnosno hedonističku percepciju nagrade, kao i pozitivnih efekata socijalnih interakcija odgovorni su ventralni strijatum i orbitofrontalna kora (OFC), odnosno μ (mi) opijatni i endokanabinoidni receptori u njima (Vanderschuren i sar., 1995). Mesta hedonističke percepcije nagrade, označena kao hedonistički aktivna polja, odgovaraju sa hedonističkom amplifikacijom, gde stimulacija jednog polja dovodi do neurobiološke aktivacije drugih (Smith, Berridge, 2007). Sa druge strane, dopamin posreduje u želji, a ne zadovoljstvu. Danas je široko prihvaćeno da su moždani mehanizmi koji određuju kolika je „želja” za nekom nagradom odvojeni od mehanizama koji određuju kolika je ta ista nagrada „dopadljiva” (Salamone, Correa, 2002; Berridge, Robinson, 2016). Ipak, treba naglasiti da se i konzumatorna i motivaciona komponenta obrade nagrađujućih stimulusa preklapaju i mogu uticati jedna na drugu, pa je tako dokazano da blokiranje signalizacije posredovane opijatnim receptorima redukuje aktivnost dopaminskog sistema (Spanagel i sar., 1992; Wenzel, Cheer, 2018).



Slika 1.3 Ciklus zadovoljstva. Tri psihološke komponente nagrade podrazumevaju prisustvo apetitivne i konzumatorne faze, kao i faze zasićenja i učenja iz datog iskustva. (A) Inicijacija potražnje za nagrađujućim stimulusom. (B) Uključivanje u konzumiranje nagrade. (C) Zasićenje i prestanak konzumiranja nagrade. Preuzeto i modifikovano od Kringelbach, Berridge, 2016.

1.10. Test akutnog izlaganja D-amfetaminu u prepoznavanju atipične depresije

Iako nije u potpunosti poznato kako su pojedinačne komponente anhedonije povezane sa razvojem depresije, motivaciona komponenta je najbolje obrađena, zbog nalaza o manjku dopamina u nekim oblicima depresije, kao što je ona sa izraženom psihomotorom retardacijom (Dichter i sar., 2010). Kod takvih pacijenata dolazi do poboljšanja kliničke slike u odgovoru na psihostimulans D-amfetamin (dekstroamfetamin, D-AMPH) koji, delujući na vezikularni monoaminski transporter - VMAT2, podstiče oslobađanje dopamina iz presinaptičkih završetaka u sinaptičku pukotinu, istovremeno inhibirajući njegovo ponovno preuzimanje posredstvom dopaminskog transportera - DAT (Sulzer i sar., 2005), što indirektno ukazuje na suštinski problem u dopaminskoj signalizaciji u bolesti (Tremblay i sar., 2010).

Međutim, kod nekih pacijenata se u odgovoru na D-AMPH ili triciklične antidepresive klinička slika pogoršava (Fawcett, Siomopoulos, 1971), što predstavlja prvu i najjaču determinantu atipične depresije. Atipična depresija je češća kod mlađih pacijenata (Łojko, Rybakowski, 2017). Manji intenzitet depresije, popravljane raspoloženja u prisustvu pozitivnog signala (engl. *mood reactivity*), povećan apetit, visok stepen komorbiditeta sa anksioznošću, nizak ili normalan nivo bazalnog kortizola, su neke od karakteristika atipične depresije (Davidson i sar., 1982; Łojko, Rybakowski, 2017).

Osim u prepoznavanju podtipova depresije, test akutnog izlaganja D-AMPH, označen kao amfetaminski test izazova (engl. *amphetamine challenge test*), je kao psihofarmakološka proba doprineo ispitivanju podtipova shizofrenije i brzoc proceni odgovora na psihofarmaceutike u depresiji i shizofreniji, dajući značajne smernice u terapijskom pristupu kada su ove bolesti u pitanju (Hall i sar., 1984). Treba naglasiti da, iako u visokim dozama može izazvati psihotično ponašanje, u malim dozama D-AMPH ima terapijski efekat poboljšavajući pažnju, budnost i memorijske sposobnosti (Servan-Schreiber i sar., 1998). Takođe, amfetamini predstavljaju klasu legalnih lekova koji se koriste u terapiji poremećaja pažnje i hiperaktivnosti (engl. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder - ADHD*) i narkolepsije.

1.11. Motorna aktivnost izazvana primenom D-amfetamina kod glodara kao indikator nagrađujućeg efekta tretmana - uloga neuronske aktivnosti prefrontalne kore i strijatuma

Zahvaljujući strukturnoj sličnosti sa dopaminom, D-AMPH je u kompeticiji sa ovim kateholaminom za transport u neurone posredstvom DAT (Liang, Rutledge, 1982). Zbog visokog nivoa ekspresije ovog transportera u strijatumu (Piccini, 2003; Block i sar., 2015), hiperdopaminski efekat D-AMPH je najveći u ovom moždanom regionu, što kod glodara za posledicu ima dozno-zavisno povećanje motorne aktivnosti (manje doze stimulišu lokomotornu aktivnost, dok veće doze stimulišu stereotipnu aktivnost). Konzistentni su podaci da kod zdravih glodara doze D-AMPH od 1-2 mg/kg stimulišu lokomotornu aktivnost (Porrino i sar., 1984; Sharp i sar., 1987; Yates i sar., 2007). Mada delovanje preko DAT nije jedini mehanizam kojim D-AMPH postiže svoje efekte, najefikasniji je (Sulzer i sar., 2005), čemu u prilog ide i podatak da je efekat D-AMPH pojačan kod životinja koje imaju povećanu ekspresiju DAT (Calipari i sar., 2013).

Lokomotorna aktivnosti izazvana primenom D-AMPH kod glodara odražava bezuslovni odgovor na nagrađujući efekat droge (Wise, Bozarth, 1987) i praćena je sintezom proteina ranog ćelijskog odgovora (biohemijskim indikatorima neuronske aktivnosti) u aktiviranim delovima mozga (Sheng, Greenberg, 1990; Morgan, Curran, 1991), te se kao farmakološki tretman koristi za proučavanje promena u sistemu za nagrađivanje (Wise, Bozarth, 1987). Indukcija aktivnosti gena ranog odgovora (engl. *immediate early genes*), kao što su *c-fos* (engl. *cellular oncogene fos*) i *zif26/egr1* (engl. *zinc finger binding protein clone 268/early growth response gene 1*) i posledična sinteza proteinskih produkata ovih gena predstavlja važan korak u indukciji neuronske plastičnosti izazvane drogama (kao i psihofarmacima), jer ovi proteini deluju kao transkripcioni faktori. Maksimalna ekspresija proteinskih produkata gena ranog odgovora se postiže 2h nakon tretmana usled čega se za njihovu analizu ova vremenska tačka najčešće koristi (Nguyen i sar., 1992). Analiza ekspresije proteinskih produkata gena ranog odgovora prepoznata je kao važan metodološki pristup u razjašnjavanju funkcionalne neuroanatomije različitih ponašanja (Biały, Kaczmarek, 1996; Dragunow, Bilkey, 2002; Roberts, Lundblad, 2009).

Inervacija dorzalnog i ventralnog strijatuma potiče iz različitih dopaminskih jedara, tj. kompaktni deo crne supstance (lat. *substantia nigra pars compacta*) inerviše dorzalni strijatum, a ventralni tegmentalni region inerviše ventralni strijatum (Beckstead i sar., 1979). Strijatum je intenzivno proučavan u cilju razjašnjavanja mehanizama koji posreduju u prelazu sa rekreativnog na kompulsivno korišćenje psihostimulanasa (Everitt, Robbins, 2013). Inicijalna primena psihostimulanasa aktivira ventralni strijatum i slabi mehanizme inhibitorne kontrole u PFC, čime se postiže osećaj zadovoljstva i uparivanje osećaja zadovoljstva sa njegovim izvorom tj. drogom. Smanjenje aktivnosti PFC i inhibitorne kontrole pospešuje uparivanje osećaja zadovoljstva i korišćenja droge, što uz aktivaciju dorzalnog strijatuma vodi habitualnoj primeni farmakološkog stimulusa. Stoga se smatra da zavisnost odražava gubitak kontrole PFC nad navikama koje nastaju zbog pojačane aktivnosti dorzalnog strijatuma, usled prethodnih konzumacija psihoaktivnih supstanci (Everitt, Robbins, 2013).

Brojne studije su pokazale da kod zdravih glodara psihostimulativne doze D-AMPH smanjuju aktivnost mPFC i stimulišu aktivnost struktura limbičkog sistema, sa akcentom na ventralni strijatum, čime tretman postiže nagrađujući efekat (osećaj zadovoljstva) kod tretiranih jedinki pacova (Mora i sar., 1976; Homayoun, Moghaddam, 2006; Gulley, Stanis, 2010). Studije koje su koristile metodu lezije takođe su jasno ukazale na značaj PFC u kontroli psihomotornog odgovora na D-AMPH, dajući doprinos razumevanju uloge PFC u kontroli ponašanja i razvoju zavisničkog ponašanja. Naime, pokazano je da se odgovor na D-AMPH povećava nakon lezije PFC kod pacova (Iversen i sar., 1971) i majmuna (Castner, Goldman-Rakic, 2003).

Ovi rezultati ukazuju da smanjena aktivnost PFC doprinosi osećaju zadovoljstva usled primene stimulusa sa nagrađujućim efektom i impliciraju da povećana aktivnost PFC može da bude razlog smanjenom osećaju zadovoljstva u odgovoru na ovakve stimulse u psihopatologijama koje kao simptom imaju anhedoniju. U prilog ovakvom tumačenju ide rezultat dobijen na nelećenim depresivnim pacijentima koji, osim što odgovaraju aktivacijom ventralnog strijatuma u meri u kojoj

kontrolni subjekti odgovaraju na novčanu nagradu, pokazuju i pojačanu aktivnost anteriornog cingulatnog korteksa što izaziva konflikt u anticipaciji nagrade i redukuje odgovor na nagrađujući stimulus (Knutson i sar., 2008). Anteriorni cingulatni korteks ima važnu ulogu u kognitivnoj i emocionalnoj kontroli, očuvan je kod sisara i kod glodara je deo medijalnog PFC (Uylings i sar., 2003; Laubach i sar., 2018; van Heukelum i sar., 2020).

Kada je u pitanju strijatum, aferentni deo bazalnih ganglija koje inervišu različiti kortikalni i subkortikalni regioni mozga, kod ljudi i drugih primata čine repato jedro (lat. *nucleus caudatus*) i ljuska (lat. *putamen*), odvojeni unutrašnjom kapsulom (lat. *capsula interna*), kao i ventralni strijatum, koga čine najventralniji deo putamena i repatog jedra sa nukleus akumbensom (Provost i sar., 2015). Međutim, kod glodara unutrašnja kapsula koja razdvaja repato jedro i putamen ne postoji te ih je zbog toga nemoguće razdvojiti prilikom izolacije tkiva, zbog čega se označavaju kao kaudoputamen ili dorzalni strijatum, u okviru koga dorzolateralni deo odgovara putamenu, a dorzomedijalni kaudatnom jedru (Provost i sar., 2015; Cataldi, Stanley, 2022; Lee, An, 2023). Kao što je već naglašeno, ventralni deo strijatuma je integralna komponenta sistema za nagrađivanje i ima važnu ulogu u osećaju zadovoljstva u odgovoru na sredinske stimulse (uključujući socijalne stimulse, farmakološke stimulse i hranu) i motivisano ponašanje usmereno ka cilju, dok je dorzalni strijatum značajan za kontrolu pokreta i obrazaca motorne aktivnosti, stvaranje proceduralne memorije i motornih rutina, stvaranje navika, nehedonistički unos hrane, ali i stvaranje zavisnosti (Volkow i sar., 2002; Liljeholm, O'Doherty, 2012; London i sar., 2018; Jurado-Parras i sar., 2020; Kravitz, Matikainen-Ankney, 2020; Cataldi, Stanley, 2022).

Sa metodološkog aspekta treba naglasiti da uticaj D-AMPH na neuronsku aktivnost PFC i strijatuma u velikoj meri zavisi od sredinskog konteksta, te se razlikuje kod glodara koji se testiraju u nepoznatim i poznatim sredinskim uslovima (Badiani i sar., 1998). Zbog toga je važno da se u eksperimentalnom protokolu naglasi da li su jedinke pre primene psihostimulansa habituirane na test arenu ili se testiranje vrši u novoj sredini (efekat droge je jači u nepoznatoj sredini). Takođe, kod glodara akutna primena D-AMPH u dozama koje simuliraju motornu aktivnost (1,5 mg/kg) osim aktivacijom ventralnog strijatuma može da rezultuje i aktivacijom dorzomedijalnog i ventromedijalnog strijatuma (Rotllant i sar., 2010), što implicira svrsishodnost analize strijatuma kao celine kada se koristi Western blot metoda (umesto kvantitativne imunohistohemijske analize) za karakterizaciju ekspresije proteinskih produkata gena ranog odgovora nakon D-AMPH farmakološkog tretmana.

1.11.1. Značaj blagovremenog prepoznavanja anhedonije kao simptoma adolescentne depresije

Klinička istraživanja naglašavaju da je anhedonija glavno obeležje adolescentne depresije bez obzira na starost, pol, indeks telesne mase i etničku pripadnost (Gabbay i sar., 2015).

Lečenje depresije kod mladih pacijenata, do 24. godine starosti, predstavlja poseban izazov, jer dosadašnji podaci ukazuju da klasičan terapijski pristup ima slabu efikasnost, a može da ima i kontra-efekat, tj. da pogorša opšte stanje i izazove suicidalne ideje (McCain, 2009; Vitiello, Ordóñez, 2016). Zbog toga je prevencija depresije izuzetno važan aspekt prepoznat od strane Svetske zdravstvene organizacije koja u svojim dopisima naglašava značaj blagovremenog prepoznavanja prvih simptoma poljuljanog mentalnog zdravlja mladih, uključujući i one koji ne dostižu karakteristike za kliničku dijagnozu. Naime, depresivni poremećaj ispod praga kliničke dijagnoze (engl. *subthreshold depressive disorders*) jedan je od najbolje utvrđenih faktora rizika za nastanak depresivnih poremećaja sa punim sindromom (Klein i sar., 2009).

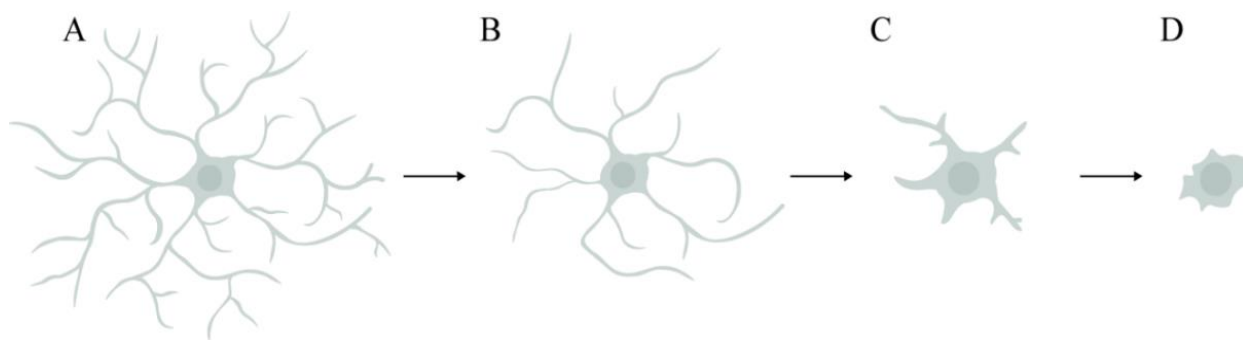
S obzirom da je smanjenje broja direktnih socijalnih kontakata u adolescenciji prepoznat kao potencijalni faktor rizika za nastanak depresivnog poremećaja (Primack i sar., 2017; Twenge i sar., 2019), dublje poznavanje ponašajnih posledica smanjenih direktnih socijalnih kontakata u adolescenciji je od ključnog značaja, sa posebnim akcentom na redosled pojavljivanja simptoma, njihovu segregaciju i stabilnost kroz vreme.

1.12. Neuroinflamacija kao posledica socijalnog stresa u adolescenciji

Stresna iskustva izazivaju oslobađanje hormona stresa u cirkulaciju i aktivaciju imunskog sistema, koji je u bliskoj komunikaciji sa centralnim nervnim sistemom. Komunikacija između imunskog sistema i ćelija CNS-a je posredovana mikroglijskim ćelijama koje, u uzajamnoj interakciji sa neuronima, regulišu neuroplastičnost, izazivaju neuroinflamaciju i posreduju u različitim psihopatologijama (Schramm, Waisman, 2022).

1.12.1. Mikroglia kao važan medijator neuroinflamacije

Mikroglijske ćelije su makrofagama slične imunske ćelije CNS-a. Ove ćelije su funkcijski i morfološki veoma dinamične, a glavna uloga im je stalno skeniranje mikrosredine i detekcija specifičnih signala koji mogu ukazati na prisustvo potencijalne „opasnosti” (D'Aloia, Molteni, 2021). Dugo vremena se smatralo da do aktivacije mikroglije dolazi isključivo u patološkim uslovima, dok su u fiziološkim uslovima ove ćelije u stanju mirovanja. Danas se zna da *mikroglia u stanju mirovanja učestvuje u održavanju neuronske homeostaze*, nadgledajući CNS, ali i da ima važnu ulogu u sinaptičkom iskrajanju tokom razvoja (Paolicelli i sar., 2011), kao i plastičnosti adultnog mozga (Parkhurst i sar., 2013). Mikroglijske ćelije održavaju funkcijsko stanje sinapsi, remodeliraju vanćelijske prostore i eliminišu sinaptičke elemente fagocitozom (Kettenmann i sar., 2013; Brown, Neher, 2014). Detekcija opasnosti unutar mikrosredine dovodi do značajnih promena u strukturi i funkciji mikroglije, koje su različite u zavisnosti od tipa i intenziteta stimulusa i lokalne sredine unutar koje se izlaganje dešava (Ransohoff, Perry, 2009). Usled toga se može razlikovati nekoliko fenotipova ovih ćelija, koji su blisko povezani sa njihovim funkcionalnim stanjem. Torres-Platas i saradnici su 2014. godine definisali četiri klase mikroglijskih ćelija u prečeonj moždanoj kori čoveka: razgranate mikroglijske ćelije (sa sitnim ćelijskim telima i brojnim dugim, tankim nastavcima), aktivne (sa većim ćelijskim telom i brojnim kraćim, debljim nastavcima), reaktivne (sa manjim okruglim ćelijskim telom i manjim brojem nastavaka) i ameboidne (sa krupnim ćelijskim telom i nijednim, jednim ili dva nerazgranata nastavka) (Slika 1.4, Torres-Platas i sar., 2014; Fernández-Arjona i sar., 2017). Autori su definisali sličnu klasifikaciju i u mišjem modelu, sa većinskim brojem ćelija razgranatog fenotipa (Torres-Platas i sar., 2014).



Slika 1.4 Osnovne četiri klase mikroglijskih ćelija. (A) Razgranata mikroglia. (B) Aktivna mikroglia. (C) Reaktivna mikroglia. (D) Ameboidna mikroglia. Preuzeto i modifikovano od Gonzalez, Hammock, 2022.

U fiziološkim uslovima, mikroglijske ćelije se nalaze pretežno u mirujućem stanju, u vidu razgranatog fenotipa, da bi u prisustvu različitih patoloških procesa ili neuroinflamacije došlo do njihovog aktiviranja, koje se ogleda u morfološkoj transformaciji iz razgranatog fenotipa u ameboidni (Fernández-Arjona i sar., 2017). Kalcijum-vezujući protein IBA1 (engl. *Ionized calcium binding adapter molecule 1*) je široko korišćen protein za izučavanje morfoloških i funkcijskih karakteristika mikroglije, s obzirom da se eksprimira i u aktivnim i u mirujućim mikroglijskim ćelijama (Frick i sar., 2013; Calcia i sar., 2016). Sa stanovišta inflamacije mikroglijske ćelije se mogu podeliti na: M0 fenotip, koji se javlja u fiziološkim uslovima (D'Aloia, Molteni, 2021) i ekvivalentan je razgranatom

fenotipu mikroglije, gde brojni, dugi i tanki nastavci omogućavaju detaljno pretraživanje lokalne mikrosredine u potrazi za infektivnim agensima ili štetnim materijalom (Nimmerjahn i sar., 2005); M1 fenotip, koji se javlja tokom infekcije ili povrede, kada dolazi do aktiviranja mikroglije i formiranja proinflamatornog fenotipa koji produkuje brojne citokine, poput faktora nekroze tumora alfa (TNF- α) i interleukina-1 beta (IL-1 β); M2 fenotip, koji predstavlja aktiviranu mikrogliju sa antiinflamatornom/neuroprotektivnom ulogom, jer produkuje IL-10, IL-4 i TNF- β i vrši uklanjanje oštećenih ćelijskih elemenata i promovise reparaciju tkiva (Olah i sar., 2011; Walker i sar., 2014; Orihuela i sar., 2016). Usled ovoga, aktivirana mikroglija može biti i neurotoksična i neuroprotektivna.

1.12.2. Neuroinflamacija, mikroglija i mentalna oboljenja/psihopatologije

Uzimajući u obzir da su patološka stanja mozga povezana sa povećanom aktivnošću mikroglijskih ćelija, postaje nejasno da li je njihova aktivacija korisna ili štetna, odnosno, da li aktivacija mikroglije prestavlja pravu inflamaciju ili jednostavno ima homeostatsku adaptivnu funkciju (Estes, McAllister, 2014; Mondelli i sar., 2017). Iako je aktivacija mikroglije neophodna za adekvatan imunski odgovor (Sugama i sar., 2007), njena *povećana i/ili produžena aktivnost* se može povezati sa nastankom različitih patologija. Stalno oslobađanje inflamatornih citokina i citotoksičnih faktora od strane aktiviranih mikroglijskih ćelija u hroničnoj inflamaciji, koja je u osnovi neurodegenerativnih oboljenja, ima za krajnji ishod apoptozu neurona (Block i sar., 2007). Neke od ovih promena se ne dešavaju samo u odgovoru na klasične inflamatorne stimuluse, kao što je infekcija, već i u odgovoru na psihološke stresore (Tynan i sar., 2010; Walker i sar., 2013), te je moguće da *prisustvo stresa poveća inače umereni inflamatorni odgovor*, preusmeravajući ga sa njegove zaštitne funkcije u neuroplastični deficit koji leži u osnovi depresivnih i anksioznih oblika ponašanja kod ljudi (Wohleb, Delpech, 2017).

Psihosocijalni stresori kod pacijenata sa različitim oblicima psihijatrijskih poremećaja mogu povećati mikroglijsku aktivnost, što za posledicu ima teže oblike psihijatrijskih poremećaja i slabiji odgovor na dostupne lekove (Mondelli i sar., 2017). Depresija, bipolarni poremećaj i spektar autističnih poremećaja praćeni su povećanim nivoom proinflamatornih citokina u perifernoj cirkulaciji (Masi, Quintana, 2015; Marazziti i sar., 2018; Rodrigues-Amorim i sar., 2018).

Međutim, rezultati dobijeni u post-mortem studijama pokazuju da povećana aktivnost mikroglije nije reproducibilna kod pacijenata sa mentalnim i emocionalnim problemima (Enomoto, Kato, 2022). Stoga, kao otvoreno pitanje ostaje korelacija između karakteristika mikroglije i nivoa proinflamatornih citokina u perifernoj krvi, što je od značaja za primenu budućih potencijalnih terapeutika čije dejstvo obuhvata suprimiranje aktivnosti glije (Wang i sar., 2022). Minociklin, tetraciklinski antibiotik druge generacije, popravljajući depresivno stanje inhibirajući mikroglijsku aktivaciju u prefrontalnoj kori i hipokampusu (Pae i sar., 2008). Ima indikacija da i nesteroidni antiinflamatorni lekovi umanjuju simptome depresije tako što inhibiraju aktivaciju mikroglije (Köhler i sar., 2014). Međutim, neophodnost opreznog terapijskog pristupa naglašavaju činjenice da antiinflamatorni medikamenti mogu i antagonistički da deluju na pozitivne ponašajne efekte nekih antidepresiva (Warner-Schmidt i sar., 2011). Nove studije ukazuju da se antidepresivno dejstvo ketamina delom može pripisati mikroglijskoj aktivaciji (Zhang i sar., 2020). Imajući u vidu da aktivirana mikroglija može biti i pro- (M1) i antiinflamatorna (M2), važno je prvenstveno definisati da li uopšte dolazi do aktivacije mikroglije u određenim uslovima, a zatim okarakterisati tip aktivacije. Tri najčešće korišćene metode za određivanje aktivacionog statusa mikroglije (koja se obeležava Iba-1 antitelom na histološkim preseccima) jesu kvantifikacija broja mikroglije u regionu od interesa (ROI), intenzitet bojenja i analiza ćelijske morfologije, pri čemu novi nalazi ukazuju da je analiza ćelijske morfologije mikroglije obeležene Iba-1 antitelom najsenzitivniji metod za procenu suptilnih promena u aktivaciji mikroglije (Wittekindt, Kaddatz, 2022).

1.13. Sistemski efekti socijalnog stresa

1.13.1. Aktivnost antioksidativnih enzima

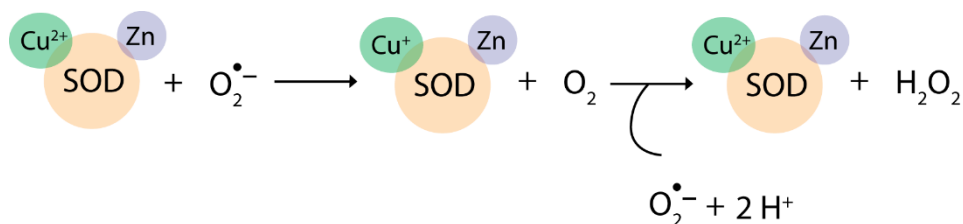
Literaturni podaci pokazuju da socijalna izolacija izaziva oštećenja CNS-a snižavajući aktivnost antioksidativnih enzima, čiji je doprinos patogenezi ponašanja sličnih depresiji prepoznat kroz rad na animalnim modelima hronične socijalne izolacije (Maes i sar., 2011; Zlatković i sar., 2014; Filipović i sar., 2017). Naime, usled velikih potreba za kiseonikom i zbog bogate lipidne konstitucije moždano tkivo je izuzetno podložno oksidativnom stresu (Bouayed i sar., 2009; Grases i sar., 2014). Molekularni kiseonik, koji je esencijalan za preživljavanje svih aerobnih organizama, učestvuje u redoks reakcijama čime se značajno povećava mogućnost nastanka visoko reaktivnih hemijskih entiteta. Ovakvi entiteti se označavaju kao reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species* - ROS) i predstavljaju nestabilne, kratko-živeće molekule koji nastaju kao nusproizvodi ćelijskog metabolizma, a koji u različitim koncentracijama različito utiču na fiziološke i patološke procese unutar organizma. Međutim, *promene u aktivnosti antioksidativnih enzima u perifernim organima usled izlaganja socijalnom stresu su još neistražene*, a njihovo ispitivanje bi doprinelo sagledavanju sistemskih efekata psihosocijalnog stresa i razumevanju komorbiditeta posledičnih emocionalnih reakcija i somatskih poremećaja.

ROS se mogu generisati u mitohondrijama, procesom aerobnog metabolizma, ali i oksidativnom eksplozijom tokom imunskog odgovora (Young, Woodside, 2001; Krishnamurthy, Wadhwani, 2012). U uslovima kada je narušena ravnoteža između formiranja ROS i aktivnosti antioksidativnih odbrambenih sistema dolazi do oksidativnog stresa (Kohen, Nyska, 2002). Povećana koncentracija ROS može dovesti do promena osobina ćelijske membrane, odnosno njene fluidnosti i propustljivosti, transporta jona i dovesti do inhibicije različitih metaboličkih procesa (Pamplona, 2008). Ovoj grupi molekula pripadaju superoksidni anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), vodonik peroksid (H_2O_2), singlet kiseonika (1O_2), azot-monoksid radikal (NO^{\bullet}), lipidni peroksidi (LOO^{\bullet}) i veoma reaktivni hidroksil radikal (HO^{\bullet}). Jedan od glavnih endogenih izvora ROS nalazi se unutar mitohondrijskog transportnog lanca elektrona tokom oksidativne fosforilacije i nastanka visokoenergetskog molekula adenozin trifosfata (engl. *Adenosine triphosphate* - ATP, Thannickal, Fanburg, 2000).

Oksidativno oštećenje se procenjuje merenjem koncentracije produkata lipidne peroksidacije (poput malondialdehida ili proteinskih karbonilnih grupa), dok se merenjem aktivnosti antioksidativnih enzima obično kvantifikuje efikasnost antioksidativnog odbrambenog sistema (Zlatković i sar., 2014).

1.13.1.1. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) je metaloenzim za čiju aktivnost je neophodan metal kao kofaktor, poput gvožđa, mangana, bakar-cinka i nikla. Enzim SOD katalizuje reakciju autooksidacije (dismutacije) $O_2^{\bullet-}$ nastalog u citoplazmi procesom respiracije ili β -oksidacije u mitohondrijama (Guan i sar., 1998; Majima i sar., 1998) do H_2O_2 i kiseonika O_2 , kroz promenu redoks statusa metalnog jona u aktivnom centru (Slika 1.5).

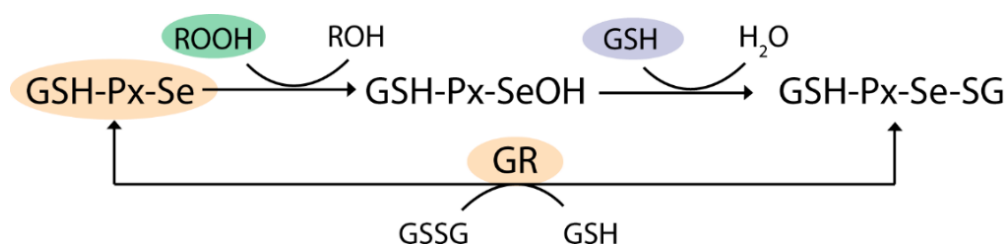


Slika 1.5 Mehanizam delovanja bakar/cink superoksid dismutaze. Preuzeto i modifikovano od Franco i sar., 2013.

Nastali H_2O_2 dalje biva redukovan do vode od strane enzima katalaze (KAT) ili glutation peroksidaze (GSH-Px) (Chelikani i sar., 2004). U zavisnosti od lokalizacije superoksid dismutaze unutar različitih ćelijskih odeljaka i kofaktora, razlikuju se tri izoforme ovog enzima. SOD1 izoforma poseduje bakar-cink u svom aktivnom centru (Cu/Zn-SOD) i nalazi se u citoplazmi i organelama gotovo svih tipova ćelija, dok se SOD2 (Mn-SOD) izoforma, koja sadrži mangan, nalazi u mitohondrijama eukariotskih ćelija (Rosa i sar., 2021). SOD3 izoforma je Cu/Zn-SOD i nalazi se izvan ćelije (Zelko i sar., 2002).

1.13.1.2. Glutation peroksidaza i glutacion reduktaza

Glutation peroksidaza (GSH-Px) je važan enzim koji razlaže H_2O_2 (nastao u reakciji superoksid dismutaze) do vode. Aktivnost ovog enzima pretežno zavisi od kofaktora selena i ima ključnu ulogu u inhibiciji lipidne peroksidacije, štiteći time ćelije od oksidativnog stresa (Ighodaro, Akinloye, 2018). Iako se nalazi u svim tkivima sisara, najveća koncentracija ovog enzima zabeležena je u jetri. GSH-Px je lokalizovan u mitohondrijama i citosolu ćelija gde redukuje niske koncentracije H_2O_2 i organske hidroperoksida do njihovih korespondirajućih alkohola i vode u prisustvu glutaciona (GSH) koji se oksiduje do glutacion disulfida (GSSG) (Dringen i sar., 2005). Redukcija GSSG nazad do GSH je katalisana od strane glutacion reduktaze (GR) pomoću redukovanog NADPH (Andreyev i sar., 2005, Couto i sar., 2013). Za aktivnost ovog enzima neophodno je konstantno prisustvo redukovanog GSH (Slika 1.6). Zahvaljujući aktivnosti enzima GR, u fiziološkim uslovima odnos GSH:GSSG je uvek u korist redukovanog GSH (Tiwari i sar., 2013).



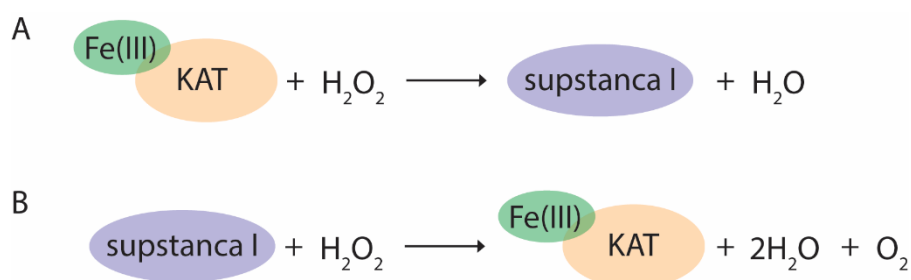
Slika 1.6 Mehanizam delovanja glutation peroksidaze i glutacion reduktaze. Preuzeto i modifikovano od Lennarz, Lane, 2013.

Hidroperoksidi predstavljaju nestabilne komponente koji nastaju u ćelijama putem različitih enzimskih reakcija ili kao jedan od produkta metabolizma. Dekompozicija ovih jedinjenja, prisutna u različitim inflamatornim oboljenjima, dovodi do nastanka ROS koji oštećuju tkivo. GSH-Px uklanja hidroperoksida, stoga je smatrano da je glavna uloga ovog enzima antioksidativna i antiinflamatorna. Međutim, novija istraživanja ukazuju da hidroperoksidi u interakciji sa drugim signalnim molekulima, a time i GSH-Px, imaju važnu ulogu i u ćelijskom rastu, diferencijaciji i proliferaciji (Lennarz, Lane, 2013). GSH predstavlja glavni izvor tiolnih grupa (-SH) u unutarćelijskim odeljcima i odgovoran je za održavanje redoks ravnoteže u ćeliji. Povećanjem odnosa redukovanog i oksidovanog glutaciona GSH:GSSG podiže se antioksidativni kapacitet, dok njegovo smanjenje ukazuje na oksidativni stres i smanjenu oksidativnu odbranu (Miler, 2017). Hronična izloženost stresorima može delovati na nivo GSH (Madrigal i sar., 2001; Ahmad i sar., 2010), a pojedina psihijatrijska oboljenja odlikuje smanjenje GSH (Gawryluk i sar., 2011).

1.13.1.3. Katalaza

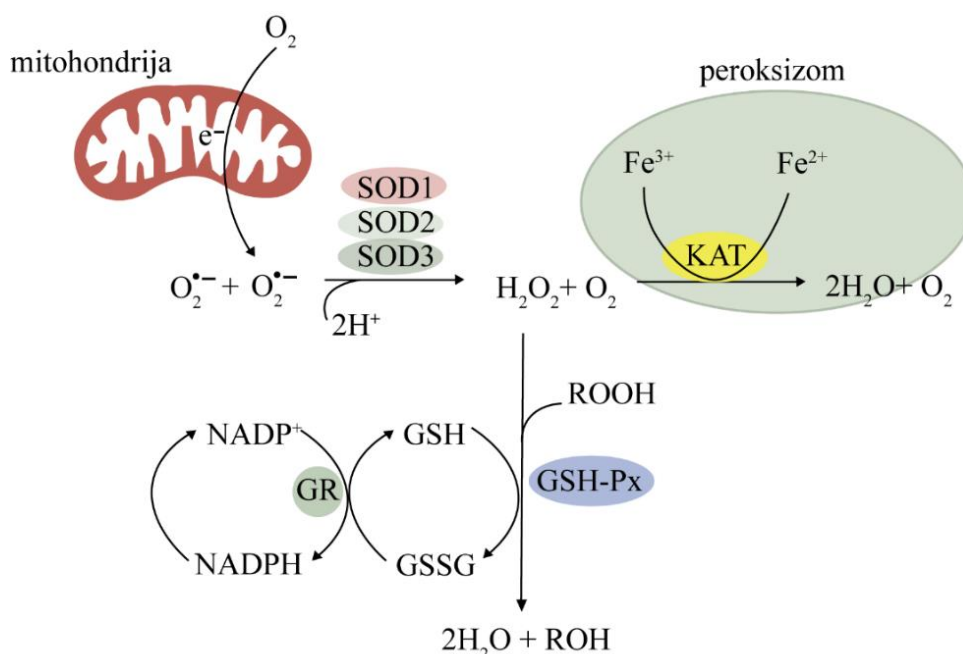
Katalaza je jedan od najvažnijih antioksidativnih enzima ćelija skoro svih aerobnih organizama. Katalaza razgrađuje H_2O_2 do H_2O i O_2 kroz dvostepenu reakciju (Slika 1.7; Nandi, Yan, 2019). Ovaj enzim koristi ili gvožđe ili mangan kao kofaktor za neophodnu reakciju, čime završava reakciju započetu od strane SOD (Ighodaro, Akinloye, 2018). Pretežno se nalazi u peroksisomima dok je u mitohondrijama sisarskih ćelija odsutna, osim u mitohondrijama ćelija srca pacova (Radi i

sar., 1991). Usled ovoga, unutar mitohondrija sisarskih ćelija ulogu razbijanja vodonik peroksida na vodu i molekularni kiseonik vrši GSH-Px.



Slika 1.7 Mehanizam delovanja katalaze. (A) U prvom koraku reakcije dolazi do formiranja međuproizvoda (supstanca I), redukcijom molekula H_2O_2 . (B) U drugom koraku dolazi do redukcije supstance I kroz redoks reakcije transfera dva elektrona sa elektron donora (molekul H_2O_2) nakon čega nastaju slobodan enzim, kiseonik i voda. Preuzeto i modifikovano od Nandi, Yan, 2019.

Pored enzimske komponente antioksidativnog sistema (Slika 1.8), postoje i druge linije odbrane organizma od ROS, kao što su „sakupljači” (engl. *scavenger*) koji „hvataju” slobodne radikale doniranjem jednog elektrona, umanjujući time njihovu štetnost. U ovu grupu neenzimskih antioksidanata spadaju askorbinska kiselina, glutation, vitamin E, ubikvinol, itd. (Ighodaro, Akinloye, 2018). Treću kategoriju čine antioksidanti koji se javljaju tek kada dođe do oštećenja, kao što su *de novo* sintetisani enzimi koji popravljaju oštećenja prouzrokovana aktivnošću slobodnih radikala na molekulu DNK, proteinima i lipidima. Takođe, oni mogu da prepoznaju i uklone oksidovane ili oštećene biomakromolekule ćelije, kako bi sprečili njihovu akumulaciju koja može biti toksična po tkiva. U ovu grupu spadaju DNK reparacioni enzimski sistemi (polimeraze, glikozilaze i nukleaze), proteolitički enzimi (proteinaze, proteaze i peptidaze), koji se nalaze u citosolu i mitohondrijama ćelija sisara (Ighodaro, Akinloye, 2018).



Slika 1.8 Mehanizam aktivnosti i međusobna povezanost glavnih antioksidativnih enzima u ćeliji. Preuzeto i modifikovano od Nandi, Yan, 2019.

1.13.2. Uloga antioksidativnih enzima u jetri, bubrezima, srcu i testisima

Jetra poseduje jedan od najvećih antioksidativnih kapaciteta usled važne metaboličke uloge skladištenja glikogena, razgradnje crvenih krvnih zrnaca, sinteze određenih proteina, detoksikacije i dr (Navarro-Arévalo, Sánchez-del-Pino, 1998; Djordjevic i sar., 2010). Ovaj organ takođe ima važnu ulogu u odgovoru organizma na stresore, kada anabolički procesi obezbeđuju neophodne količine energije za suočavanje organizma sa stresorima (Sapolsky i sar., 2000). Povišen nivo glukokortikoida, tokom odgovora na stres, može dovesti do povećanja nivoa ROS (McIntosh i sar., 1998), kao i ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima u ćelijama jetre (Chen i sar., 2020).

Klinička istraživanja ukazuju da je prisustvo oksidativnog stresa povezano sa patogeneom različitih bolesti bubrega, uključujući akutnu i hroničnu bubrežnu insuficijenciju, hipersenzitivnu nefropatiju i brojne druge (Hong, Park, 2021). Iako se smatra da je SOD1 dominantna izoforma u ćelijama bubrega, smanjenje aktivnosti SOD2 je povezano sa ozbiljnijim patološkim promenama, kao što su: renalna disfunkcija, inflamacija i apoptoza (Kitada i sar., 2020). Takođe, KAT bubrežnih ćelija ima važnu ulogu u zaštiti od dijabetične nefropatije smanjenjem oksidativnog stresa posredstvom regulacije renin-angiotenzin sistema i metabolizma unutar peroksizoma (Hong, Park, 2021).

Stres ima štetne efekte i na funkcionisanje muškog reproduktivnog sistema, dovodeći do povećanog stvaranja ROS. Visok nivo ROS može se povezati sa lošijim kvalitetom spermatozoida i pojavom infertiliteta kod mužjaka pacova (García-Díaz i sar., 2015), uzevši u obzir da su spermatozoidi posebno osetljivi na oksidativni stres usled specifične građe podložne lipidnoj peroksidaciji (Sikka, 2001, Parodi, 2014). Značajne promene u nivou različitih antioksidativnih enzima u testisima uočene su kod pacova tokom maturacije, a smatra se da su ovakve promene, poput značajno povećanog nivoa SOD, posledica potrebe većih količina H₂O₂, kao sekundarnog glasnika, za procese diferencijacije i razvoj testisa kod adolescentnih pacova (Peltola i sar., 1992). U poređenju sa jetrom, testisi pacova eksprimiraju podjednaku aktivnost SOD, ali samo 5% aktivnosti GSH-Px i 2% aktivnosti KAT u odnosu na iste kod jetre (Peltola i sar., 1992).

Najzastupljeniji antioksidativni enzim srca je SOD2 (70%), od toga čak 90% u kardiomiocitima, dok ostatak čini citosolna SOD1 i oko 1% SOD3 (Sawyer, 2011). Veoma važna uloga SOD2 u regulaciji oksidativnog stresa u miokardijumu, posebno tokom ranog postnatalnog razvoja se ogleda u činjenici da se miševi koji ne poseduju gen za MnSOD razvijaju normalno u materici, ali umiru ubrzo nakon rođenja usled dilatirane kardiomiopatije (Li i sar., 1995). Nasuprot, odsustvo SOD2 i SOD3 ne dovodi do smrtnog ishoda miševa, niti promena mišićnog tkiva srca (Carlsson i sar., 1995). Deficijencija selena, neophodnog za funkcionisanje GSH-Px, povezana je sa povećanim oksidativnim stresom, dok je smanjeni nivo selena primećen kod pacijenata sa srčanim oboljenjima i u korelaciji je sa težinom kliničke slike bolesti (de Lorgeril i sar., 2001).

Iako se smanjena aktivnost antioksidativnih enzima i posledična prekomerna količina ROS povezuju sa različitim patologijama, preterana aktivnost ovih enzima i posledično prekomerno smanjenje ROS mogu da imaju negativne posledice po homeostazu ćelija ako se uzme u obzir da određene ROS imaju važnu ulogu signalnih molekula regulišući pravilan rad organizma (Sawyer, 2011).

1.13.3. Biomarkeri depresije i depresiji-sličnih stanja

Odgovor na terapiju antidepresivima je relativno nizak, jer samo 40-60% pacijenata pozitivno odgovara na terapiju. Smatra se da je heterogenost oboljenja jedan od glavnih faktora za ovakav ishod zbog čega postoji velika potreba za što ranijom prevencijom, adekvatnom dijagnostikom i značajno efikasnijim i individualnijim tretmanom u lečenju. U kliničkoj praksi, od značaja bi bilo pronalaženje prognostičkih biomarkera koji bi omogućili adekvatnu klasifikaciju pacijenata na odgovarajuće podtipove oboljenja čime bi se povećale šanse za uspešnijim lečenjem (Gkesoglou, Bargiota, 2022). Periferni biomarkeri iz krvi, urina, pljuvačke, cerebrospinalne tečnosti ili dlake, su najpristupačniji, uzevši u obzir lakoću njihovog prikupljanja u svakodnevnoj kliničkoj praksi (Gkesoglou, Bargiota, 2022). Ovakvi markeri bi mogli ukazati na postojanje promena u nivou hormona stresa, kao i na

prisustvo inflamacije i/ili metaboličkih poremećaja kod osoba obolelih od različitih podtipova depresije, uzevši u obzir postojanje komorbiditeta depresije i hroničnih somatskih bolesti.

Glukoza predstavlja osnovni izvor energije u mozgu, usled čega smanjen nivo glukoze u plazmi (hipoglikemija) može dovesti do narušenog funkcionisanja mozga, dok povećan nivo glukoze (hiperglikemija), kao glavni klinički simptom dijabetesa, značajno povećava šanse za nastanak različitih makro- i mikrovaskularnih komplikacija (Sharabi i sar., 2015). Različite podtipove depresije karakteriše povećan ili smanjen apetit (Penninx i sar., 2013), koji za posledicu može imati izmenjen nivo šećera u krvi, a ovakvo stanje može značajno menjati funkcionalnu i emotivnu obradu podataka unutar moždanih struktura osetljivih na ovu promenu (amigdale, PFC, hipokampus, Drevets i sar., 2002, Li i sar., 2015). Smatra se da promene u metabolizmu glukoze, pored toga što mogu dovesti do nastanka različitih podtipova depresije, mogu promeniti odgovor depresivnih pacijenata na određene tretmane (Martin i sar., 2013).

Holesterol predstavlja važnu strukturnu komponentu ćelijskih membrana, gde utiče na fluidnost fosfolipidnog dvosloja i signalnu transdukciju, usled čega može uticati na neurotransmisiju u CNS-u. Brojna istraživanja su ukazala da je promena koncentracije holesterola u korelaciji sa različitim poremećajima raspoloženja pacijenata. Nizak nivo holesterola se povezuje sa depresivnim pacijentima, sklonim suicidu, dok je nekoliko studija ukazalo na hiperholesterolemiju kod anksioznih pacijenata, kao i onih koji ispoljavaju i depresivne i anksiozne oblike ponašanja. Smanjenje ukupnog holesterola u serumu direktno utiče na smanjenje nivoa serotonina (5HT) u mozgu (Papakostas i sar., 2004; Sun i sar., 2015), a hipo- i hiperholesterolemija utiču i na funkcijske karakteristike serotoninskog transportera (Scanlon i sar., 2001). Zanimljivo je napomenuti da je studija na adultima ukazala da i visoka i niska koncentracija lipoproteina male gustine (LDL-C) povećavaju rizik od depresije, što nije primećeno u studijama na deci i adolescentima. U ovoj starosnoj kategoriji, adolescenti sa različitim psihopatološkim stanjima pokazuju visok nivo triglicerida u odnosu na kontrole, dok je niska koncentracija holesterola povezana sa suicidalnom tendencijom (Engelberg, 1992). Novije studije ukazuju da hipertrigliceridemija, kao i izmenjen odnos triglicerida i lipoproteina visoke gustine (HLD) u krvi značajno povećavaju rizik za pojavu teže kliničke slike depresije kako kod odraslih (So i sar., 2021), tako i kod adolescenata (Khalfan i sar., 2023), što otvara pitanje korišćenja lipidnog profila kao potencijalnog biomarkera depresije (Walther i sar., 2018). Važnost veze između lipidnog statusa i depresije potvrđuje i studija koja pokazuje da se pacijentima obolelim od depresije vidno poboljšava stanje ukoliko pored antidepresiva koriste i statine za smanjivanje nivoa holesterola (Salagre i sar., 2016). Ipak, važno je napomenuti da su razlike u starosnoj dobi, pol i hormonski status pacijenata u korelaciji sa izmenjenim lipidnim statusom pacijenata i odgovarajućim dijagnostikovanim psihopatološkim stanjima.

Merenje ukupnih proteina u serumu, od kojih su najzastupljeniji albumin i globulini, koristi se u dijagnostici raznih bolesti jetre, bubrega i kostne srži, ali i metaboličkih i drugih poremećaja (Yin i sar., 2022). Nekoliko studija je ukazalo na vezu između poremećenog nivoa ukupnih proteina i psihijatrijskih poremećaja (Yin i sar., 2022). Koncentracija ukupnih proteina u serumu pacijenata sa depresijom značajno je niža u odnosu na zdrave kontrole, a smanjenje je u korelaciji sa težinom kliničke slike depresije (Maes i sar., 1995). Zanimljivo je da je jedna studija pokazala da psihosocijalni stres povećava koncentraciju ukupnih proteina u serumu, uključujući različite frakcije globulina, ali značajno smanjuje procenat serumskog albumina (Van Hunsel i sar., 1996). Albumin je najzastupljeniji protein u serumu koji ima važnu ulogu u održavanju osmotskog pritiska i transportu različitih endogenih i egzogenih liganda, ali i u stabilizaciji redoks potencijala (Song i sar., 2018). Različite studije su ukazale na vezu između nivoa albumina i depresije (Huang, 2002), a po nekim autorima nivo albumina odražava i status uhranjenosti depresivnih pacijenata (Wang i sar., 2012). Albumin predstavlja važni antioksidant plazme, a tretman antidepresivima može dovesti do povećanog nivoa antioksidanata, uključujući i albumin (Liu i sar., 2015).

Po originalnom konceptu Hansa Selyja (Selye, 1936) stres predstavlja nespecifični odgovor na stresore i dovodi do aktivacije HPA osovine, rezultujući oslobađanjem glukokortikoida u cirkulaciju. Povećan nivo kortikosterona i kortizola u serumu stresiranih životinja je široko prihvaćen neuroendokrini marker odgovora na stres. Međutim, kasnija istraživanja su ukazala da je reakcija

organizma na stres stres-specifična i da svaki tip stresora poseduje karakterističan signalni put, kao i mehanizam regulacije (Goldstein i sar., 1996). Usled toga, varijacije u aktivnosti HPA osovine, pa samim tim, i koncentraciji kortikosterona i kortizola u serumu zavise od same prirode stresora (Djordjević i sar., 2003), njegovog intenziteta, kao i vremena izlaganja (Retana-Márquez i sar., 2003). Prisustvo traume u ranom periodu razvoja može značajno da utiče na pojavu različitih psihopatologija, koje se mogu dovesti u vezu sa nepravilnim funkcionisanjem HPA osovine (Faravelli i sar., 2012).

1.14. Uticaj socijalne izolacije na potomstvo - transgeneracijski efekat

Malo je podataka u literaturi koji objašnjavaju funkcionisanje složenih mehanizama kojima polne ćelije roditeljske generacije prenose informacije o životnoj sredini, kao i na koji način se time povećava rizik za nastanak depresije i anksioznosti kod narednih generacija (Cunningham i sar., 2021). Za sada je poznato da na transgeneracijsku transmisiju, kako u adaptivnom, tako i maladaptivnom smislu, važnu ulogu ima tip stresora (socijalni/asocijalni), vreme njegovog delovanja, ali i pol, kako roditelja tako i potomaka (Hellmann i sar., 2019).

U kliničkim studijama baziranim na samoproceni sreće dece, negativne emocije i socijalne veštine u velikoj meri zavise od socijalnog statusa roditelja (Homel i sar., 1987; Allchin i sar., 2016). Moglo bi se pretpostaviti da potomstvo, čiji roditelji imaju jake socijalne odnose i veze, može steći adekvatne socijalne veštine od svojih roditelja, i obrnuto (Homel i sar., 1987). Ispitivanja na glodarima ukazuju da hronično izlaganje socijalnim stresorima parentalne generacije (tokom adolescencije i ranog adultnog perioda) može dovesti do pojave depresivnog i anksioznog fenotipa, koji se može preneti na njihovo potomstvo (Dietz i sar., 2011; Franklin i sar., 2011; Saavedra-Rodríguez, Feig, 2013). Novija literatura naglašava da je uticaj izloženosti majke stresu pre začeca od velike važnosti u proceni zdravlja potomstva i prepoznaje da je adolescencija kritičan period u pogledu razvoja i osetljivosti bioloških sistema uključenih u psihološko, fizičko i reproduktivno zdravlje (Keenan i sar., 2018). Izlaganje ženki hroničnom nepredvidivom stresu tokom adolescencije remeti njihovo materinsko ponašanje i utiče na metilacioni obzasc kroz generacije (Zaidan i sar., 2023). Malobrojne studije koje se bave posledicama izlaganja ženki socijalnom stresu tokom adolescencije, pre začeca, ukazuju na izmenjene kognitivne karakteristike potomstva u kasnoj adolescenciji/ranom adultnom periodu (Bove i sar., 2024). O ranom postnatalnom motornom razvoju potomstva majki izloženih socijalnom stresu tokom adolescencije nema podataka.

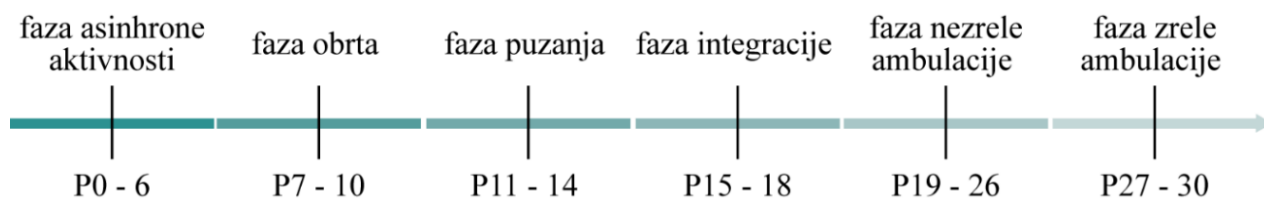
1.14.1. Rani motorni razvoj

Potomstvo adolescentnih roditelja podložno je zdravstvenim komplikacijama uključujući manju telesnu masu po rođenju i sporiji psihomotorni razvoj (National Research Council Panel on Adolescent, Childbearing, 1987). Procena motornog razvoja tokom ranog postnatalnog perioda se smatra jednim od najvažnijih pokazatelja normalnog rasta (Charitou i sar., 2010). Motorni razvoj je u interakciji sa razvojem u drugim domenima, kao što su kognicija i emocionalnost, i može biti solidan indikator za budući kognitivni razvoj. Poboljšanje motornih funkcija u ranom razvoju podstiče strukturnu i funkcijsku maturaciju nervnog sistema (Denckla, 2005).

Progresija od atipičnih pokreta do sposobnosti nezavisnog kretanja (engl. *ambulation*) se kod glodara postiže relativno brzo (za manje od 30 dana starosti, Shriner i sar., 2009). Na osnovu detaljne analize diskretnih pokreta, ontogenija pokreta mladih pacova se može organizovati u 6 različitih faza: faza asinhronne aktivnosti, faza obrta, faza puzanja, faza integracije, faza nezrele ambulacije i faza zrele ambulacije (Slika 1.9, Shriner i sar., 2009).

Prvu fazu asinhronne aktivnosti (P0-6) karakterišu nesinhronizovani pokreti prednjih i zadnjih ekstremiteta, tokom koje mladunci mogu odgovoriti na olfaktornu stimulaciju i orijentisati se ka stimulusu, ali se ne mogu kretati ka stimulusu, ukazujući da motivacija nije limitirajući faktor kretanja u ovoj fazi (Shriner i sar., 2009). U narednoj fazi (P7-10) pokreti su uglavnom bazirani na obrtanju (Shriner i sar., 2009). Ovu fazu karakteriše adukcija, primicanje prednjih ekstremiteta, kao i pasivnost zadnjih ekstremiteta.

Između P11-14 mladunci počinju da puze. Iako su osnovne motorne veštine prisutne u ovoj fazi kretanje je atipično u odnosu na adultni hod. *Najznačajnija transformacija do zrelog kretanja dešava se između P15-18, tokom faze integracije.* Iako su elementi osnovnog kvadripedalnog kretanja prisutni ubrzo po rođenju, sazrevanje nervnih centara, koji regulišu ritmičku aktivnost kretanja, zavisi od maturacije nishodnih i ushodnih neuronskih puteva, komisuralnih interneurona (Kiehn, 2006), kao i sazrevanja mišićno-skeletnog sistema. Senzomotorna maturacija počinje da dobija adultne vrednosti u ovoj fazi, ukazujući da propriospinalne i senzomotorne konekcije postaju funkcionalne (Shriner i sar., 2009).



Slika 1.9 Šest različitih faza u ontogeniji pokreta mladih pacova tokom razvoja (od P0 do P30). Modifikovano od Shriner i sar., 2009.

Pored koordinacije između udova, kontrola zadnjih ekstremiteta takođe dostiže adultnu vrednost tokom faze integracije, što je u skladu sa nestankom polineuronske inervacije prstiju i poboljšanim držanjem/nošenjem težine zadnjim ekstremitetima. Mladunci su još uvek spori pri kretanju, sa nedostatkom fluidnosti u kretanju, što se u velikoj meri menja u sledećoj fazi koja je označena kao faza nezrele ambulacije (P19-26). Ova faza je okarakterisana kao period hiperbrzine. Iako mladi pacovi pokazuju relativno slične pokrete kao i adultne jedinke, prilikom njihove izvedbe prave veći broj grešaka. Tokom faze zrele ambulacije (P27-30) pokreti u svim kategorijama dosežu asimptotu. Svako odstupanje u sazrevanju kvadripedalne motorike glodara od opisanog ukazuje na potencijalne probleme ili kašnjenja u sazrevanju moždanih struktura koje učestvuju u kontroli lokomotornih funkcija i senzomotornom učenju (Shriner i sar., 2009).

2. CILJEVI

Osnovni cilj istraživanja bio je da se okarakteriše biološki značaj socijalne pripadnosti vršnjačkoj grupi tokom perioda adolescencije, kroz detaljno ispitivanje efekta odsustva direktnih socijalnih kontakata na ponašanje, antioksidativni status perifernih organa, kao i sposobnost peripubertetskih pacova da odgovore na izlaganje dodatnom stresoru.

U svrhu realizacije osnovnog cilja, postavljeni su specifični ciljevi, da se kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije ispita:

- 1) psihomotorni i emocionalni odgovor na novu sredinu sa različitim anksiogenim potencijalom, radi procene razvoja ponašanja nalik anksioznom;
- 2) psihomotorni i neuronski odgovor na psihostimulativnu drogu sa nagrađujućim efektom D-amfetamin, radi procene stanja nalik atipičnoj depresiji;
- 3) preferenca rastvora saharoze u odnosu na vodu i količina pojedene hrane, radi procene konzumatorne hipohedonije i iregularnosti u ponašanju usmerenom ka cilju, najčešćih simptoma ponašanja nalik depresivnom u animalnim modelima;
- 4) socijalni odgovor na prisustvo živih jedinki ili socijalnih mirisa, radi procene motivisanog socijalnog ponašanja posredstvom indikatora socijalne orijentacije, socijabilnosti i socijalne memorije;
- 5) broj parvalbumin-pozitivnih neurona, osetljivih na socijalni stres u dorzalnom hipokampusu, moždanom regionu značajnom za mapiranje socijalnog prostora u fizičkom prostoru, kao i aktivacioni fenotip mikrogljivskih ćelija dentatnog girusa, radi procene neuroinflamacije;
- 6) odgovor na dodatni stresor prekonoćnog gladovanja, praćenjem telesne mase, koncentracije hormona stresa u krvi, aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u perifernim organima i eritrocitima, radi sagledavanja sistemskih efekata psihosocijalnog stresa i njegovog potencijala da izmeni odgovor organizma na nove stresore;
- 7) koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona radi potpunijeg sagledavanja sistemskih efekata psihosocijalnog stresa;

Zaseban specifičan cilj postavljen je radi ispitivanja psihofizičkih karakteristika potomstva roditeljske generacije koja je prošla period socijalne izolacije tokom peripuberteta, u cilju sagledavanja uticaja roditeljskog socijalnog iskustva na mentalno zdravlje potomstva.

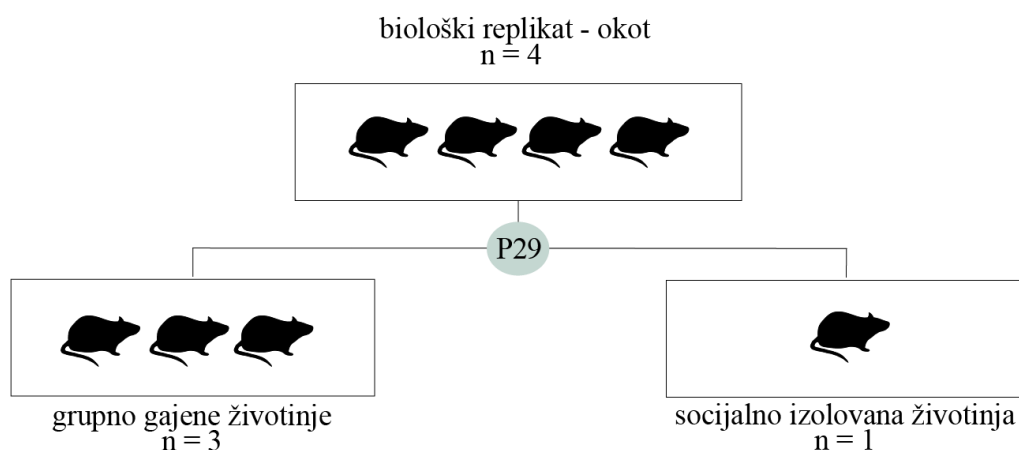
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Etička izjava

Sve procedure koje su podrazumevale korišćenje eksperimentalnih životinja su sprovedene u skladu sa EU Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i naučne svrhe i odobrene su od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” (01/01/2019), kao i Nacionalnog etičkog istraživačkog Komiteta (323-07-05339/2020-05). Uloženi su svi naponi kako bi se eksperimenti sprovedli na što manjem broju životinja, bez ugrožavanja kvaliteta dobijenih rezultata i kako bi se patnja eksperimentalnih životinja svela na minimum.

3.2. Eksperimentalne životinje i podela okota na eksperimentalne grupe

U eksperimentima su korišćeni mužjaci i ženke pacova *Wistar Han* soja, gajeni u vivarijumu Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”. Životinje su gajene u matičnim okotima do 21. postnatalnog (P) dana (P21), nakon čega je izvršeno odvajanje mladunaca od majke, po četiri mužjaka ili četiri ženke u zasebnim kavezima. Usled specifičnog dizajna eksperimenta u istraživanja su uključena samo legla koja su imala najmanje 4 jedinke istog pola, a koje su 29. postnatalnog dana (P29), dodatno podeljene u dve grupe: kontrolnu grupu životinja - koje će biti gajene po 3 u kavezu i životinje koje će dalje biti gajene u uslovima socijalne izolacije - 1 životinja po kavezu (Slika 3.1). Pacovi su u definisanim socijalnim uslovima gajeni tokom narednih 7 dana (P29-36, period rane adolescencije) ili 14 dana (P29-43, period rane i srednje adolescencije).



Slika 3.1 Šematski prikaz deljenja okota na eksperimentalne grupe. Princip korišćenja okota kao biološkog replikata primenjen je da bi isti okot podjednako doprineo različitim eksperimentalnim grupama, tj. kontrolnoj grupi (3 životinje po kavezu) i grupi čije su jedinke gajene u uslovima socijalne izolacije (1 životinja po kavezu).

Ovakav dizajn - broj okota kao biološki replikat (Lazic, Essioux, 2013), primenjen je sa ciljem da se stekne uvid u reakcije životinja iz istog okota na psihosocijalni stres. Kavezi u kojima su boravile životinje su bili naizmenično i gusto postavljeni jedan pored drugog tako da su izolovane životinje mogle da vide i čuju svoje vršnjake, ali ne i da ostvare direktan fizički kontakt sa njima. Eksperimentalne životinje su boravile u standardnim uslovima: dimenzije kaveza 425 x 265 x 180; temperatura: 23±1 °C; relativna vlažnost vazduha: 50±5%; svetlosni režim 12 h svetlost (paljenje svetla u 7:00 h)/12 h mrak (gašenje svetla u 19:00 h) i imale slobodan pristup hrani i vodi tokom trajanja eksperimenata, osim tokom perioda bihevioralnog testiranja.

Ispitivanje uticaja socijalne izolacije započinjano je P29 i to u trajanju od 7 ili 14 dana u periodu rane (P21-P34) i srednje (P34-P46) adolescencije, što je u korelaciji sa periodom rane (10-14 godina) i srednje (15-17 godina) adolescencije u humanoj populaciji (Braet i sar., 2013). Period u okviru koga su sprovedeni svi eksperimenti pripada periodu označenom kao

peripubertet/periadolescencija, što kod glodara podrazumeva 7-10 dana pre i nekoliko dana nakon puberteta koji se kod mužjaka *Wistar Han* pacova dešava u periodu $P41 \pm 1$ (Spear, Brake, 1983; Tzanoulinou i sar., 2014).

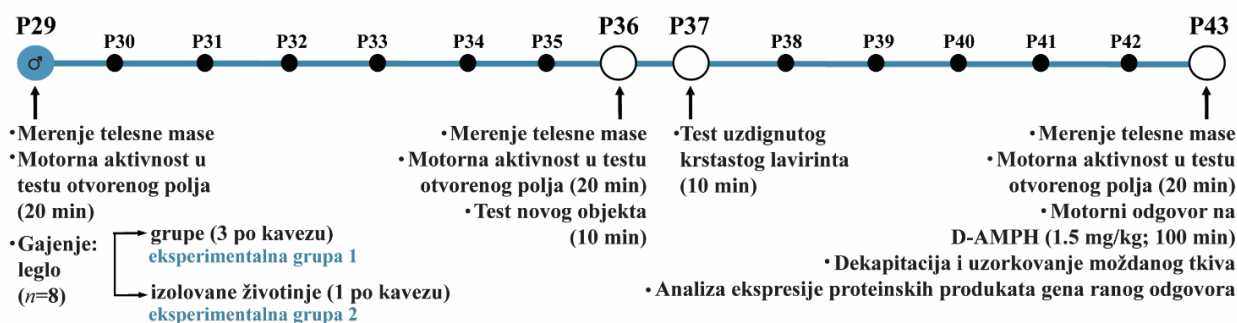
U cilju smanjenja broja životinja korišćenih u eksperimentalne svrhe poštovano je „3R pravilo” zaštite dobrobiti ogleđnih životinja (Russell, Burch, 1959) uključenih u eksperimentalni protokol, te su korišćene standardizovane ogleđne procedure i primenjene najpogodnije statističke metode za obradu rezultata ogleđa. Takođe, uzorkovan je materijal od istih ogleđnih životinja za veći broj različitih analiza, čime je ispoštovan *princip smanjenja* (engl. *reduction*). Iste životinje korišćene su za bihevioralne testove (test uzdignutog krstastog lavirinta, test prepoznavanja novog objekta i test otvorenog polja, kao i psihomotorni test na D-AMPH) i *Western Blot* analizu uzoraka tkiva, a druge životinje za bihevioralne testove (trokomorni test, test konzumatorne anhedonije) i rasplod. Jedino životinje korišćene za biohemijska istraživanja nisu prolazile bihevioralne testove kako bi se izbegao eventualni uticaj samog testiranja na različite biohemijske parametre od interesa. Međutim, tkiva ovih životinja iskorišćena su za različite analize (mozak za imunohistohemiju, periferna tkiva za analizu enzima oksidativnog stresa). *Princip usavršavanja* (engl. *refinement*) postignut je izvođenjem ogleđa na životinjama na način kojim se do najveće mere smanjuje patnja životinja (primenom principa „5 sloboda”) u meri u kojoj je model socijalne izolacije to dozvolio.

3.3. Eksperimentalna procedura

Detaljna eksperimentalna procedura je data na Slikama 3.2-3.5. Ukupno je korišćeno 50 okota čije je potomstvo gajeno po navedenom principu i koji su formirali ukupno 14 eksperimentalnih grupa. Rukovanje životinjama je uvek bilo obavljano od strane jednog eksperimentatora, na koga su životinje prethodno već bile naviknute.

Eksperiment 1 izveden je u svrhu realizacije 1. i 2. tematske celine navedene u ciljevima teze (psihomotorni i emocionalni odgovor na novu sredinu sa različitim anksiogenim potencijalom, psihomotorni i neuronski odgovor na psihostimulativnu drogu D-AMPH), korišćenjem 8 okota, tj. 16 mužjaka pacova (kontrolnih $n=8$ (eksperimentalna grupa 1) i socijalno izolovanih $n=8$ (eksperimentalna grupa 2)). Šematski prikaz eksperimentalne procedure dat je na Slici 3.2, eksperiment 1: nakon ispitivanja emocionalnih reakcija jedinki na novu sredinu sa različitim anksiogenim potencijalom (test uzdignutog krstastog lavirinta, test prepoznavanja novog objekta i test otvorenog polja) životinje su tretirane D-AMPH u dozi od 1,5 mg/kg (rastvoren u fiziološkom rastvoru), a potom su izolovani mozgovi za Western blot analizu. Analizirana su 2 moždana regiona - prefrontalna kora i strijatum.

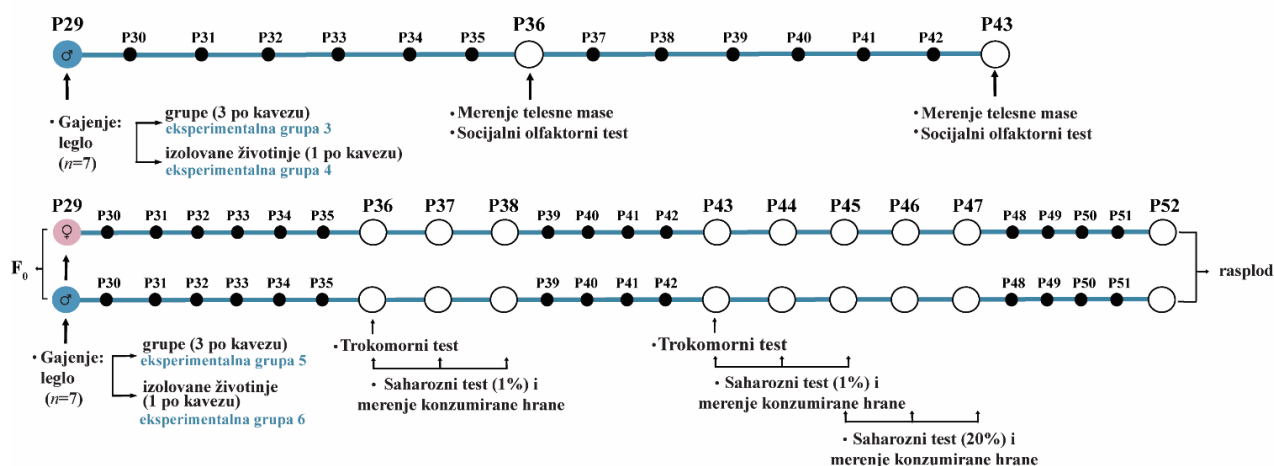
Eksperiment 1



Slika 3.2 Šematska prezentacija eksperimentalne procedure primenjene u okviru eksperimenta 1.

Ekperiment 2 izveden je u svrhu realizacije 3. i 4. tematske celine navedene u ciljevima teze (preferenca rastvora saharoze u odnosu na vodu i količina pojedene hrane, socijalni odgovor na prisustvo živih jedinki ili socijalnih mirisa), korišćenjem 7 okota, tj. 14 mužjaka pacova (kontrolnih $n=7$ (eksperimentalna grupa 3) i socijalno izolovanih $n=7$ (eksperimentalna grupa 4) za ispitivanje socijalnog ponašanja i nakon toga konzumatorne hipohedonije, kao i 8 zasebnih okota, tj. 16 životinja (kontrolnih $n=8$ (eksperimentalna grupa 5) i socijalno izolovanih $n=8$ (eksperimentalna grupa 6)) za ispitivanje reakcije na socijalne mirise. Šematski prikaz eksperimentalne procedure dat je na Slici 3.3, eksperiment 2, a iste životinje korišćene su za ukrštanje sa kontrolnim i izolovanim ženjkama ($n=34$), predstavljajući parentalnu (F_0) generaciju koja će dati potomstvo za realizaciju zasebnog specifičnog cilja teze.

Ekperiment 2

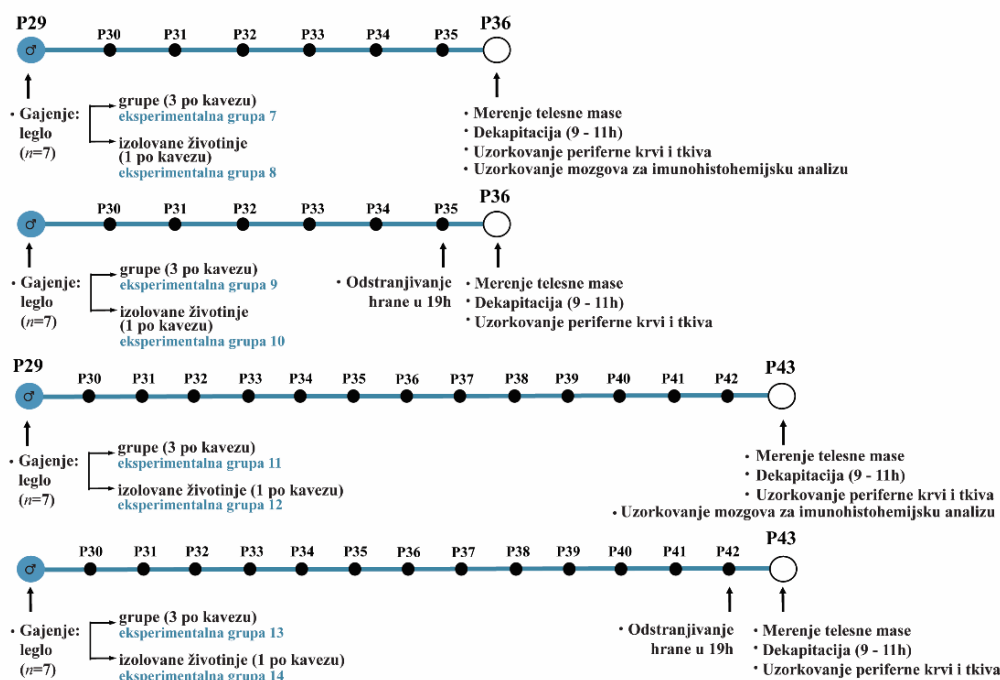


Slika 3.3 Šematska prezentacija eksperimentalne procedure primenjene u okviru eksperimenta 2.

Ekperiment 3 i 4 izveden je u svrhu realizacije 5., 6. i 7. tematske celine navedene u ciljevima teze (broj parvalbumin-pozitivnih interneurona u dorzalnem hipokampusu i aktivacioni fenotip mikrogljijskih ćelija DG, odgovor na dodatni stresor prekonocnog gladovanja, praćenjem telesne mase, ispitivanjem koncentracije hormona stresa u krvi kao i aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u perifernim organima i eritrocitima, koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona). Korišćeno je 14 okota, od kojih 7 za ispitivanje posledica gajenja u različitim socijalnim uslovima tokom nedelju dana (kontrolnih $n=7$ (eksperimentalna grupa 7) i socijalno izolovanih $n=7$ (eksperimentalna grupa 8)) i 7 za ispitivanje efekta dodatnog izlaganja izolovanih životinja stresu prekonocnog gladovanja (kontrolnih $n=7$ (eksperimentalna grupa 9) i socijalno izolovanih $n=7$ (eksperimentalna grupa 10)), kao i 14 zasebnih okota, od kojih 7 za ispitivanje posledica gajenja u različitim socijalnim uslovima tokom dve nedelje (kontrolnih $n=7$ (eksperimentalna grupa 11) i socijalno izolovanih $n=7$ (eksperimentalna grupa 12)) i 7 za ispitivanje efekta dodatnog izlaganja izolovanih životinja stresu prekonocnog gladovanja (kontrolnih $n=7$ (eksperimentalna grupa 13) i socijalno izolovanih $n=7$ (eksperimentalna grupa 14)). Šematski prikaz eksperimentalne procedure dat je na Slici 3.4, eksperiment 3 i 4. Nakon gajenja u definisanim socijalnim uslovima u trajanju od jedne ili dve nedelje životinje su žrtvovane, nakon ili bez prekonocnog gladovanja i uzorkovano je tkivo od interesa za studiju (mozak, jetra, srce, bubreg, testisi i krv). Uzimajući u obzir činjenicu da uklanjanje pojedinačnih jedinki iz kaveza izaziva akutni stresni odgovor kod jedinki koje ostaju u redukovanoj grupi (Burman i sar., 2008, Takao i sar., 2016), a koji se ogleda u povećanju nivoa kortikosterona u krvi nekoliko minuta nakon smanjenja socijalne gustine (Ferland, Schrader, 2011), za analizu nivoa hormona stresa u krvi korišćena je jedna jedinka po okotu (tako da je ukupan broj jedinki po eksperimentalnoj grupi za analizu hormona stresa, glukoze i telesne mase $n=7$). Za analizu aktivnosti enzima antioksidativne zaštite korišćene su do dve jedinke po okotu/eksperimentalnoj grupi (tako da je ukupan broj jedinki po eksperimentalnoj grupi

za ove analize $n=8-9$), uzimajući u obzir činjenicu da period između žrtvovanja dve jedinke nije prelazio 15 minuta i da ne postoje literaturni podaci koji impliciraju da povećani nivo kortikosterona u ovako kratkom vremenskom periodu ima trenutne efekte na aktivnost enzima antioksidativne zaštite. Izolovani mozgovi grupno gajenih i socijalno izolovanih životinja koje nisu gladovale

Eksperimenti 3 i 4

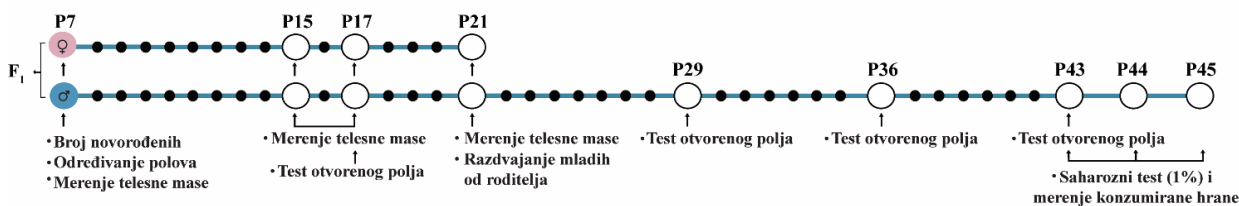


Slika 3.4 Šematska prezentacija eksperimentalne procedure primenjene u okviru eksperimenata 3 i 4.

korišćeni su za imunohistohemijska bojenja i analizu parvalbumin-pozitivnih interneurona u dorzalnom hipokampusu i aktivacioni fenotip mikrogljijskih ćelija dentatnog girusa.

Eksperiment 5 izveden je u svrhu realizacije zasebno postavljenog specifičnog cilja (psihofizičke karakteristike potomstva roditeljske generacije koja je prošla period socijalne izolacije tokom peripuberteta) na potomstvu ($n=96$) jedinke koje su korišćene za procenu preference rastvora saharoze. Šematski prikaz eksperimentalne procedure dat je na Slici 3.5, eksperiment 5. Potomstvu su mereni: telesna masa na svakih 7 dana počev od P7, odstupanja od tipičnog perioda kada se otvaraju oči (P15), rana kvadripedalna motorika u testu otvorenog polja (P17). Nakon odvajanja od majke (P21) praćeno je samo potomstvo muškog pola i to merenjem ponašanja primenom testa otvorenog polja P29, sledstveno gajenje u kontrolnim uslovima ili izolaciji u trajanju od 14 dana (čime su bili podvrgavani istom psihosocijalnom stresu kojem je bila izložena i roditeljska generacija), nakon čega je ponovo mereno ponašanje primenom testa otvorenog polja (P29, P36 i P43) i konzumatorne hipohedonije (P43).

Eksperiment 5



Slika 3.5 Šematska prezentacija eksperimentalne procedure primenjene u okviru eksperimenta 5.

3.4 Testovi za praćenje ponašanja eksperimentalnih životinja

Svi bihevioralni testovi su sprovedeni između 9:00 i 15:00 h, u posebno opremljenoj eksperimentalnoj sobi. Pre svakog testiranja, životinje su habituirane na sobu za testiranje najmanje 30 minuta. Kako bi uslovi testiranja bili ujednačeni, u situacijama gde je bilo moguće (test otvorenog polja, test prepoznavanja novog objekta i olfaktorni test) istovremeno su testirane kontrolna i socijalno izolovana životinja. Takođe, kontrolne i socijalno izolovane životinje su testirane uvek u istom danu (test uzdignutog krstastog lavirinta, trokomorni test). Između svakog testiranja jednog seta životinja, aparatura za testiranje je detaljno brisana (najpre uklanjanjem mehaničkih nečistoća, potom vodom, 20% alkoholom, ponovo vodom i suvim ubrusom), kako bi se odstranili mirisni tragovi prethodno testiranih životinja, a koji bi mogli kompromitovati rezultate narednog testiranja.

3.4.1. Test otvorenog polja

Test otvorenog polja služi za ispitivanje spontane motorne aktivnosti životinja i ljudi u odgovoru na novu sredinu i evaluaciju emocionalnosti (Seibenhener, Wooten, 2015; Gromer i sar., 2021). Test se bazira na izlaganju životinje nepoznatoj otvorenoj areni iz koje ne može da pobegne. Parametri od interesa mereni u ovom testu bili su: lokomotorna (pređeni put unutar arene u centimetrima) i vertikalna aktivnost (broj uspinjanja), kao parametri istraživačkog (eksploratornog) ponašanja, stereotipni pokreti (repetitivni oblici ponašanja) koji predstavljaju neeksploratornu aktivnost, kao i broj ulaza i vreme provedeno u centralnom polju arene, kao indikatori emocionalnog stanja ispitivane jedinke.

Lokomotorna aktivnost predstavlja ponašanje koje podrazumeva prikupljanje informacija iz sredine, radi smanjenja nepredvidivosti (Inglis i sar., 2001), pronalaženja potencijalne opasnosti i izlaza iz zatvorene arene (Exner, Clark, 1993), te kao takav jeste parametar istraživačkog ponašanja. Kod glodara, povećana lokomotorna aktivnost može biti posledica prisustva povećanog stanja uzbuđenja ili motivacije za istraživanjem novine. Sa druge strane, smanjena lokomotorna aktivnost može biti posledica smanjene motivacije za istraživanjem ili povećane anksioznosti u odgovoru na novinu (Potrebić i sar., 2022b). Ranija istraživanja su ukazala da lokomotorna aktivnost ne može biti pouzdan indikator emocionalnosti, s obzirom da i hipo- i hiperlokomocija mogu odražavati emotivno stanje (Archer, 1973; Gentsch i sar., 1981). Usled toga, kao dodatni parametar od interesa u ovoj studiji je analizirano vreme provedeno u centralnom polju, kao i broj ulaza u centralno polje, s obzirom da se izbegavanje centralnog polja (odnosno preferiranje perifernih delova arene - tigmotaksis) smatra pouzdanim indikatorom emocionalnosti kod pacova (Sanberg i sar., 1987; Verma i sar., 2010; Cameron i sar., 2018). Pacovi koji ispoljavaju ponašanje nalik anksioznom uglavnom izbegavaju centralni deo arene i više vremena provode po njenim perifernim delovima.

Vertikalna (eksploratorna) aktivnost unutar test arene se ispoljava u vidu uspinjanja i predstavlja nivo zainteresovanosti životinje za novi prostor (Lever i sar., 2006). Ovakav vid ponašanja proističe iz potrebe životinje da smanji nepredvidivost unutar nove sredine (Inglis i sar., 2001) i može biti indikator njenog pozitivnog emocionalnog stanja (Boissy i sar., 2007).

Stereotipni oblici ponašanja predstavljaju repetitivne, odnosno ponavljajuće oblike ponašanja, poput intenzivnog čišćenja/umivanja i ograničenih pokreta. Ovakvi oblici ponašanja su deo normalnog ponašajnog repertoara glodara, ali se njihovo intenziviranje smatra indikatorom lošeg emocionalnog stanja (Garner, 2005).

Očekuje se da eksperimentalni glodari smanje intenzitet motorne aktivnosti tokom vremena koje provode u test areni, što ukazuje da se testirana životinja upoznala sa novim prostorom i da je on izgubio elemente novine. Prilagođavanje na novu arenu tokom jedne test sesije označava se kao intrasesijska habituacija (engl. *intra-session habituation*) i predstavlja odraz učenja (Leussis, Bolivar, 2006). Prethodna istraživanja naše grupe su pokazala da je period od 20 minuta upoznavanja sa novom arenom peripubertetskim pacovima dovoljan da iskažu intrasesijsku habituaciju kao meru prilagođavanja na novi prostor (Pavkovic i sar., 2018).

Aparatura. Motorna aktivnost testiranih životinja je merena pomoću Opto-Varimex kaveza (Columbus Instruments, SAD), povezanih sa Auto-Track sistemom (version 3.0 A, Columbus Instruments). Aparatura za testiranje se nalazi u zvučno izolovanoj Laboratoriji za ponašanje sa optimalnim intenzitetom svetlosti (indirektnim i homogenim osvetljenjem, 100 lx u centru arene). Svaki kavez (44,2×43,2×20 cm) je opremljen sa 15 infracrvenih emitera pozicioniranih na x i y osi, kao i jednakim brojem prijelnika na odgovarajućoj suprotnoj strani. Podaci su analizirani pomoću Auto-Track softvera, koji sakuplja podatke iz Opto-Varimex jedinica na svakih 1/10 sekundi i kategoriše aktivnost. Ukupno može detektovati jedanaest parametara ponašanja, od kojih su u ovoj studiji analizirani: lokomotorna, stereotipna i vertikalna aktivnost. Auto-Track detektuje pokrete u okviru 16 (4×4) zamišljenih kvadrata arene, kao i broj ulazaka i vreme provedeno u svakom kvadratu pojedinačno. Na taj način je moguće izračunati broj ulazaka i vreme provedeno u centralnoj zoni arene (četiri kvadrata koja se nalaze u sredini arene), dok ostalih 12 predstavlja njen periferni deo.

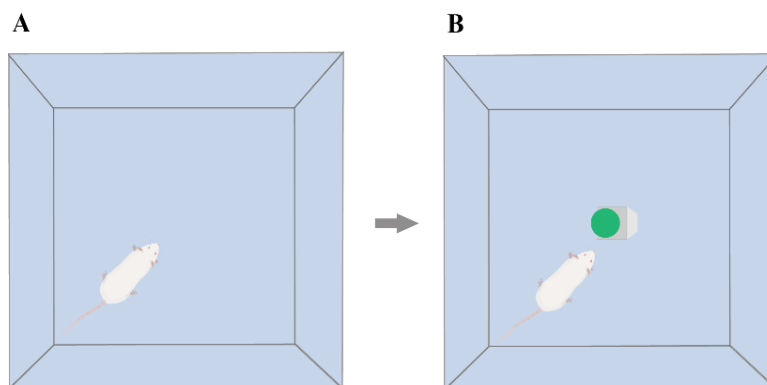
Eksperimentalna procedura. Mužjacima je P29, pre nasumičnog razdvajanja u kontrolne i socijalno izolovane grupe, mereno ponašanje primenom Testa otvorenog polja, kako bi se potvrdilo da kod životinja koje će ući u eksperimentalnu proceduru ne postoje razlike u osnovnim motoričkim parametrima (lokomotorna, vertikalna, stereotipna aktivnost) i indikatorima emocionalnog stanja (broj ulaza i vreme provedeno u centralom polju) u odgovoru na novu sredinu. Test otvorenog polja je ponavljan 7 dana nakon razdvajanja (P36), a nakon njega primenjivan je test novog objekta. Životinje su prvo habituirane na prostor sobe za testiranje u trajanju od 30 minuta, a zatim je svaka životinja je postavljena u centar arene odakle je mogla slobodno da se kreće i istražuje novu sredinu u trajanju od 20 minuta. Kako je već rečeno, prethodna istraživanja naše grupe su ukazala da interes mladih životinja unutar arene značajno opada nakon ovog perioda (Pavkovic i sar., 2018). Vremenski profil aktivnosti utvrđivan je na osnovu vrednosti očitavanih na svakih 5 minuta. Test otvorenog polja rađen je i na juvenilnim pacovima F₁ generacije, čiji su roditelji bili ili grupno gajeni ili socijalno izovani (F₀ generacija). Prvo testiranje na životinjama muškog i ženskog pola rađeno je P17, što predstavlja rani period sazrevanja kvadripedalne motorike kod glodara (Shriner i sar., 2009). Nakon odvajanja mladunaca od majke (P21) muško potomstvo je testirano ponovo P29 (inicijalno testiranje), P36 (nakon 7 dana gajenja u uslovima grupe ili izolacije) i P43 (nakon 14 dana gajenja u uslovima grupe ili izolacije), čime su podvrgavani istom psihosocijalnom stresu kojem je bila izložena i roditeljska generacija.

3.4.2. Test novog objekta

Test novog objekta podrazumeva istraživanje novog objekta u sredini na koju je životinja prethodno habituirana. Izlaganje životinja novini dovodi do stvaranja konflikta između motivacije za prilazanjem i potrebe za izbegavanjem potencijalne opasnosti, te habituacija na prostor testiranja značajno suprimira ponašanje koje podrazumeva izbegavanje i podstiče ponašanje koje podrazumeva povećano istraživanje (Powell i sar., 2004). Studije ukazuju da glodari pokazuju preferencu ka novoj sredini, kao i povećano istraživanje novih elemenata unutar date sredine (Berlyne, 1960). Istraživanje novina u prostoru, koji je životinja prethodno percipirala kao bezbedan, fundamentalno se razlikuje od istraživanja potpuno nove sredine i smatra se da predstavlja pre anksioznu osobinu (engl. *trait anxiety*) nego anksiozno stanje (engl. *state anxiety*) (Griebel i sar., 1993). Anksiozno stanje predstavlja privremeno emocionalno stanje, čije se prisustvo može javiti u samo pojedinim situacijama, dok anksiozna osobina predstavlja stalno ispoljavanje ponašanja nalik anksioznom (Spielberger, 2013).

Parametri od interesa mereni u ovom testu bili su: broj prilaza objektu (broj kratkih (<2 sekunde) i broj dužih (>2 sekunde)), dužina istraživanja objekta (kratka istraživanja <2 sekunde i duža istraživanja >2 sekunde) i latenca prilaska novom objektu. Smatra se da životinje koje pokazuju ponašanje slično anksioznom imaju dužu latencu prilaska novom objektu, kao i da manji broj puta prilaze objektu i manje vremena provode istražujući ga.

Aparatura. Test novog objekta je sproveden u istim eksperimentalnim kavezima u kojima je rađen test otvorenog polja (Slika 3.6A i B), čime je omogućeno upoređivanje podataka dobijenih iz ova dva testa i otklanjanje mogućeg uticaja različitih dimenzija test arene na ponašanje eksperimentalnih životinja.



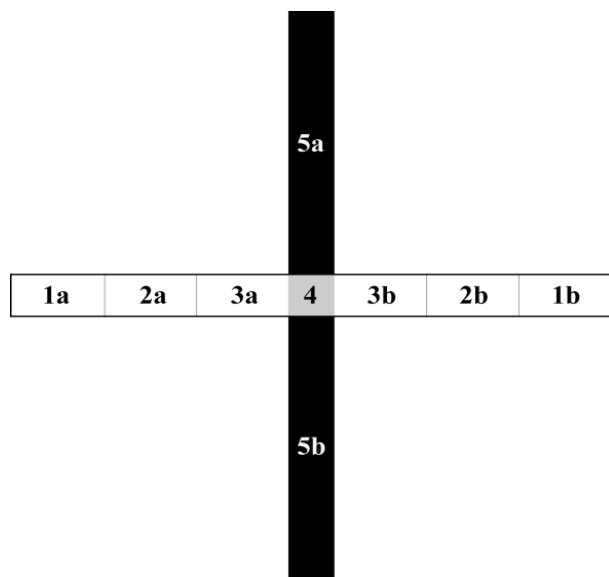
Slika 3.6 Test novog objekta. (A) Habitucija na praznu arenu (vreme istraživanja – 20 minuta). (B) Novi objekat (vreme istraživanja – 10 minuta).

Eksperimentalna procedura. U P36 životinje su, nakon prilagođavanja na prostoriju u kojoj se vrši testiranje u trajanju od najmanje 30 minuta, habituirane na otvorenu arenu u periodu od 20 minuta (3.4.1. Test otvorenog polja), da bi nakon toga bile podvrgavane testu novog objekta. Preciznije, nakon habitucije od 20 minuta (Slika 3.6A), životinje su na kratko vraćane u svoje kaveze, a u centralni deo otvorenog polja je postavljan novi objekat, flašica sa poklopcem (5×5 u osnovi, visine 10 cm), napunjena peskom kako je testirane životinje ne bi mogle pomerati ili obarati. Veličina i oblik ovakvog objekta isključili su mogućnost sedenja i stajanja testiranih životinja na objektima. Potom su životinje iz svojih kaveza postavljane u gornji levi ćošak test arene i testirane dodatnih 10 minuta (Slika 3.6B). Ponašanje životinja u testu novog objekta beleženo je kamerom, a naknadna analiza video-zapisa je rađena bez uvida u pripadnost snimane životinje eksperimentalnoj grupi. Istraživanjem objekta smatrano je ponašanje pri kome je testirana životinja njuškom dotakla predmet ili ako je njuška životinje upravljena direktno ka predmetu na udaljenosti ≤ 2 centimetra. Vreme trajanja testa novog objekta iznosilo je 10 minuta, a vremenski profil aktivnosti utvrđen je na osnovu vrednosti očitanih na prvih i drugih 5 minuta.

3.4.3. Test uzdignutog krstastog (plus) lavirinta

Test uzdignutog krstastog lavirinta (engl. *Elevated plus maze*; Slika 3.7) je baziran na prirodnom konfliktu između potrebe za istraživanjem nove sredine i straha od novih, otvorenih i uzdignutih površina, i primenjuje se za procenu prisustva ponašanja nalik anksioznom kod životinja, kao i kod ljudi (Montgomery, 1955; Biedermann i sar., 2017). Istraživanja koja ispituju da li novina, visina ili otvoreni prostor aparata izazivaju anksioznost kod testiranih životinja ukazuju da je otvoreni prostor, pre nego visina i novina, stimulus koji izaziva ponašanje nalik anksioznom prilikom testiranja (Treit i sar., 1993). Smatra se da duže vreme boravka u otvorenim kracima, kao i veći broj ulaza u otvorene krake predstavlja odraz ponašanja nalik anksioznom. Takođe, ovaj test može dati podatak i o opštoj lokomotornoj aktivnosti životinja u visoko anksioznoj sredini, koja se izražava kroz broj ulaza u zatvorene krake (Rodgers i sar., 1999). Očekuje se da zdrava jedinka prirodno izbegava otvoreni krak i da njegovu procenu intenzivno izvrši u prvim minutima testiranja (Rodgers i sar., 1999). Izvirivanje životinja iz zatvorenih kraka interpretira se kao procena rizika (engl. *risk assessment*). Najanksiogenijim delom aparata smatra se najdistalniji deo otvorenog kraka u poređenju sa njegove prve dve trećine (Rodgers i sar., 1999; Biedermann i sar., 2017). U skladu sa navedenim značenjima parametara koje test pruža, intervencijama sa anksiolitičkim efektom smatraju se one koje

povećavaju broj ulaza i vreme provedeno u otvorenim kracima aparata, dok se aksiogenim tretmanima smatraju oni koji smanjuju broj ulaza i vreme provedeno u otvorenim kracima aparata (Pellow i sar., 1985; Lister, 1987).



Slika 3.7 Test uzdignutog krstastog lavirinta. Šematski prikaz polja od interesa korišćenih u cilju računanja vremena koje životinja provodi tokom testiranja u uzdignutom krstastom lavirintu: najdistalnija trećina otvorenog kraka (1a+1b), proksimalne 2/3 otvorenog kraka (2a+2b+3a+3b), centralna zona (4) i zatvoreni kraci (5a+5b).

otvorene krake, broj ulaza u zatvorene krake, vreme provedeno u otvorenim kracima, vreme provedeno u zatvorenim kracima, vreme provedeno u centralnoj zoni, kao i vreme provedeno u *izvirivanju/protezanju* (iz zatvorenih u otvorene delove lavirinta). Vreme provedeno u određenoj zoni je računato kada je životinja sa sve 4 šape bila u definisanoj zoni.

3.4.4. Bazalna motorna aktivnost i motorni odgovor na D-amfetamin

D-amfetamin predstavlja psihostimulativnu drogu koja dovodi do oslobađanja i sprečavanja ponovnog preuzimanja dopamina u neurone mezokortikolimbickog sistema (Sulzer i sar., 2005). Kod glodara dovodi do dozna zavisnih promena u ponašanju, pri čemu doze od 1-2 mg/kg stimulišu lokomotornu aktivnost (Porrino i sar., 1984; Sharp i sar., 1987; Yates i sar., 2007), kao meru bezuslovnog odgovora na nagrađujući efekat droge (Wise, Bozarth, 1987), dok veće doze intenziviraju stereotipnu aktivnost (Kuczenski, Segal, 1989).

Imajući u vidu navedene činjenice, u ovoj studiji ispitivan je lokomotorni odgovor eksperimentalnih jedinki na D-AMPH, radi procene stanja njihovog sistema za nagrađivanje. Doza od 1,5 mg/kg D-AMPH je korišćena imajući u vidu podatke iz literature da doze od 1-1,75 mg/kg dominantno deluju na dopaminski sistem, dok doze veće od 1,75 mg/kg povećavaju oslobađanje serotonina i acetilholina (Kuczenski, Segal, 1989; Florin i sar., 1992). Treba napomenuti da naša laboratorija ima višegodišnje iskustvo u eksperimentalnom radu sa ovom dozom D-AMPH u svrhu ispitivanja posledica delovanja različitih sredinskih faktora na ponašanje eksperimentalnih glodara, kao što su niskofrekventno magnetno polje (Pesić i sar., 2004), restriktivni unos hrane (Marinković i sar., 2007; Pesić i sar., 2010) i anestetik propofol (Pavković i sar., 2017).

Korišćenjem iste procedure i opreme kao i u testu otvorenog polja, životinje su u P43 najpre habituirane na eksperimentalnu arenu u trajanju od 20 minuta (vremenski profil aktivnosti je

Aparatura. Test uzdignutog krstastog lavirinta (Slika 3.7) obavlja se korišćenjem aparata od pleksiglasa (ovaj materijal omogućava lako održavanje jer ne zadržava/upija mirise fizioloških izlučevina) u obliku znaka plus, koji se sastoji od dva nasuprot pozicionirana zatvorena kraka ograđena zidom crne boje (50×10×45cm), dva nasuprot pozicionirana otvorena kraka (50×10 cm) i centralnog polja (10×10 cm). Kraci su postavljeni na visini od 55 cm od postolja aparata.

Eksperimentalna procedura. Iste životinje koje su podvrgavane testu otvorene arene i testu novog objekta (P36), narednog dana (P37) su prolazile test uzdignutog krstastog lavirinta. Svaka životinja je pojedinačno testirana, tako što je postavljana na kraj otvorenog kraka i ostavljena da slobodno istražuje lavirint narednih 10 minuta. Aktivnost svake životinje je snimana kamerom, radi naknadne analize snimaka bez uvida u pripadnost snimane životinje eksperimentalnoj grupi.

Parametri od interesa mereni u ovom testu bili su: latenca ulaska u zatvoreni krak (*transfer latenca*), vreme provedeno u prve dve trećine otvorenih krakova, vreme provedeno u najdistalnijoj trećini otvorenih kraka, broj ulaza u

analiziran za prvih i drugih 10 minuta), a potom im je injeciran D-AMPH i vraćane su u test arenu gde im je merena motorna aktivnost u narednih 100 minuta. D-AMPH sulfat (Sigma-ALDRICH, Chemie, Nemačka) je korišćen u dozi 1,5 mg/kg suve supstance razblaživane u 0,9% NaCl, odnosno u razmeri 1,5 mg/mL (apliciranom kao 1 mL/kg). Rezultati su očitavani za desetominutne periode i dodatno predstavljeni za duže vremenske intervale (prvih i drugih 50 minuta). Parametri od interesa praćeni tokom habituacije i nakon tretmana bili su: lokomotorna aktivnost (pređeni put u centimetrima), stereotipni pokreti (repetitivni oblici ponašanja) i vertikalna aktivnost (broj uspinjanja). S obzirom da je utvrđeno da manje i srednje doze ovog psihostimulansa dovode do povećane lokomotorne i vertikalne aktivnosti, drugačiji odgovor životinja na D-AMPH kao farmakološki stimulus sa nagrađujućim efektom bi ukazao na izmenjeno funkcionisanje sistema uključenih u obradu nagrađujućih stimulusa.

3.4.5. Trokomorni test

Trokomorni test (Slika 3.8) je korišćen radi procene socijalnog ponašanja mladih pacova uzevši u obzir da izmenjeni oblici ovakvog ponašanja, poput narušene ili redukovane interakcije sa socijalnim stimulusom, predstavljaju važne markere različitih psihijatrijskih oboljenja (Templer i sar., 2018).

U ovom testu se jasno izdvajaju tri faze testiranja: faza habituacije, faza socijabilnosti i faza preference socijalne novine. Međutim, iako se zna da prema teoriji socijalne motivacije socijalno ponašanje kod ljudi (Chevallier i sar., 2012) i kod glodara (Templer i sar., 2018) podrazumeva apetitivni i konzumatorni odgovor (tj. želju i svidanje) u literaturi ne postoji jasno razdvajanje ovih komponenti. Zbog toga je u ovoj studiji posebna pažnja stavljena na analizu apetitivnog i konzumatornog ponašanja (parametri ponašanja detaljno opisani u tekstu koji sledi) u fazama koje slede nakon habituacije na prostor Trokomornog aparata. Takođe, posebna pažnja je stavljena i na preferencu socijalnog u fizičkom prostoru, odnosno socijalnu orijentaciju, kako u fazi socijabilnosti, tako i u fazi preference socijalne novine. U literaturi se socijalna orijentacija često izjednačava sa socijabilnošću u užem smislu, odnosno, direktnom interakcijom sa socijalnim stimulusom. Razdvajanje ovih aktivnosti je prepoznato kao značajno za razumevanje socijalnog prilagođavanja (Jorgensen, Nelson, 2018), s obzirom da jedinka prvo mora da poseti socijalni prostor, pa tek onda, u zavisnosti od motivacije, direktno intereaguje sa drugom jedinkom.

Aparatura. Trokomorni sistem (engl. *Three chamber test*) je konstruisan (*Elunit*, Beograd, Srbija) po uzoru na *Ugo Basile Sociability Cage for rats* u dimenzijama 120x40x40 cm. Komore aparata (40x40 cm) su međusobno odvojene plastičnim pregradama sa centralno postavljenim vratima otvorenim ka centralnoj komori. Dodatni deo aparata čine metalni kavezi cilindričnog oblika (25x15 cm, sa rešetkama dijametra 3 mm i razmakom od 7 mm), u koje se shodno zahtevima eksperimenta stavlja životinja-mamac. Manji rešetkasti kavezi omogućavaju približavanje životinje koja se testira životinji koja služi kao mamac bez kompletnog telesnog kontakta (kontakt je moguć samo njuškom i šapicama).

Eksperimentalna procedura. Eksperimentalne životinje su 7. i 14. dana eksperimenta testirane u trokomornom sistemu. Testiranje životinja je rađeno prema publikovanoj proceduri (Templer i sar., 2018) sa manjim modifikacijama *faze habituacije* (Slika 3.8). Tokom ove faze testirana životinja je postavljena u centralni deo aparata, odakle je puštana da slobodno istražuje prazan aparat u periodu od 10 minuta, nakon čega je vraćana u svoj kavez. Vrata leve i desne komore su bila otvorena, kako bi se životinja u potpunosti upoznala sa datom novom sredinom (Zanos i sar., 2014). Tokom ove faze aparat je bio u potpunosti prazan, bez prisustva drugih životinja i rešetkastih kaveza. Nakon ove faze, u bočne komore aparata su postavljani rešetkasti kavezi, pri čemu je u jedan kavez postavljena nepoznata životinja iste starosti i pola (nova jedinka 1, engl. *novel conspecific 1*, N1), dok je drugi kavez ostavljan prazan (prazan kavez/objekat, O). Nakon ove postavke testirana životinja je ponovno postavljena u centralni deo aparata i ostavljena da slobodno istražuje trokomorni sistem narednih 10 minuta. Ova faza testiranja predstavlja *fazu socijabilnosti* (Slika 3.8). Nakon ove faze, testirana životinja je ponovo vraćana u svoj matični kavez, a u rešetkasti kavez koji je u *fazi*

socijalnosti bio prazan stavljana nova nepoznata životinja iste starosti i pola (nova jedinka 2, engl. *novel conspecific* 2, N2), dok je u drugom rešetkastom kavezu ostajala jedinka 1 iz prethodne faze, kao socijalno poznata životinja. Testirana životinja je nakon nove postavke stavljana ponovo u centralni deo aparata i ostavljena za slobodno istraživanje narednih 10 minuta. Ova faza testiranja je označena kao *faza preference socijalne novine* (Slika 3.8). Nakon ove faze, sve životinje su vraćane u svoje matične kaveze, prema unapred definisanom načinu gajenja.

Ponašajni odgovor testirane životinje u trokomornom testu je sniman kamerom, kako bi kasnije bio detaljno analiziran. U obzir su uzeti sledeći parametri: broj ulaza (kao odraz motivacije da se posećuje određeni prostor) i vreme istraživanja (kao odraz konzumatorne zainteresovanosti ka određenom prostoru) u komorama/odeljcima, broj prilaza i vreme provedeno sa N1 u odnosu na broj prilaza i vreme provedeno sa praznim kavezom/objektom (kako bi se procenili „želja” za direktnim druženjem sa srodnikom i „sviđanje” druženja, kao dva različita indikatora socijalnosti), broj prilaza i vreme provedeno sa N2 u odnosu na broj prilaza i vreme provedeno sa N1 (kako bi se procenili „želja” za socijalnom novinom i „sviđanje” iste, kao dva različita indikatora preference socijalne novine). Istraživanje novih pacova i objekta je uzimano u obzir kada distanca između njuške testirane životinje i životinja/objekta nije bila veća od 2 cm. Životinje koje tokom *faze socijalnosti* nisu prilazile N1 ili objektu nisu uzimane u obzir za dalju analizu. Usled oštećenja jednog od snimaka životinje koja je testirana u srednjoj adolescenciji tokom *faze preference socijalne novine*, broj grupno gajenih životinja koje su bile uključene u analizu iznosio je 6, dok je broj analiziranih životinja gajenih u socijalnoj izolaciji za ovaj parametar 7. Položaj N1 i praznog kaveza u odnosu na levu i desnu komoru/odeljak aparata je u svakom narednom testiranju bio menjan. Rezultati koji podrazumevaju obradu *faze socijalnosti* uključuju po 7 životinja iz obe grupe.

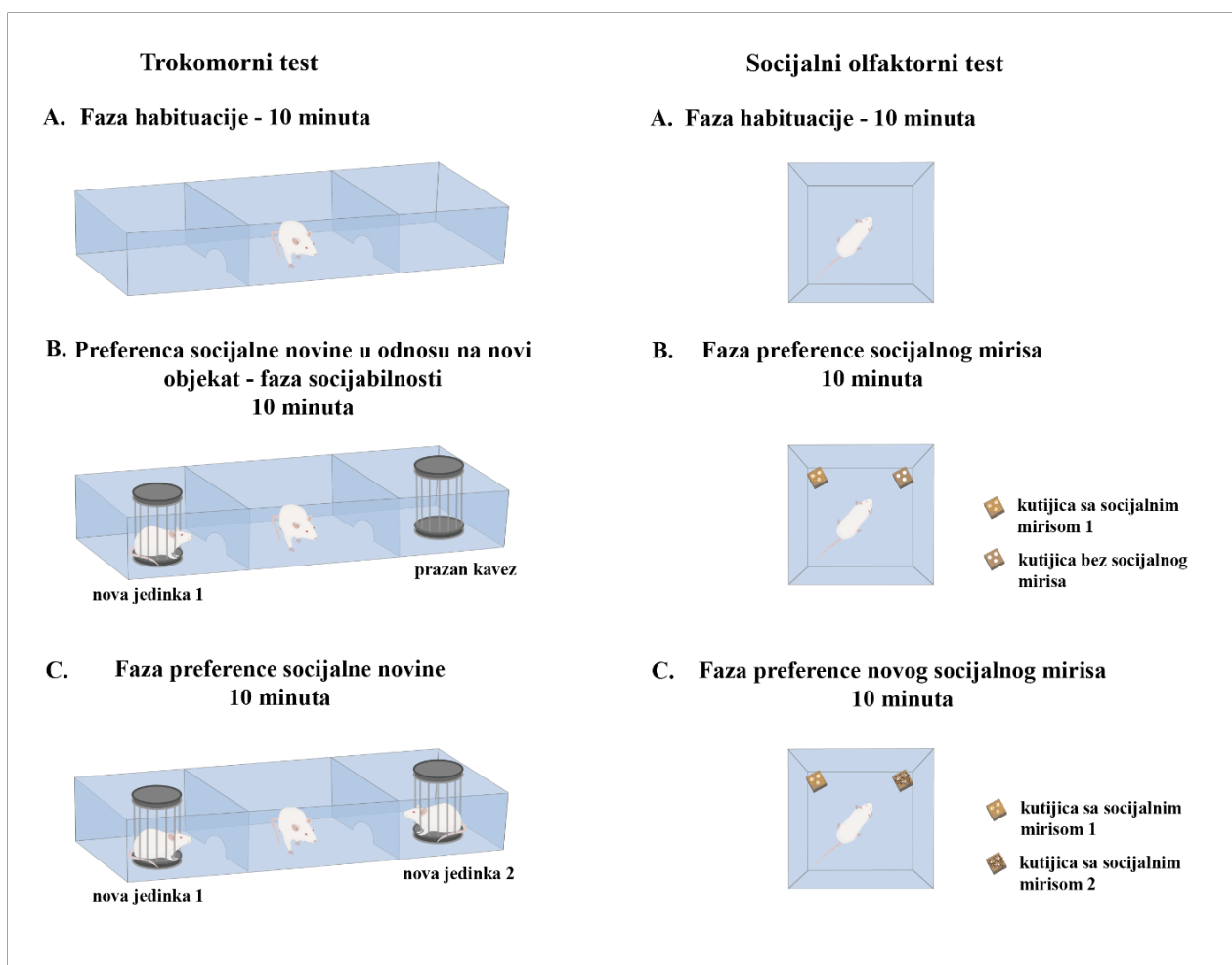
Relativna preferenca je računata pomoću diskriminacionog indeksa (DI) po formuli:

FAZA SOCIJABILNOSTI	
preferenca za odeljak sa N1 u odnosu na odeljak sa O (<i>socijalna orijentacija</i>)	$DI_{bo} = (\text{broj ulaza u odeljak sa N1}) / (\text{broj ulaza u odeljak sa N1} + \text{broj ulaza u odeljak sa O})$
socijalnost u užem smislu	$DI_{bp} = (\text{broj prilaza N1}) / (\text{broj prilaza N1} + \text{broj prilaza O})$ $DI_{vi} = (\text{vreme istraživanja N1}) / (\text{vreme istraživanja N1} + \text{vreme istraživanja O})$
FAZA PREFERENCE SOCIJALNE NOVINE	
preferenca za odeljak sa N2 u odnosu na odeljak sa N1 (<i>socijalna orijentacija</i>)	$DI_{bo} = (\text{broj ulaza u odeljak sa N2}) / (\text{broj ulaza u odeljak sa N2} + \text{broj ulaza u odeljak sa N1})$
preferenca socijalne novine u užem smislu	$DI_{bp} = (\text{broj prilaza N2}) / (\text{broj prilaza N2} + \text{N1})$ $DI_{vi} = (\text{vreme istraživanja N2}) / (\text{vreme istraživanja N2} + \text{vreme istraživanja N1})$

Dobijene DI vrednosti su upoređivane sa nivoom slučajnog istraživanja (za koji se uzima indeks vrednosti 0,5) korišćenjem t-testa za jedan uzorak (*One sample t-test*), pri čemu je odsustvo značajne razlike u rezultatima poređenja upućivalo na odsustvo preference, dok je značajna razlika u rezultatima poređenja upućivala na postojanje preference za vrednosti DI veće od 0,5.

Preferiranje prostora sa socijalnom jedinkom u odnosu na prazan prostor ukazuje na socijalnu orijentaciju, preferiranje jedinke u odnosu na objekat ukazuje na socijalnost, dok preferiranje socijalne novine odražava postojanje socijalne memorije. Nepostojanje ovih preferenci ukazuje na atipično socijalno ponašanje testiranih jedinki i imenuje se kao ponašanje nalik spektru autističnih poremećaja (Moy i sar., 2004). Međutim, razvojni profil socijalnosti i socijalne memorije kod glodara nije dovoljno istražen i skoro svi podaci koji su dostupni u literaturi se odnose na adultne jedinke. Ovo se posebno naglašava imajući u vidu činjenicu da socijalna memorija kod glodara, kao i kod ljudi, sazreva tokom adolescencije (Domínguez i sar., 2019), što implicira da mlade jedinke, u fazi peripuberteta, u Trokomornom testu mogu da odgovore drugačije od adultnih. U tom smislu,

tipično ponašanje glodara u Trokomornom testu bi se definisalo shodno razvojnoj fazi testiranih jedinki, a ne kao jedinstveni očekivani odgovor.



Slika 3.8 Šematska prezentacija aparata i eksperimentalne procedure Trokomornog testa i socijalnog olfaktornog testa. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2022a.

3.4.6. Socijalni olfaktorni test

Za razliku od ljudi i primata, koji koriste pretežno vizuelni sistem za socijalno prepoznavanje (što omogućava relativno lako prepoznavanje i pasivnih socijalnih stimulusa), socijalna informacija kod glodara kodirana je pretežno olfaktornim sistemom, uzevši u obzir da anozmija ili odstranjanje vomeronazalnog organa narušava prepoznavanje srodnika (Kogan i sar., 2000). U ovoj studiji socijalni olfaktorni test je primenjen kako bi se procenila uloga socijalnih mirisa u motivisanom socijalnom ponašanju pacova gajenih u različitim socijalnim uslovima, imajući u vidu da je za socijalno raspoznavanje kod glodara neophodna integracija više čula, uključujući olfaktorno, kao i aktivno prisustvo druge jedinke kao izvora socijalnog mirisa (de la Zerda i sar., 2022). Reakcija glodara na socijalne (kao i nesocijalne) mirise se koristi za procenu funkcionisanja olfaktornog sistema i očekuje se da testirana jedinka preferira socijalni miris kao i određene nesocijalne mirise (Arbuckle i sar., 2015). Poznavanje odgovora jedinke na socijalni miris pri definisanju njenog socijalnog ponašanja je već prepoznato kao važan pristup u eksperimentalnom radu (Arbuckle i sar., 2015), kao način da se izbegne pogrešno interpretiranje dobijenih rezultata u poistovećivanju odgovora na socijalni miris i aktivnu živu životinju. Uzimajući u obzir literaturne podatke pretpostavka je da će testirana životinja više vremena provoditi uz izvor socijalnog mirisa, kao i da će pokazivati preferencu za novi socijalni miris.

Aparatura i prpratni materijal. Testiranje je sprovedeno u istim aparatima u kojima je rađen i test otvorenog polja (Slika 3.8). Kao dodatna oprema korišćene su perforirane plastične kutijice (27x27x22 mm) napravljene od transparentnog materijala, sa 3 otvora (prečnika 5 mm) na svakoj strani i sa mogućnošću otvaranja. Kao izvor socijalnih mirisa kutijice su punjenje šuškom preuzetom iz kaveza sa pacovima istog pola i starosti kao i testirani pacovi, koja sadrži tragove urina nakupljene tokom tri dana boravka životinja u šuški. Punjenje kutijica je rađeno neposredno pre testiranja, a šuška namenjena za testiranje je čuvana u posebno označenim zip-lok kesicama i držana na sobnoj temperaturi ne više od 6 h, kako bi se očuvao snažan i konzistentan socijalni miris (Arbuckle i sar., 2015).

Eksperimentalna procedura. Nakon privikavanja životinja na sobu za testiranje, testirana životinja je postavljena u test arenu za istraživanje novog prostora u periodu od 10 minuta (*faza habituacije*; Slika 3.6A). Testirana životinja je zatim vraćana u matični kavez, a dve plastične kutijice (jedna prazna bez socijalnog mirisa - BM i jedna napunjena šuškom kao izvorom socijalnog mirisa 1 - M1) su postavljane u suprotne ćoškovne test arene. Testirana životinja je potom vraćana u centar arene i ostavljena da slobodno istražuje dodatnih 10 minuta, tokom faze označene kao *faza preference socijalnog mirisa* (faza ekvivalentna fazi socijalnosti trokomornog testa; Slika 3.8). Nakon toga, testirana životinja je ponovo vraćana u matični kavez, a prethodno prazna plastična kutijica je menjana kutijicom koja je u sebi imala šušku iz drugog kaveza, kao izvor socijalnog mirisa 2 - M2. Potom je testirana životinja vraćana u test arenu gde je slobodno istraživala 10 minuta, tokom faze označene kao *faza preference novog socijalnog mirisa* (faza ekvivalentna fazi preference socijalne novine trokomornog testa; Slika 3.8). Nakon završetka ovog perioda sve životinje su vraćane u svoje matične kaveze u skladu sa prethodno definisanim uslovima gajenja.

Pozicija kutijice BM i kutijice M1 u odnosu na levi i desni ćošak test-kaveza je menjana između sesija. Ponašajni odgovor pacova tokom testiranja je sniman i kasnije analiziran, uzevši u obzir sledeće parametre: broj prilaza i vreme provedeno u istraživanju kutijice sa M1, zajedno sa brojem prilaza i vremenom istraživanja kutijice BM, broj prilaza i vreme provedeno u istraživanju kutijice sa M2, zajedno sa brojem prilaza i vremenom istraživanja kutijice sa M1. Istraživanje kutijica je uzimano u obzir u slučaju kada distanca između njuške testirane životinje i kutijice nije bila veća od 2 cm. Kako bi se odredila relativna preferenca računat je diskriminacioni indeks (DI) po formuli:

faza preference socijalnog mirisa	$DI_{bp} = (\text{broj prilaza M1}) / (\text{broj prilaza M1} + \text{broj prilaza BM})$ $DI_{vi} = (\text{vreme istraživanja M1}) / (\text{vreme istraživanja M1} + \text{vreme istraživanja BM})$
faza preference novog socijalnog mirisa	$DI_{bp} = (\text{broj prilaza M2}) / (\text{broj prilaza M2} + \text{broj prilaza M1})$ $DI_{vi} = (\text{vreme istraživanja M2}) / (\text{vreme istraživanja M2} + \text{vreme istraživanja M1})$

Kao i u trokomornom testu, dobijene DI vrednosti su upoređivane sa nivoom slučajnog istraživanja (za koji se uzima indeks vrednosti 0,5) korišćenjem t-testa za jedan uzorak (*One sample t-test*), po već opisanom principu.

3.4.7. Test preference saharoznog rastvora

Test preference saharoznog rastvora je najčešće korišćen test za procenu prisustva anhedonije/hipohedonije kod glodara. Ovaj test (Der-Avakian, Markou, 2012) bazira se na slobodnom pristupu životinje dvema standardnim flašicama, od kojih se u jednoj nalazi 1% rastvor saharoze (smatra se da procenat šećera do 2% motiviše glodare da konzumiraju rastvor Willner, 2017), a u drugoj voda. Popijena voda i rastvor saharoze, kao i pojedena hrana mereni su nakon prvih 24 h, a zatim je rotiran položaj flašica u hranilici, a merenje ponavljano nakon narednih 24 h. Preferenca rastvora saharoze računata je po formuli (količina popijene saharoze - količina popijene vode) / (količina popijene saharoze + količina popijene vode), pri čemu je dobijan indeks preference koji se kreće u opsegu od -1 do 1. Kod kontrolnih grupa, u kavezima sa po 3 životinje praćena je konzumatorna aktivnost po kavezu. Indeks preference u vrednosti 0 označava da je jedinka

konzumirala istu zapreminu saharoze i vode, vrednosti veće od 0 ukazuju da je konzumirano više saharoze, tj. da postoji indikacija za pozitivnu preferencu, a vrednosti indeksa manje od 0 ukazuju da jedinka izbegava saharozu, tj. ne preferira je. Statistička značajnost dobijenih rezultata, tj. postojanje preference, određivana je poređenjem srednje vrednosti grupe (uz uzimanje u obzir standardne devijacije i veličine uzorka) sa vrednošću 0, koja označava odsustvo svake preference, korišćenjem t-testa za jedan uzorak (*One sample t-test*; Pavković i sar., 2020). Nedostatak preference označava anhedoniju, dok je hipohedonija stanje koje ukazuje na postojanje preference (shodno rezultatima t-testa), koja je manja u odnosu na preferencu kontrolne grupe.

Eksperimentalna procedura. Testovi preference saharoznog rastvora su rađeni 7. i 14. dana eksperimenta (P36 i P43), na mužjacima pacova koji su prošli testiranje socijalnih interakcija u trokomornom testu. Po završetku procene preference 1% rastvora saharoze jedinke su testirane korišćenjem 20% rastvora saharoze, po istom principu. Nakon primene koncentrovanijeg rastvora, nastavljeno je gajenje mužjaka i ženki, sa neograničenim pristupom hrane i vode narednih 5 dana (do P52), nakon čega su životinje stavljene u rasplod radi praćenja psihofizičkih karakteristika njihovog potomstva. Muško potomstvo ove roditeljske generacije je stavljano pod iste uslove gajenja kao i roditeljska generacija od P29, da bi potom bilo testirano na preferencu 1% rastvora saharoze P45.

3.5. Izolacija moždanog tkiva, perifernih organa i krvi

Životinje su žrtvovane brзом dekapitacijom bez anestezije, kako bi se izbeglo interferiranje anestetika sa rezultatima studije. Nakon toga, u skladu sa zahtevima studije, izolovani su organi od interesa.

3.5.1. Izolacija moždanog tkiva

Za potrebe Western blot analize na ledu je vršena izolacija mPFC (sekundarna motorna zona (M2), anteriorna cingulatna kora, prelimbičko i limbičko područje, koje odgovaraju koordinatama 1,5 do 4,7 mm anteriorno od bregme, po stereotaksičkom atlasu adultnog mozga pacova (Paxinos, Watson, 2005) i strijatuma. Uzorci tkiva su čuvani na -80 °C do trenutka izolacije proteina. Za potrebe ove analize korišćene su životinje eksperimentalnih grupa 1 i 2 (Eksperiment 1).

Za potrebe imunohistohemijske analize izolovani su celi mozgovi i nakon toga fiksirani 24 h u 4% rastvoru paraformaldehida u 0,1M fosfatom puferisanom fiziološkom rastvoru (engl. *Phosphate Buffered Saline*; PBS) pH 7,4 u trajanju od 24 h na temperaturi od 4 °C. Potom je vršena dehidratacija fiksanog tkiva kroz seriju rastvora saharoze sa rastućim koncentracijama (10%; 20%; 30%) u PBS tokom 72 h na 4 °C. Mозgovi su potom zamrzavani u izopentanolu i čuvani u zamrzivaču na -80 °C do daljeg korišćenja. Za potrebe ove analize korišćene su životinje eksperimentalnih grupa 7, 8, 11 i 12 (Eksperiment 3 i 4).

3.5.2. Izolacija perifernih organa

Za izolaciju perifernih organa korišćene su životinje eksperimentalnih grupa 7-14 (Eksperiment 3 i 4), u cilju ispitivanja aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. Nakon izolovanja organa (jetra, bubreg, srce, testis) uzimano je 0,5 g tkiva jetre, dok su bubreg, testis i srce uzimani celi i homogenizovani u saharoznom puferu (0,25 M saharoza; 0,05 M Tris; 1 mM EDTA; pH 7,4), a potom centrifugirani na 105000 x g, u trajanju od 90 minuta, na 4 °C. Nakon centrifugiranja uzorci su zamrzavani na -80 °C do korišćenja. Koncentracija proteina u uzorcima određivana je korišćenjem Lorijeve (Lowry i sar., 1951) metode i izražavana je u mg/ml. Sva spektrofotometrijska merenja rađena su na spektrofotometru Shimadzu UV-160 (Shimadzu Scientific Instruments, Shimadzu Corporation, Japan). Za potrebe ove analize korišćene su životinje iz eksperimentalnih grupa 7-14.

3.5.3. Izolacija krvi

Periferna krv životinja sa i bez prekononočnog gladovanja (Eksperiment 3 i 4) je sakupljana na žrtvovanju u heparinom obložene tubice i odvajana je krvna plazma od eritrocita.

Krv je centrifugirana na 3000 x g, 10 minuta, na 20 °C, odvajana je plazma, a eritrociti su tri puta ispirani fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl) na sobnoj temperaturi uz centrifugiranje (3000 x g; 10 minuta; na 20 °C) posle svakog ispiranja. Eritrociti i plazma su čuvani na -20 °C do korišćenja.

Liziranje eritrocita vršeno je dodavanjem hladne dH₂O (odnos 1:6) vorteksovanjem i držanjem na ledu 30 minuta. U lizatu je određivana aktivnost GR, GSH-Px, dok je za određivanje aktivnosti KAT lizat razblaživan sa dH₂O u odnosu 1:99 i dodavan etanol u odnosu na lizat 1:1. Za određivanje aktivnosti SOD1 razblaživan je lizat sa dH₂O (odnos 1:6) i uklanjan hemoglobin (Hb). Za potrebe ove analize korišćene su životinje eksperimentalnih grupa 7-14.

Koncentracija kortikosterona u plazmi je određena korišćenjem komercijalnog ELISA eseja (Corticosterone EIA kit, kat No AC-14F1, Immunodiagnostic Systems Ltd., UK), u skladu sa instrukcijama proizvođača.

Koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona u krvnoj plazmi je određivana u specijalizovanoj veterinarskoj laboratoriji za kliničku dijagnostiku. Koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida, kortizola i glukoze je rađena spektrofotometrijski (analizator: AU480, Beckman Coulter, SAD, reagensi: Beckman Coulter, SAD; kalibratori i kontrolni materijal: Biorad, SAD). Koncentracija testosterona rađena je hemiluminiscencijom korišćenjem analizatora (Access 2, Beckman coulter, SAD; kalibratori i kontrole: Beckman coulter, SAD).

3.6. Izolacija proteina i Western blot analiza

3.6.1. Izolacija proteina i određivanje njihove koncentracije

Moždano tkivo regiona od interesa je homogenizovano i sonifikovano u deset puta većoj zapremini RIPA pufera za liziranje (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Triton X-100; 0,1% SDS; 1 mM EGTA i 1 mM EDTA) u koji su dodavani komercijalno dostupni proteazni i fosfatadni inhibitori (Roche, Mannheim, Nemačka). Posle inkubacije na ledu (30 minuta), lizati su centrifugirani na 14000 x g u vremenskom periodu od 30 minuta na 4 °C, nakon čega je odvajanje supernatant i čuvan na -80 °C do daljeg korišćenja. Koncentracija ukupnih proteina je određivana metodom po Pirsu (*Pierce Micro BCA Protein Assay Kit*, Rockford, SAD), spektrofotometrijskim merenjem na 562 nm. Standardna kriva je konstruisana na osnovu poznatih koncentracija proteina albumina seruma govečeta (engl. *bovine serum albumin*, BSA).

3.6.2. Elektroforeza proteina na poliakrilamidnom gelu

Razdvajanje proteina prema molekularnoj masi vršeno je metodom denaturišuće natrijum-dodecilsulfat-poliakrilamid gel elektroforeze (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) pomoću aparature za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories). Elektroforeza je rađena u puferu za elektroforezu (192 mM glicin; 25 mM Tris, pH 8,3; 0,1% SDS) pri konstantnom naponu od 120 V, 90 minuta. Proteini su razdvajani na 10% gelu koji se sastojao od: akrilamida/bisakrilamida (Sigma), 1,5 M Tris HCl (pH 8,8) i 10% SDS, dok je gel za koncentrovanje sadržao 5% akrilamida/bisakrilamida, 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) i 10% SDS. Pored toga, za polimerizaciju gelova korišćeno je 100 µl 10% amonijum persulfata (ICN) i 4 µl tetrametil-etilen-diamina - TEMED (Serva) na 10 ml smese.

Za ispitivanje ekspresije indikatora neuronske aktivnosti, Egr-1 i c-Fos proteina, na gel je nanošeno po 20 µg ukupnih proteina, koji su pre nalivanja termički denaturisani (4 minuta na temperaturi od 95 °C). Kao pufer za nalivanje korišćen je 2x Laemmli (31,25 mM Tris, pH 6,8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptetanol; 0,025% bromfenol plavo) dodavan uzorku u zapreminskom odnosu 1:1, sa 5% β-merkaptetanolom. Pored uzoraka na gel je nanošen i „Prestained” marker (Thermo Scientific, Litvanija) širokog spektra, kao standard za molekularnu masu proteina (odnosno kao smeša referentnih proteina poznatih molekularnih masa 10-180 kDa).

3.6.3. Transfer proteina na poliviniliden fluoridnu membranu

Nakon razdvajanja proteina elektroforezom, proteini su sa poliakrilamidnog gela prenošeni na poliviniliden fluoridnu membranu (AmershamTM HybondTM, Nemačka) pomoću sistema za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories). Nakon završene elektroforeze, gel za razdvajanje je stavljan u posudu sa puferom za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris, pH 8,3) narednih 15 minuta. Priprema membrana se sastojala u njihovoj aktivaciji u metanolu (20s), ispiranju u dejonizovanoj vodi (20s), a zatim stavljanju u posudu sa puferom za transfer na 15 minuta. Elektrotransfer proteina je vršen pod naponom od 30 V, tokom noći na 4 °C. Nakon završenog transfera gelovi su potapani u Coomassie Brilliant Blue boju (0,25% Coomassie Brilliant Blue R250; 10% glacijalna sirćetna kiselina; 45% metanol; dejonizovana voda) radi provere uspešnosti transfera proteina. Nakon završenog transfera membrane su sušene na sobnoj temperaturi, a potom aktivirane u 100% metanolu (20s), ispirane u dejonizovanoj vodi i prebacivane u posudu sa Ponso S bojom (Ponceau S; 1% boja Ponso S; 5% glacijalna sirćetna kiselina; dejonizovana voda), nakon čega su skenirane radi vizualizacije proteinskih traka i kasnije kvantifikacije proteina.

3.6.4. Detekcija proteina pomoću specifičnih primarnih i sekundarnih antitela

Radi detekcije proteina od interesa membrane su aktivirane u 20% metanolu (20s), ispirane u dejonizovanoj vodi (20s), a zatim blokirane u rastvoru obranog mleka (5%) u Tris-puferisanom fiziološkom rastvoru (engl. *Tris-buffered saline*, TBS) sa dodatkom deterdženta Tween-20 (TBST: 20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 137 mM NaCl; 0,01% Tween 20) na sobnoj temperaturi (60 minuta) kako bi se izbeglo nespecifično vezivanje proteina za membranu. Nakon blokiranja i ispiranja u TBST puferu, membrane su inkubirane sa odgovarajućim razblaženjem primarnog antitela koje se specifično vezuje za proteine od interesa. Za potrebe ovog istraživanja korišćena su primarna antitela anti-Egr1 (Santa Cruz Biotechnology, SAD, sc-515830; mišje monoklonsko antitelo u razblaženju 1:8000) i anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, SAD, sc-52; zečje poliklonsko antitelo u razblaženju 1:2500) blokirana u 2,5 % mleku na 4 °C preko noći. Višak primarnog antitela je ispiran u TBST puferu, nakon čega su membrane inkubirane odgovarajućim sekundarnim antitelima razblaženim u TBST puferu tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi (HRP-konjugovano zečje anti-mišije (Dako, P0260) ili goveđe anti-zečje (Santa Cruz Biotechnology, SAD, sc-2370)). Nakon inkubacije sekundarnim antitelom, membrane su spirane (3 x 10 minuta u TBST puferu), a potom izložene hemiluminiscentnim supstratom luminolom (komercijalni komplet - *Western blotting detection reagents*, Amersham) uz dodatak H₂O₂, u trajanju od 2 minuta, da bi potom bile izlagane autoradiografskom filmu (Kodak) osetljivom na plavu svetlost u trajanju od 2 minuta. Nakon ekspozicije membrane, razvijeni filmovi su skenirani za dalju analizu.

3.6.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Kvantifikacija intenziteta signala dobijenih imunopozitivnih proteinskih traka na membranama rađena je denzitometrijskom metodom, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (Image Quant 5.0). Intenzitet svake trake normalizovan je u odnosu na intenzitet imunopozitivnosti trake β-aktina.

3.7. Priprema preseka za histološku analizu

Mozgovi su sečeni na kriotomu (Leica) na preseke debljine 20 μm, potom je svaki presek lepljen direktno na mikroskopsku pločicu, koja je radi fiksacije ostavljena 24 h na sobnoj temperaturi (sušenje) i nakon toga čuvana na -20 °C, do bojenja. Tokom bojenja za imunohistohemijsku analizu uvek su istovremeno bojene pločice sa uzorcima kontrolnih i socijalno izolovanih životinja kako bi se izbegao uticaj tehničkih finesa procedure na rezultate. Paralelno su bojene i preseki koji su prolazili istu proceduru samo bez primarnog antitela i koji su predstavljali negativnu kontrolu, za autofluorescencu i pozadinsko vezivanje sekundarnog antitela.

3.7.1. Imunofluorescentno bojenje i kvantitativna imunohistohemijska analiza

Dorzalni hipokampus sa dentatnim girusom (DG), što odgovara regionu -2,9 do -3,6 mm posteriorno od bregme, imunohistohemijski su analizirani (Paxinos, Watson, 2005). Kako bi se napravila distinkcija između odgovarajućih subregiona hipokampusa - *cornū Ammōnis* (CA)2/CA3, kao i CA2/CA1 korišćen je Purkinje ćelijski protein 4 (PCP4), koji se koristi za obeležavanje CA2.

PV interneuroni su bojani i analizirani u CA1, CA2, CA3 i DG, dok je mikroglija obeležena korišćenjem Iba1 markera i analizirana u DG. Isti mozgovi su korišćeni za dobijanje preseka za oba bojenja.

3.7.1.1. Bojenje parvalbumin pozitivnih interneurona u dorzalnom hipokampusu

Pre bojenja, mikroskopske pločice su sušene na sobnoj temperaturi 1h i ispirane u PBS. Kako bi se smanjilo pozadinsko bojenje preseki su stavljeni u 1% glicin (10 minuta), a potom, radi bolje penetracije antitela, na preseke je nakapavan 0,1% Triton X-100 (rastvoren u PBS), 15 minuta. Kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, preseki su inkubirani sa 1,5% BSA rastvorenom u PBS u vremenskom periodu od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Višak rastvora za blokiranje je uklanjan kratkim ispiranjem u PBS, a zatim je na preseke nakapavano primarno antitelo - mišje anti-parvalbumin (P3088, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD, 1:2000) inkubirano preko noći na 4 °C. Narednog dana, nakon ispiranja pločica u PBS, na pločice je nakapavano sekundarno antitelo rastvoreno u PBS (anti-mišje konjugovano sa Alexa 488, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD, 1:300) u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja pločica u PBS, isti preseki korišćeni su za bojenje antitela za markiranje CA2 subregiona hipokampusa - zečje anti-PCP4 (HPA005792, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD; 1:200) preko noći na temperaturi od 4 °C. Sutradan, pločice su ispirane u PBS, da bi im nakon toga bilo stavljen odgovarajuće sekundarno antitelo (anti-zečje konjugovano sa Alexa 455, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD; 1:250) u trajanju od 2 h na sobnoj temperaturi. Za bojenje jedra korišćen je Hoechst rastvor (33258, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD, 1:1000). Na pločice su potom montirana pokrovna stakla pomoću moviola i pločice su ostavljane 24 h na sobnoj temperaturi da se suše.

3.7.1.2. Kvantitativna analiza parvalbumin pozitivnih ćelija u dorzalnom hipokampusu

Zahvaljujući korišćenju PCP4 antitela, koje obeležava CA2 subregion hipokampusa, jasno je razlikovan CA1 od CA2, pri čemu je CA1 definisan kao subregion koji prethodi CA2 subregionu i ima vidljivo gušće pakovane piramidne neurone u odnosu na neurone CA2 i CA3 subregiona. CA3 subregion se nastavlja na CA2 subregion. Dentatni girus (DG) je definisan kao region gusto pakovanih slojeva granularnih ćelija, sa postojanjem jasno vidljivog gornjeg i donjeg roga, kao i hilusa. Slike su napravljene pomoću Axio Observer Microscope Z1 korišćenjem Axio Vision 4,6 softverskog sistema (CarlZeiss, Nemačka) na uveličanju od 10×. PV pozitivne (PV⁺) ćelije su brojane manuelno direktno pod mikroskopom na uveličanju od 20×, pri čemu su samo PV⁺ ćelije sa vidljivim nukleusom uzete u obzir. Analiza je vršena bez uvida u pripadnost eksperimentalnim grupama. Za analizu su korišćena četiri preseka po životinji/mozgu, debljina preseka 20 μm, pri čemu je između dva uzastopna analizirana preseka bilo najmanje 4 preseka razmaka. Za svaki analizirani presek imunoreaktivnost je računata zasebno po regionu (CA1-3 i DG) leve i desne hemisfere. Za svaku životinju/mozak računata je srednja vrednost za svaki region pojedinačno (4 preseka x 2 hemisfere), a potom i za svaku eksperimentalnu grupu.

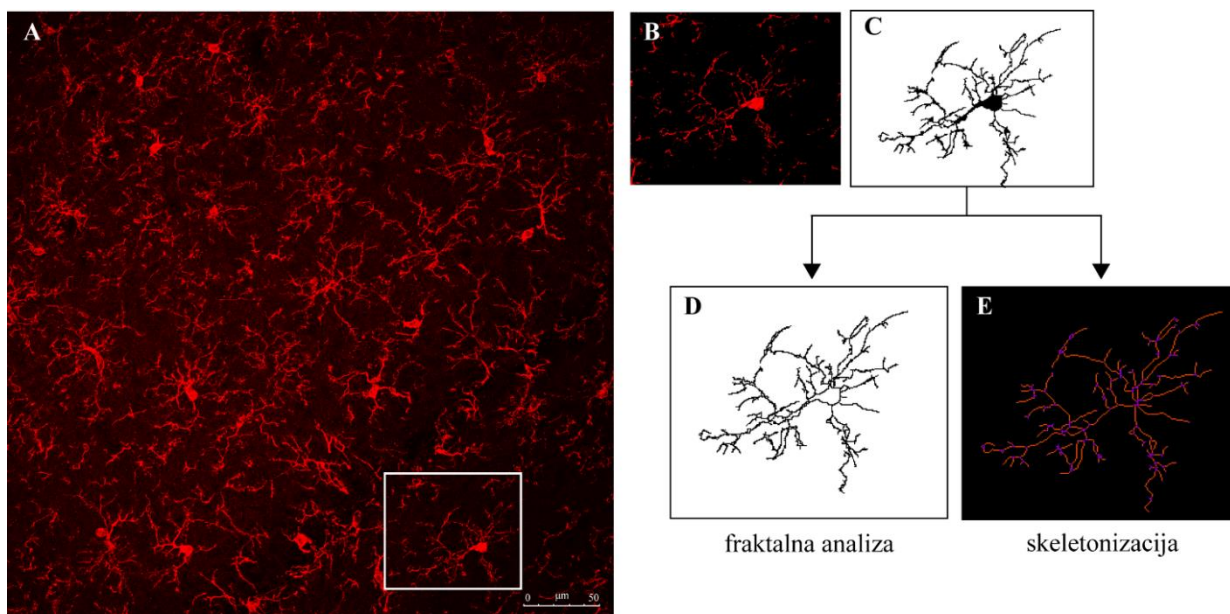
3.7.1.3. Bojenje mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu

Mikroskopske pločice su držane na sobnoj temperaturi 1h, nakon čega su preseki ispirani u rastvoru PBS. Nakon držanja preseka 10 minuta u 1% glicinu i 15 minuta u 0,1% Tritonu X-100 rastvorenom u PBS, preseki su blokirani u normalnom magarećem serumu (1:10), u trajanju od 40 minuta. Nakon ispiranja preseka u PBS na preseke je nakapavan rastvor primarnog antitela - kozje

anti-Iba-1 (ab5076, Abcam, 1:500) inkubirano preko noći na 4 °C. Narednog dana, nakon ispiranja pločica u PBS, na pločice je nakapavano odgovarajuće sekundarno antitelo rastvoreno u PBS (magareće anti-kozje konjugovano sa Alexa 568, Invitrogen, 1:500) i inkubirano u trajanju od 2h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja pločica u PBS sa Tween20, bojena su jedra ćelija pomoću Sytox green (razblaženje 1:30000, ThermoFisher) tokom 30 minuta. Nakon ispiranja u TBST, na pločice su montirana pokrovna stakla pomoću moviola i ostavljene su 24 h na sobnoj temperaturi da se suše.

3.7.1.4. Kvantitativna analiza mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu

Analiza aktivacionog fenotipa mikroglijskih ćelija u DG rađena je pomoću konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa Olympus FV10-ASW (Olympus FLUOVIEW FV1000, Nemačka). Korišćeni su Ar-ion (488 nm) i HeNe (543 nm) laseri radi pobuđivanja fluorescence na uveličanju od 20×, nakon čega su dobijene slike obrađene u ImageJ softveru (NIH, SAD). Specifična obrada fotografija rađena je po protokolu Young, Morrison, 2018, sa modifikacijom koja je podrazumevala izolaciju i obradu svake pojedinačne ćelije sa date mikrografije umesto na nivou cele mikrografije, kako je u protokolu opisano (Slika 3.9B i 3.9C). Ovakav način obrade omogućava detaljnu analizu svih prisutnih ćelija sa datog preseka, bez favorizovanja ćelija za analizu od strane



Slika 3.9 Kvantitativna analiza fenotipa mikroglijske ćelije. (A) Primer preseka DG sa mikroglijskim ćelijama markiranim Iba-1. (B) Ćelija za dalju analizu. (C) Konverzija mikrografije u binarni format i modifikacija ćelije po protokolu Young, Morrison, 2018. (D) Primena *FracLac plug in* softverskog dodatka za fraktalnu analizu ćelije (ROI: 250 x 250). (E) Primena *Skeletonization plug in* softverskog dodatka za skeletonizaciju ćelije.

eksperimentatora. Modifikacija ćelija po protokolu obezbeđuje dobijanje reprezentativnih binarnih fotografija koje verodostojno modeliraju originalne fotomikrografije. Prvi deo obrade fotografija podrazumevao je primenu potprograma za fraktalnu analizu (*FracLac plug in*; Slika 3.9D) kojim se dobijaju detaljni morfometrički podaci za pojedinačnu ćeliju: njena površina, obim, cirkularnost, fraktalna dimenzija, lakunarnost, opseg rasprostranjenja i gustina. Veličina regiona od interesa (engl. *region of interest* - ROI) za fraktalnu analizu iznosila je 250 x 250. Fraktalna dimenzija predstavlja parametar koji preciznije određuje složenost mikroglijskih ćelija od jednostavnih negranatih do složenih granatih. Veće vrednosti ovog parametra ukazuju na veću složenost mikroglijskih ćelija. Opseg rasprostranjenja je mera mikroglijskog izduženja, stoga je ovaj parametar, zajedno sa ćelijskom cirkularnošću, relevantan za definisanje mikroglijskog oblika (od cilindričnog do cirkularnog). Gustina, ćelijska površina i obim opisuju veličinu mikroglijske ćelije. Površina ćelije se računa kao ukupan broj piksela koji čine obojenu ćeliju unutar regiona od interesa. Obim ćelije je

računat na osnovu merenja kontura ćelijskog oblika, a njegove manje vrednosti ukazuju na manji stepen grananja ćelija. Gustina ćelija se dobija deljenjem površine ćelije sa njenim opsegom rasprostranjenja, gde povećana vrednost ovog parametra ukazuje na veću kompaktnost mikrogljijskih ćelija. Lakunarnost odražava promene u samom telu mikrogljijskih ćelija i dodatnih morfoloških karakteristika. Niske vrednosti ovog parametra ukazuju na homogenost, dok više vrednosti ukazuju na heterogenost mikrogljijskih ćelija (Fernández-Arjona i sar., 2017; D'Aloia, Molteni, 2021). Drugi deo obrade fotografija podrazumevao je primenu potprograma za skeletonizaciju (*Skeletonization plug in*; Slika 3.9E) pomoću kojeg su dobijeni dati parametri: ukupan broj mikrogljijskih nastavaka (grana), prosečna i maksimalna dužina grane, broj mesta grananja, veličina mesta grananja, dužina grane između dve tačke grananja, broj završetaka grana, kao i broj trostrukih i četverostrukih grananja. Parametri skeletonizacije daju detaljnu sliku o složenosti mikrogljijskih ćelija, gde granate mikrogljijske ćelije poseduju složenu mrežu nastavaka koji polaze od ćelijskog tela. Promene u grananju ćelija (odnosno njihova tranzicija u aktivno stanje) ukazuju na postojanje mikrogljijskog odgovora na izmenjeno fiziološko stanje (Morrison i sar., 2017). Ovako senzitivan način obrade ćelija omogućava objektivian i sveobuhvatan način procene različitih mikrogljijskih morfologija koje se javljaju kako u zdravim, fiziološkim stanjima, tako i u patološkim.

3.8. Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima u perifernim tkivima i krvi

3.8.1. Određivanje koncentracije hemoglobina u krvi i uklanjanje hemoglobina iz lizata

Koncentracija hemoglobina (Hb) u krvi određivana je u primarnom lizatu po metodi Drabkin i Austin (Drabkin, Austin, 1935). U 0,02 ml lizata dodavano je 5 ml Drapkinovog reagensa (4 mM $K_3Fe(CN)_6$, 20 mM KCN, 0,5M fosfatni pufer pH 7,0), inkubirano 15 minuta u mraku, nakon čega je merena apsorbancija na 545 nm. Kao slepa proba umesto lizata sipana je dH_2O . Koncentracija Hb je izražavana u g/100 ml, prema formuli:

$$C_{Hb} = A_{545} \times 36,77$$

C_{Hb} - koncentracija hemoglobina, A_{545} - apsorbancija očitana na 545 nm, 36,77 - ekstinkcioni koeficijent.

Uklanjanje Hb iz lizata vršeno je po metodi koju je opisao Tsuchihashi (Tsuchihashi, 1923). U razblaženi lizat je dodavano 1 ml hladnog etanola i 0,6 ml hladnog hloroforma, zatim centrifugiran na 2000 x g, 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Hloroform je dodavan u kapima uz neprestano vorteksovanje. U izdvojenom supernatantu je određivana aktivnost SOD1.

3.8.2. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Koncentracija proteina u uzorcima tkiva određivana je po metodi Lorija (Lowry i sar., 1951), koja je prilagođena za mikrotitar ploču. Kao standard je korišćen albumin govedeg seruma (BSA). Za crtanje standardne krive korišćena su dekadna razblaženja štoka BSA (1 mg/ml). Koncentracija proteina u uzorcima je očitava sa standardne krive.

Postupak: 0,02 ml uzorka, 0,3 ml rastvora C (2% Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH; 1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 2% K,Na tartarata, odnos 98:1:1), inkubirano je 15 minuta, a zatim dodavano 0,06 ml Folin-Ciocalteu reagensa i inkubirano 30 minuta u mraku. Nakon nalivanja ovako pripremljenih uzoraka u bunariće mikrotitar ploče vršeno je očitavanje apsorbance na 670 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finska). Kao slepa proba umesto 0,02 ml uzorka sipano je 0,02 ml dH_2O .

3.8.3. Određivanje ukupne superoksid dismutaze

SOD je enzim koji katalizuje reakciju $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 i molekuskog kiseonika (O_2). Aktivnost SOD je određivana adrenalinskom metodom (Misra, Fridovich, 1972). Prisutna SOD uklanja $O_2^{\cdot-}$ pri čemu inhibira reakciju autooksidacije adrenalina. Promenom apsorbancije na 480 nm meri se brzina

autooksidacije adrenalina. Porast apsorbanca na ovoj talasnoj dužini potiče od akumulacije adrenohroma. Brzina autooksidacije adrenalina u odsustvu enzima se uzima kao kontrolna, a procenat inhibicije autooksidacije adrenalina izazvana SOD se koristi kao mera katalitičke aktivnosti enzima.

Postupak: U kivetu je sipano 3 ml karbonatnog pufera (0,05 M Na₂CO₃, 0,1 mM EDTA, pH 10,2) i rastvor adrenalina u 0,1 M HCl, pri čemu količina smeše treba da bude tolika da promena apsorbanca u minutu ($\Delta A/\text{min}$) tokom autooksidacije bude 0,020-0,022. Ovom reakcijom se određuje plato promene apsorbanca odnosno blank. Pri merenju autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD, čime se određuje aktivnost SOD, u karbonatni pufer je pre adrenalina dodavan uzorak tako da količina dovede do 50% inhibicije vrednosti koja je dobijena za blank. Za izračunavanje SOD aktivnosti korišćen je procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina. Aktivnost SOD u uzorku izražavana je u jedinicama SOD aktivnosti po mg proteina (U/mg proteina) za tkiva, odnosno po g hemoglobina (Hb) za krv (U/g Hb) i predstavlja količinu enzima koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorbanca.

$$\text{za lizat eritrocita: SOD aktivnost (CuZnSOD)} = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R \times 100}{C_{\text{Hb}} \times V \times \Delta K}$$

$$\text{za tkiva: SOD aktivnost} = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{C_{\text{pr}} \times V \times \Delta K}$$

ΔK - promena apsorbanca adrenalina (kontrolna vrednost), ΔA - promena apsorbanca uzorka, V- zapremina uzorka koja je sipana u reakcionu smešu (ml), C_{Hb} - koncentracija hemoglobina u lizatu eritrocita (g/100 ml), C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml), R - razblaženje uzorka.

3.8.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza 1 i 2

Princip metode je isti kao i gorepomenuti, s tom razlikom što je za izračunavanje aktivnosti SOD2 (MnSOD) potrebno blokirati aktivnost SOD1 (CuZnSOD). To je postizano dodavanjem 8 mM KCN u odnosu 1:1 i inkubacijom u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi pre početka analize. Takođe, dodavana je veća količina uzorka (u kojem je inhibirana SOD1), jer SOD2 čini svega 5-10% ukupne aktivnosti SOD. Formula za izračunavanje aktivnosti enzima je ista kao i za ukupnu SOD aktivnost. Aktivnost SOD1 dobijana je tako što je od ukupne SOD aktivnosti oduzimana aktivnost SOD2. Kako u eritrocitima ne postoji SOD2, aktivnost ukupne SOD predstavlja ujedno i aktivnost SOD1.

3.8.5. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost KAT određivana je metodom po Bojtleru (Beutler, 1984). Aktivnost KAT je merena praćenjem degradacije H₂O₂ na 230 nm, odnosno praćenjem pada apsorbanca usled razgradnje ovog molekula. Aktivnost ovog enzima je izražavana kao broj μM redukovanog H₂O₂ u minuti po g Hb u eritrocitima (U/g Hb), odnosno po mg proteina u tkivima (U/mg proteina).

Postupak: Od 30% vodenog rastvora vodonik peroksida pravljjen je 10 mM rastvor, čija apsorbanca na 230 nm je 0,860. Potom je u kivetu sipan 50 μl TRIS, EDTA pufer (1 M TRIS, 5 mM EDTA, pH 8,0) i uzorak u količini da $\Delta A/\text{min}$ bude u opsegu 0,03-0,06 i 1 ml 10 mM H₂O₂ rastvora. Merenje apsorbanca je vršeno tokom 3 minuta, svakih 30 s, sa ukupno 6 merenja. Aktivnost katalaze je računata po formuli:

$$\text{za lizate eritrocita: KAT aktivnost} = \frac{\Delta A \times 100 \times R}{C_{\text{Hb}} \times V \times 0,071}$$

$$\text{za tkiva: KAT aktivnost} = \frac{\Delta A \times R}{C_{\text{pr}} \times V \times 0,071}$$

ΔA - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, C_{Hb} - koncentracija hemoglobina u lizatu eritrocita (g/100 ml), C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml), V - zapremina uzorka u kojoj je određivana aktivnost enzima (ml), R - razblaženje uzorka, 0,071 - ekstinkcioni koeficijent za H_2O_2 na 230 nm ($M^{-1}cm^{-1}$).

3.8.6. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze

Aktivnost GSH-Px određivana je modifikovanom metodom Palja i Valentine (Paglia, Valentine, 1967). Metod je zasnovan na osobini GSH-Px da katalizuje oksidaciju redukovanog glutationa (GSH) u oksidovani glutation (GSSG), uz redukciju velikog broja molekula H_2O_2 do vode. GSSG se ponovo redukuje do GSH uz prisustvo NADPH koji je donor vodonika, a enzim glutation reduktaza (GR) katalizuje ovu reakciju. Aktivnost GSH-Px se meri na 37° C, na 340 nm, pri čemu je vreme čitanja za krv 120 s, a za tkiva 150 s. Aktivnost GSH-Px je praćena posredno određivanjem potrošnje NADPH, odnosno oksidacije NADPH delovanjem GR. Aktivnost enzima izražavana je u jedinicama GSH-Px aktivnosti po g Hb u eritrocitima (U/g Hb), odnosno po mg proteina u tkivima (U/mg proteina).

Postupak: U kvarcnu kivetu za blank redom su dodavani, dH_2O 1,7 ml, NADPH (0,2 mM) 0,6 ml, fosfatni pufer (0,5 M, pH 7,0) 0,3 ml, GSH (1mM) 0,3 ml, t-butil hidroperoksid (0,03 M) 0,1 ml, GR 5 μ l. Kad je određivan blank, tj. podešavano razblaženje GR, merena je apsorbance uzoraka. U kvarcnu kivetu za uzorke redom su dodavani: oko 50 μ l uzorka, Drabkinov reagens 50 μ l, dH_2O 1,6 ml, NADPH (0,2 mM) 0,6 ml, fosfatni pufer (0,5 M, pH 7,0) 0,3 ml, GSH (1mM) 0,3 ml, t-butil hidroperoksid (0,03 M) 0,1 ml, GR 5 μ l.

Zapremina lizata eritrocita koja je dodavana u kivetu je računata po formuli $(5/C_{Hb}) \times 50 \mu l = \text{količina lizata } (\mu l)$ što znači da je za svaki uzorak pojedinačno određivana količina koja je uzimana na osnovu izračunate koncentracije Hb.

$$\text{za lizat eritrocita: GSH-Px aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 1000}{6,22 \times 0,835}$$

Za merenje aktivnosti u tkivima u kivetu je sipano dH_2O 1,5 ml, GSH (1 mM) 0,3 ml, NADPH (0,2 mM) 0,6 ml, NaN_3 (1 mM) 0,1 ml, EDTA (1 mM) 0,1 ml, fosfatni pufer 0,5 M (pH 7,0) 0,3 ml, uzorak, t-butil hidroperoksid (0,03 M) 0,1 ml, GR 5 μ l. Rađeni su blank i uzorci.

$$\text{za uzorke: GSH-Px aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 3 \times 1000}{6,22 \times V \times C_{pr}}$$

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti, ΔA_{bl} - srednja promena apsorbance blanka u minuti, V - zapremina uzorka u kojoj je određivana aktivnost enzima (ml), C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml), 6,22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH ($M^{-1} cm^{-1}$).

3.8.7. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost ovog enzima određivana je metodom po Glacleu (Glatzle i sar., 1974). Aktivnost GR je merena posredno, praćenjem smanjenja količine NADPH (čiji je maksimum apsorbance na 340 nm) u reakcionoj smeši. Metoda je zasnovana na sposobnosti GR da katalizuje reakciju redukcije GSSG u redukovani glutation (GSH), uz oksidaciju koenzima NADPH do $NADP^+$. Kao posledica oksidacije koenzima NADPH do $NADP^+$ dolazi do opadanja apsorbance na 340 nm. Kako je GR u uzorku ograničena, pad apsorbance je direktno proporcionalan njenoj aktivnosti. Aktivnost enzima izražavana je u jedinicama GR aktivnosti po g Hb (U/g Hb) u eritrocitima, odnosno po mg proteina u tkivima (U/mg proteina).

Postupak: U kvarcnu kivetu je sipano 0,6 ml fosfatnog pufera (0,5 M, pH 7,4), 0,1 ml GSSG (2 mM), 0,1 ml EDTA (0,5 mM), 0,1 ml NADPH (0,1 mM) i 0,1 ml uzorka. Reakcija je počinjala kada je dodavan NADPH. Za slepu probu su korišćeni isti rastvori, ali bez uzorka.

Spektrofotometrijski je praćena apsorbanca na talasnoj dužini od 340 nm, na temperaturi od 37 °C, svakih 30 sec tokom 150 sec.

$$\text{za lizat eritrocita: GR aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 10^3 \times 3}{6,22 \times V \times C_{pr}}$$

$$\text{za tkiva: GR aktivnost} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 10^5 \times 3}{6,22 \times V \times C_{Hb}}$$

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbanca uzorka u minuti, ΔA_{bl} - srednja promena apsorbanca blanka u minuti, C_{Hb} - koncentracija hemoglobina u lizatu eritrocita (g/100 ml), C_{pr} - koncentracija proteina (mg/ml), V - zapremina uzorka u kojoj je određivana aktivnost enzima (ml), 6,22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH.

3.9. Statistićka obrada podataka

Podaci u okviru ove teze su obrađivani pomoću Statistica 6.0 softverskog paketa (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Pri statistićkoj obradi podataka prvo je ispitivana normalnost distribucije dobijenih rezultata korišćenjem Shapiro-Wilksovog testa, koji je osetljiviji u odnosu na ostale testove normalnosti kada se radi o malom broju uzoraka (Razali, Wah, 2011). U zavisnosti od ishoda Shapiro-Wilksovog testa podaci su dalje podvrgavani adekvatnim parametrijskim i neparametrijskim testovima za dalju statistićku analizu podataka.

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška (SD), sa individualnim vrednostima u okviru grupe. Statistićki znaćajnom razlikom smatrana su poređenja u kojima je $p < 0,05$.

Podaci koji nisu imali normalnu distribuciju su obrađivani neparametrijskim statistićkim testovima: Wilcoxon test za poređenja u okviru grupa (ponovljena merenja) radi procene adaptivnog ponašanja kroz vreme, kao i Mann-Whitney U-testom za poređenja između grupa. Podaci sa normalnom distribucijom su podvrgavani ANOVA analizi sa *društvenim okruženjem* (gajenje u grupi ili izolaciji) i *maturacijom* (sazrevanje tokom rane i srednje adolescencije) kao faktorima od znaćaja, nakon čega je raćena *post hoc* analiza (Tukey test ili Unequal N HSD), gde je bilo indikovano.

Za procenu preference u testovima socijalnog ponašanja srednja vrednost grupe (uz davanje vrednosti standardne devijacije i velićine uzorka) je porećena sa vrednošću 0,5 (što predstavlja vrednost šanse, tj. apsolutnog odsustva preference; naćin na koji je raćunat indeks preference dat u 3.4.5. i 3.4.6.), pomoću t-testa za jedan uzorak (engl. *One-sample t-test*). Za procenu preference u saharoznom testu takoće je korišćen t-test za jedan uzorak ali je vrednost šanse bila 0 jer je indeks preference raćunat na drugi naćin (dat u 3.4.7.).

Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u perifernim tkivima je analizirana pomoću dvofaktorske ANOVA sa uslovima *društvenog okruženja* i *prekonoćnim gladovanjem* kao faktorima, nakon čega je raćena *post hoc* analiza (Unequal N HSD), gde je bilo indikovano.

Aktivacioni fenotip mikrogljijskih ćelija i PV interneurona u hipokampusu je analiziran pomoću Mann-Whitney U-testa za porećenja između grupa.

U sklopu potceline koja se odnosi na psihofizićki fenotip potomstva socijalno izolovane roditeljske generacije, rezultati koji nisu imali normalnu raspodelu su obrađivani korišćenjem *U* testa, dok su podaci sa normalnom raspodelom analizirani pomoću ANOVA analize gde su *društveno okruženje potomstva* i *društveno okruženje roditeljske generacije* bili faktori od znaćaja, nakon čega je raćen Tukey test, gde je bilo indikovano. Za rezultate dobijene na potomstvu pre odvajanja od majke (P21) ispitivani su celi okoti, a rezultati izraćeni kao srednja vrednost po okotu (Lazic, Essieux, 2013), dok su nakon odvajanja od majke i formiranja grupa sa definisanim socijalnim uslovima gajenja za finalnu analizu korišćene 2 jedinke po okotu od kojih jedna pripada rećimu grupnog gajenja, a jedna rećimu socijalne izolacije (Lazic, Essieux, 2013).

Vrednosti parametara u krvi, kao i promene u telesnoj masi su transformisane tako da imaju normalnu raspodelu i potom analizirane pomoću dvofaktorske ANOVA sa *društvenim okruženjem* i

prekonoćnim gladovanjem kao faktorima od interesa i naknadno upoređivani Tukey testom, gde je bilo indikovano.

Sumarni prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka, dobijenih parametara i broja korišćenih životinja je predstavljen u Tabelama od 1-10. Date su tačne p vrednosti, osim ako je $p < 0,000$, što je označavano kao $p < 0,001$.

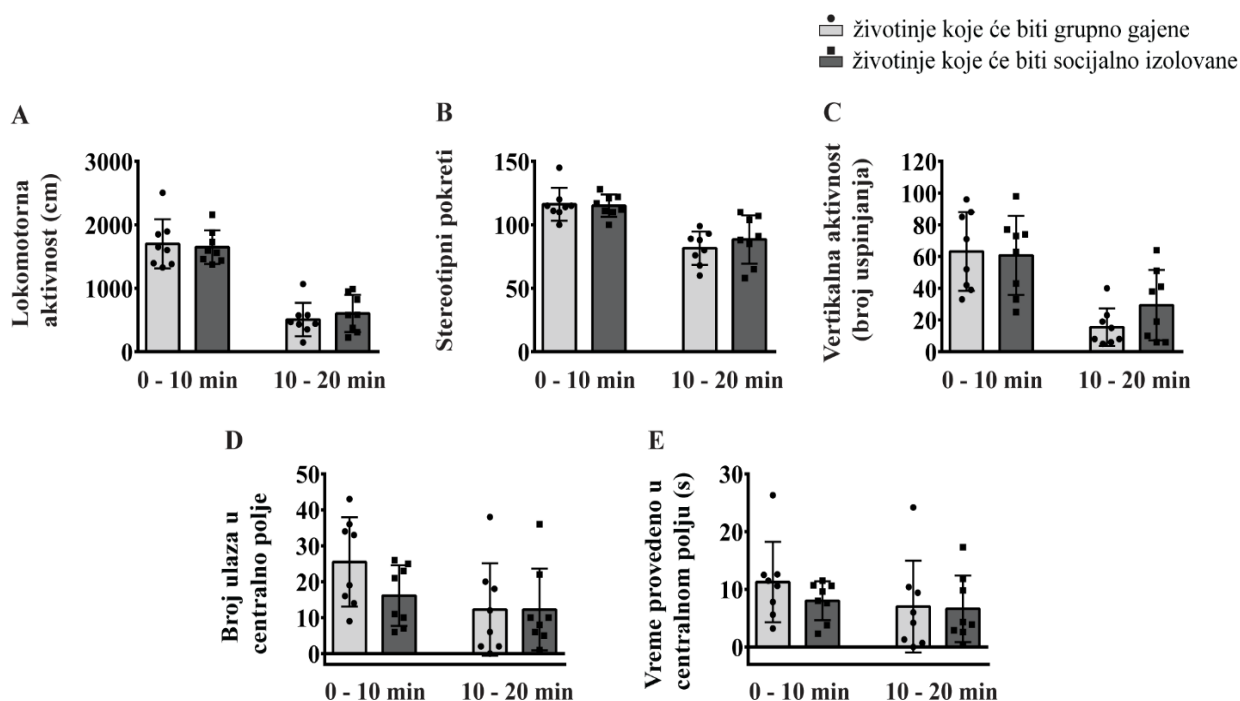
4. REZULTATI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije rezultati su podeljeni u osam celina sa potpoglavljima numerisanim od 4.1. do 4.12.

- Prvu celinu čine rezultati ispitivanja promena u psihomotornom i emocionalnom odgovoru na novinu kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije (4.1.), primenom testova otvorenog polja, novog objekta i uzdignutog krstastog lavirinta, radi procene razvoja ponašanja nalik anksioznom.
- Drugu celinu čine rezultati ispitivanja promena u psihomotornoj aktivnosti i ekspresiji inducibilnih proteinskih indikatora neuronske aktivacije (c-Fos, Egr-1) u strijatumu i mPFC nakon tretmana psihostimulativnom drogom D-AMPH, kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije (4.2.), radi procene iregularnosti u odgovoru na farmakološki stimulus sa nagrađujućim efektom koji može da ukaže na stanje nalik atipičnoj depresiji.
- Treću celinu čine rezultati testa preference saharoznog rastvora i konzumiranja hrane tokom ovog testiranja kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije (4.3.), radi procene konzumatorne hipohedonije i iregularnosti u ponašanju usmerenom ka cilju, koji se najčešće javljaju kao simptomi depresije i koriste za procenu ponašanja nalik depresivnom u animalnim modelima.
- Četvrtu celinu čine rezultati koji se odnose na ponašanje grupno gajenih i izolovanih peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji u testovima sa socijalnim stimulusom, preciznije, u trokomornom testu (4.4.-4.5.) i socijalnom olfaktornom testu (4.6.-4.7.), radi procene motivisanog socijalnog ponašanja kroz indikatore socijalne orijentacije, socijabilnosti i socijalne memorije.
- Petu celinu čine rezultati ispitivanja broja parvalbumin-pozitivnih neurona osetljivih na socijalni stres, u hipokampusu, regionu značajnom za mapiranje socijalnog u fizičkom prostoru (4.8.), kao i aktivacionog fenotipa mikroglijskih ćelija dentatnog girusa (4.9.), radi procene neuroinflamacije kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije.
- Šestu celinu čine rezultati ispitivanja odgovora peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji na dodatni stresor prekonoćnog gladovanja, praćenjem telesne mase, koncentracije hormona stresa u krvi, aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u perifernim organima i eritrocitima (4.10.), radi sagledavanja sistemskih efekata psihosocijalnog stresa i njegovog potencijala da izmeni odgovor organizma na prisustvo dodatnog stresora.
- Sedmu celinu čine rezultati koji se odnose na koncentraciju ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije (4.11.), radi potpunijeg sagledavanja sistemskih efekata psihosocijalnog stresa.
- Osmu celinu čine rezultati ispitivanja psihofizičkih karakteristika (telesna masa, psihomotorni odgovor i preferenca saharoznog rastvora u adolescenciji) potomstva roditeljske generacije koja je gajena u grupi ili izolaciji tokom dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije (4.12.), radi sagledavanja uticaja roditeljskog socijalnog iskustva na mentalno zdravlje potomstva.

4.1. Promene u psihomotornom i emocionalnom odgovoru na novinu kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije

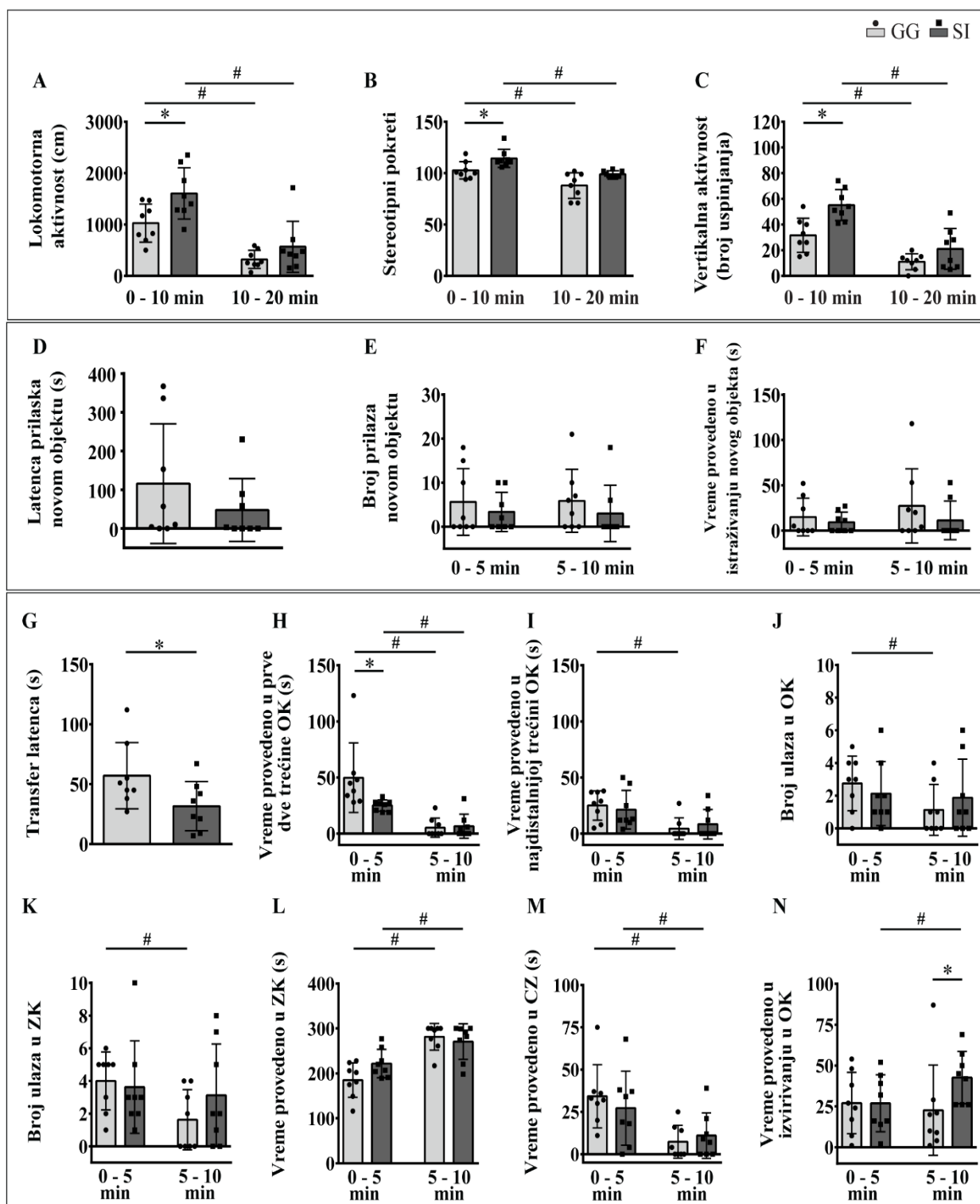
Pre definisanja uslova gajenja životinja, odnosno podele na one gajene po tri u kavezima (grupno gajene, GG) i socijalno izolovane (SI), rađen je test otvorenog polja 29. postnatalnog dana da bi se ispitalo da li postoje razlike u bazalnoj motornoj aktivnosti životinja. Kao što se može videti na slici 4.1A životinje koje će biti gajene po tri u kavezu i one koje će biti izolovane su pokazivale istu lokomotornu aktivnost, procenjivanu na osnovu pređenog puta (cm) unutar arene, tokom prvih 10 minuta testiranja, nakon čega se aktivnost životinja obe grupe smanjivala tokom sledećih 10 minuta, što je ukazalo na habituaciju životinja na uslove testiranja. Stereotipni pokreti pacova (ponavljajući/repetitivni pokreti; Slika 4.1B) i vertikalna aktivnost (broj uspinjanja/propinjanja, Slika 4.1C), koja predstavlja meru istraživanja sredine, se nisu razlikovali među grupama tokom prvih 10 minuta testiranja, da bi se zatim kod svih životinja smanjivali tokom narednih 10 minuta, što zajedno sa istim trendom primećenim i kod lokomotorne aktivnosti ukazuje na habituaciju životinja na uslove testiranja u datom vremenu (Slika 4.1A-C). Razlike u broju ulaza u centralno polje, kao i vreme provedeno u centralnom polju nisu registrovane kod ispitivanih životinja (Slika 4.1D i E).



Slika 4.1 Ponašanje peripubertetskih (P29) mužjaka pacova u otvorenoj areni pre podele na odgovarajuće eksperimentalne grupe. (A) Lokomotorna aktivnost. (B) Stereotipni pokreti. (C) Vertikalna aktivnost. (D) Broj ulaza u centralno polje. (E) Vreme provedeno u centralnom polju arene. Svaka životinja testirana i označena reprezentativnom za datu grupu je prošla sve naredne testove planirane u okviru Eksperimenta 1. Prikazani podaci su u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba (n=8 životinja po grupi).

Kako bi se utvrdile rane promene u psihomotornom i emocionalnom odgovoru na novu sredinu sa različitim anksiogenim potencijalom jedinke su ispitivane nakon nedelju dana socijalne izolacije, primenom seta adekvatnih testova. Tačnije, ispitivana je aktivnost životinja u testu otvorenog polja (Slika 4.2A-C), u odgovoru na novi objekat u poznatoj areni (Slika 4.2D-F), kao i u testu uzdignutog krstastog lavirinta (Slika 4.2G-N).

U testu otvorenog polja, socijalno izolovane životinje su pokazale hiperaktivno ponašanje u poređenju sa životinjama gajenim po tri u kavezu, što se manifestovalo povećanjem lokomotorne aktivnosti (pređeni put u centimetrima u areni), stereotipnih pokreta (ponavljajući/repetitivni pokreti)

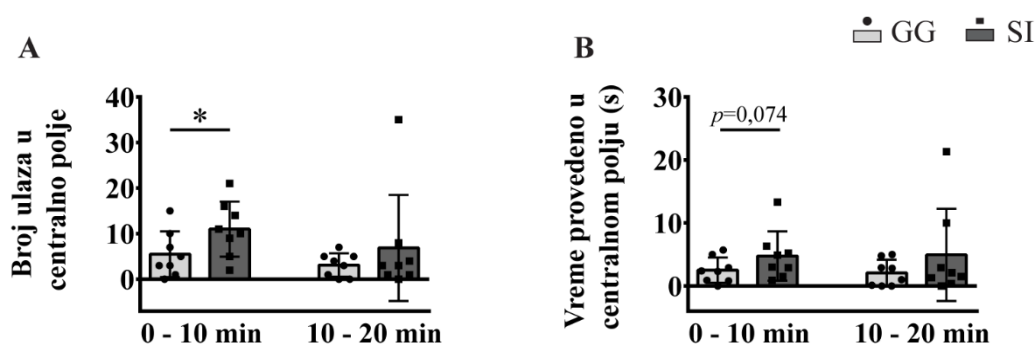


Slika 4.2 Psihomotorni i emotivni odgovor na novinu sa različitim anksiogenim potencijalom kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje (P29–P36, rana adolescencija). Testovi su rađeni na rano adolescentnim životinjama (P36 – test otvorenog polja, test novog objekta; P37 – test uzdignutog krstastog lavirinta). (A–C) Test otvorenog polja. (D–F) Test novog objekta. (G–N) Test uzdignutog krstastog lavirinta. Prikazani podaci su u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba ($n=8$ životinja po grupi). Poređenja između i unutar grupa tokom vremena su prikazane u vidu linija iznad grafičkih stubova. GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezima; SI – socijalno izolovane životinje. * $p<0,05$ u odnosu na grupno gajenu kontrolu, U -test; # $p<0,05$ prvih 5 u odnosu na drugih 5 minuta testiranja, Wilcoxon test. OK–otvoren (svetli) krak, ZK–zatvoren (tamni) krak, CZ–centralna zona. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2021.

i vertikalne aktivnosti (broj usipnjanja/propinjanja) tokom prvih 10 minuta testiranja (Slika 4.2A-C, $*p<0,05$, U -test). Tokom sledećih 10 minuta aktivnost životinja značajno se smanjivala, bez razlike među grupama (Slika 4.2A-C), što ukazuje na habituaciju životinja na uslove testiranja u datom vremenu, tj. njihovo prilagođavanje (Slika 4.2A-C, $\#p<0,05$, Wilcoxon test).

Dodatno su analizirani i parametri, kao što su: broj ulaza i vreme provedeno u centralnom polju otvorene arene (Slika 4.3), koji su bili povećani kod socijalno izolovanih životinja tokom prvih 10 minuta testa (Slika 4.3A i B, $*p<0,05$, U -test), što ukazuje na smanjenu averziju ka izrazito otvorenim delovima arene i može se tumačiti kao smanjeno anksiozno ponašanje, a mogla bi biti i posledica generalne hiperaktivnosti tokom prvih 10 minuta upoznavanja sa novom sredinom.

U testu novog objekta životinjama obe grupe je bio potreban isti period vremena da priđu nepoznatom objektu (Slika 4.2D, latenca prilaska novom objektu). Takođe, broj prilaza novom objektu (Slika 4.2E), kao i vreme istraživanja novog objekta (Slika 4.2F) se nisu razlikovali između dve grupe životinja. Ovi parametri ukazuju da socijalna izolacija tokom rane adolescencije ne dovodi do pojave ponašanja sličnog anksioznom u testu novog objekta.



Slika 4.3 Broj ulaza (A) i vreme (B) provedeno u centralnom polju otvorene arene u testu otvorenog polja kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje (P29–P36, rana adolescencija). Test je rađen na rano adolescentnim životinjama P36. $*p<0,05$, u odnosu na grupno gajenu kontrolu, U -test. GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezima; SI – socijalno izolovane životinje.

U testu uzdignutog krstastog lavirinta, socijalno izolovane životinje su imale kraću transfer latencu, odnosno manji period vremena im je bio potreban do prvog ulaska u tamni deo kraka, i provodile su značajno manje vremena u prve dve trećine otvorenih krakova tokom prvih 5 minuta trajanja testa u odnosu na grupno gajene kontrole (Slika 4.2G i H, $*p<0,05$, U -test), što su indikatori ponašanja nalik anksioznom kod socijalno izolovanih životinja. Statistički značajne razlike između životinja dve eksperimentalne grupe nisu primećene u odnosu na vreme koje su provodile u najdistalnijoj trećini otvorenog kraka (Slika 4.2I), kao ni broju ulaza u otvorene i zatvorene krake (Slika 4.2J i K). Vreme provedeno u zatvorenim kracima i centralnoj zoni uzdignutog krstastog lavirinta je bilo slično kod obe grupe (Slika 4.2L i M).

Analiza ponašanja eksperimentalnih pacova u uzdignutom krstastom lavirintu tokom 10 minutnog perioda testiranja (ponašanje tokom prvih 5 minuta u poređenju sa ponašanjem tokom drugih 5 minuta testiranja) je ukazala na značajne razlike u odgovoru grupno gajenih i socijalno izolovanih jedinki. Pacovi kontrolne grupe su manje vremena provodili u najdistalnijoj trećini otvorenih kraka (predstavlja izrazito anksioznu sredinu; Slika 4.2I, $\#p<0,05$, Wilcoxon test) i manji broj puta su ulazili u otvorene i zatvorene krake (Slika 4.2J-K, $\#p<0,05$, Wilcoxon test) u tokom drugih 5 minuta testiranja, što nije bio slučaj kod izolovanih životinja, jer se njihova aktivnost po pitanju ova tri parametra nije smanjivala kroz vreme. Takođe, socijalno izolovane životinje su učestalije izvirivale i provodile više vremena u izvirivanju (engl. *stretched-attended postures*) tokom testiranja (Slika 4.2N, $\#p<0,05$), ali i u odnosu na pacove kontrolne grupe tokom drugih 5 minuta testiranja (Slika 4.2N, $*p<0,05$), što ukazuje na sklonost ka rizičnom ponašanju.

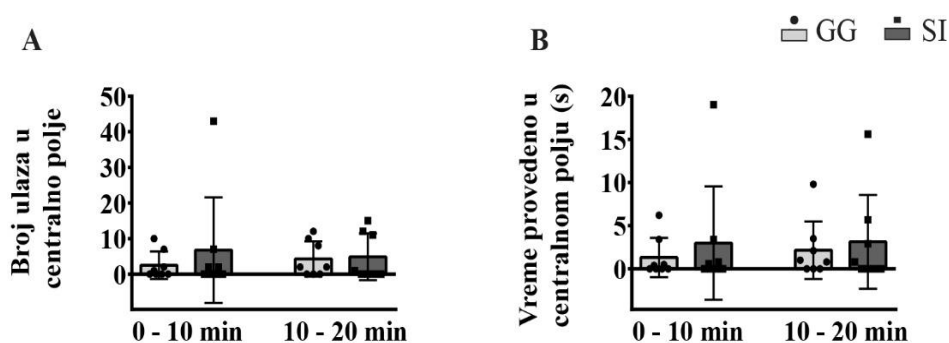
Dobijeni rezultati ukazuju da u Testu uzdignutog krstastog lavirinta socijalno izolovane životinje pokazuju ponašanje nalik anksioznom (kraća transfer latenca i manje vremena provedenog u prve dve trećine otvorenih kraka) i duže se bave procenom rizika (izvirivanje i protezanje iz otvorenih u zatvorene krake i centar se kod ovih životinja nisu menjali tokom testiranja). Takođe, ove životinje pokazuju sklonost ka anksioznim delovima lavirinta (jer se broj ulaza u otvorene krake, kao i afinitet za najdistalniji deo otvorenog kraka, koji predstavlja najanksiogeniji deo test aparata, kod ovih životinja nisu menjali tokom testiranja) i neprilagodljivost na lavirint (jer se broj ulaza u zatvorene krake, što je indikator generalne aktivnosti, kod socijalno izolovanih životinja nije menjao kroz vreme). Za razliku od socijalno izolovanih životinja, grupno gajene životinje su ispoljile smanjeni interes za izrazito anksiozene delove aparature tokom vremena.

Sumarno, rezultati dobijeni u ovom segmentu istraživanja ukazuju da je jedna od ranih ponašajnih posledica socijalne izolacije kod peripubertetskih pacova prolazna hiperaktivnost u novoj sredini, iskazana u testu otvorenog polja, odsustvo promena u odgovoru na nov objekat u poznatoj sredini (iskazana u testu novog objekta), kao i izmenjen odgovor na izrazito anksioznu sredinu otvorenih kraka uzdignutog krstastog lavirinta, koja ove životinje na određeni način stimuliše da joj se izlažu i procenjuju je. Dobijeni rezultati su takođe ukazali da prilagodljivost rano adolescentnih socijalno izolovanih životinja na novu sredinu zavisi od karakteristika same sredine, jer je u testu otvorenog polja prilagodljivost očuvana, dok u testu uzdignutog krstastog lavirinta nije. Dobijeni rezultati idu u prilog praksi korišćenja više testova ponašanja, koji se zasnivaju na paradigmi slobodnog istraživanja ali imaju različite karakteristike, u svrhu detaljne procene psihomotornog i emocionalnog odgovora glodara na novinu.

Detaljni podaci testova koji su korišćeni u statističkoj analizi, kao i dobijeni parametri uključujući i tačne p vrednosti date su u Tabeli 1.

4.2. Psihomotorni i neuronski odgovor na dekstroamfetamin kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije

Da bi se procenilo da li socijalna izolacija peripubertetskih pacova dovodi do ispoljavanja stanja nalik atipičnoj depresiji, ispitivane su promene u psihomotornom odgovoru na psihostimulativnu drogu dekstroamfetamina (D-AMPH), farmakološkog stimulusa sa nagrađujućim efektom. Životinjama je intraperitonealno injektiran D-AMPH u dozi od 1,5 mg/kg, za koju je poznato da kod glodara izaziva povećanje lokomotorne aktivnosti, kao bezuslovni odgovor na nagrađujući efekat droge. Osim toga, praćena je sinteza proteina ranog ćelijskog odgovora c-FOS i EGR1, biohemijskih indikatora neuronske aktivnosti, u medijalnoj prefrontalnoj zoni kore velikog mozga (mPFC) i strijatumu, moždanih struktura za koje je poznato da menjaju neuronsku aktivnost u odgovoru na tretman D-AMPH.



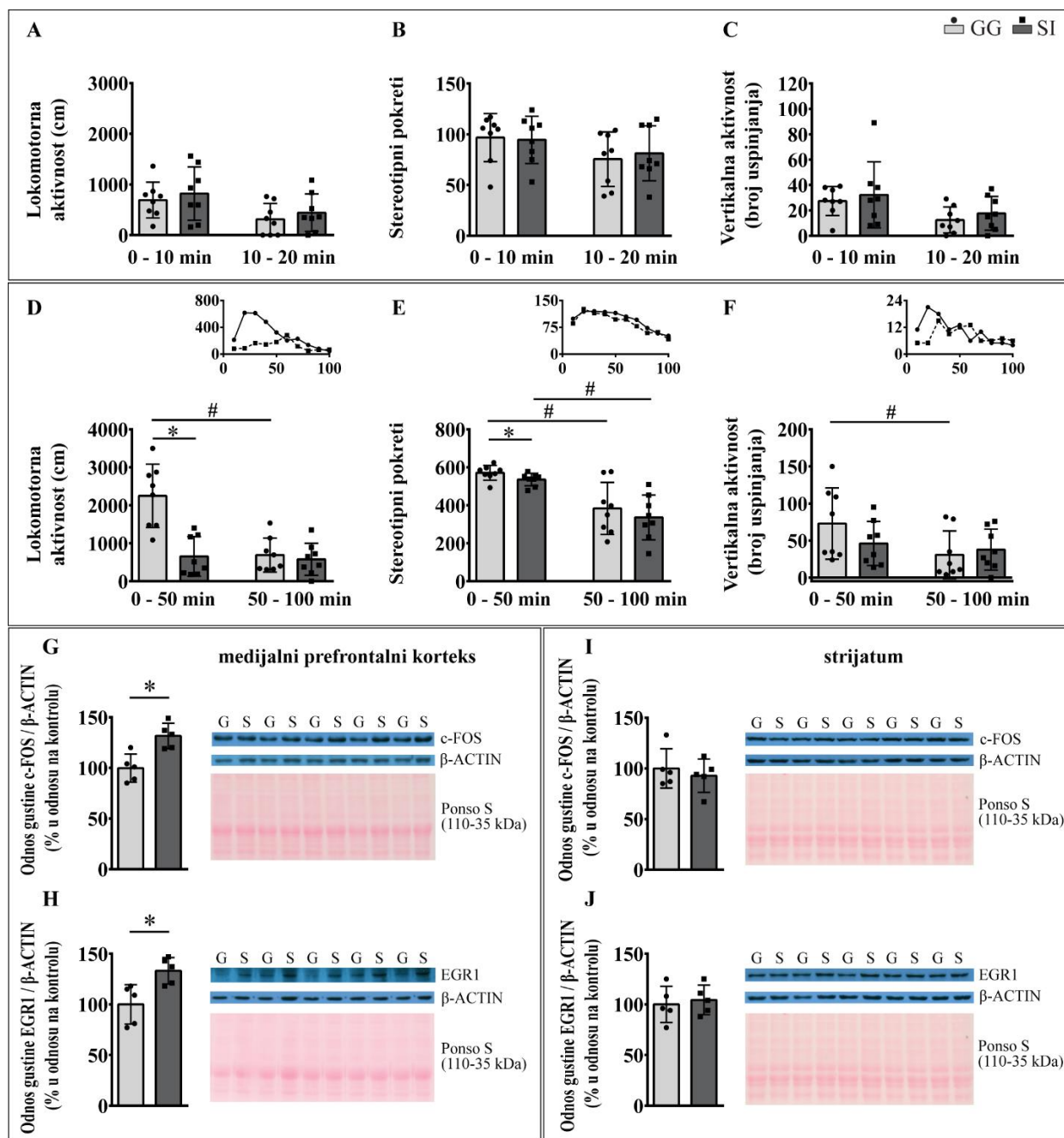
Slika 4.4 Broj ulaza (A) i vreme (B) provedeno u centralnom polju otvorene arene u testu otvorenog polja kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija). Test je raden na srednje adolescentnim životinjama, P43. GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezima; SI – socijalno izolovane životinje.

Nakon dve nedelje gajenja u grupi ili socijalnoj izolaciji, tj. u 43. postnatalnom danu (P43), testiran je broj ulaza i vreme provedeno u centralnom polju otvorene arene. Životinjama u obe ispitivane grupe je izmeren sličan broj ulaza i vreme provedeno u centralnom delu arene (Slika 4.4A i B), a pokazali su i sličnu motornu i eksploratornu aktivnost u testu otvorenog polja (Slika 4.5A-C). Ovakav rezultat ukazuje da je hiper-reaktivnost uočena kod životinja nakon jedne nedelje života u socijalnoj izolaciji prolaznog karaktera i da se ne produbljuje srazmerno dužini trajanja ovog uslova.

Međutim, nakon tretmana D-AMPH (1,5 mg/kg) izolovane životinje su pokazale slabiji lokomotorni i stereotipni odgovor u odnosu na kontrolne životinje tokom inicijalnih 50 minuta testa (Slika 4.5D i E, * $p < 0,05$, *U*-test). Vertikalna aktivnost, kao parametar istraživačkog ponašanja, je bila slična kod obe grupe životinja tokom inicijalnih 50 minuta testa (Slika 4.5F). Takođe, dok je kod grupno gajenih životinja pokazano smanjenje sva tri ispitivana parametra tokom drugih 50 minuta testiranja (Slika 4.5D-F, # $p < 0,05$, Wilcoxon test), kod izolovanih životinja smanjenje je uočeno jedino merenjem stereotipnih pokreta (Slika 4.5E, # $p < 0,05$). Ovaj rezultat dodatno ukazuje da su dva glavna parametra eksploratorne aktivnosti glodara i zainteresovanosti za sredinu (lokomotorna aktivnost kao mera horizontalne istraživačke aktivnosti glodara i uspinjanje kao mera vertikalne istraživačke aktivnosti) neadekvatno stimulisani psihostimulativnim tretmanom kod socijalno izolovanih jedinki tokom prvih 50 minuta testiranja, kada se očekuje najveći intenzitet odgovora (Slika 4.5D, E-F; tačan profil vremenskih kriva je uočljiv sa malih insertovanih grafikona u okviru ovih slika), a što je preduslov za detekciju gradacije horizontalne i vertikalne motorne aktivnosti tokom vremena nakon psihostimulativnog tretmana. Imajući u vidu da motorni odgovor izazvan primenom D-AMPH kod glodara odražava безусловni odgovor na nagrađujući efekat droge, ovakav rezultat ukazuje da je nagrađujući efekat D-AMPH kod socijalno izolovanih jedinki slabiji u poređenju odgovorom kontrolnih, grupno gajenih jedinki.

Slabiji motorni odgovor izolovanih životinja na D-AMPH tokom inicijalnih 50 minuta bio je praćen povećanom ekspresijom biohemijskih markera neuronske aktivnosti c-FOS i EGR1, u medijalnoj prefrontalnoj zoni kore velikog mozga (Slika 4.5G i H, * $p < 0,05$, *t*-test), bez značajnih promena ovih markera u strijatumu (Slika 4.5I i J), što ukazuje na potencijalnu vezu između povećane aktivnosti prefrontalne zone kore velikog mozga i slabijeg motornog odgovora na D-AMPH.

Detaljni podaci testova koji su korišćeni u statističkoj analizi kao i dobijeni parametri uključujući i tačne *p* vrednosti date su u Tabeli 1.



Slika 4.5 Motorni i neuronski odgovor na D-AMPH kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija). Testovi su rađeni na srednje adolescentnim životinjama P43. (A–C) Habitucija unutar eksperimentalne arene. (D–F) Motorni odgovor na D-AMPH (1,5 mg/kg). (G–J) Analiza moždanog tkiva na D-AMPH-indukovanu ekspresiju biohemijskih indikatora neuronske aktivnosti (c-FOS i EGR1) u medijalnoj prefrontalnoj zoni kore velikog mozga i strijatumu. Podaci su prikazani u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba ($n=8$ po grupi). Paneli G, H, I i J sadrže reprezentativne imunoblotope i membrane obojene Ponso S bojom. GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezu, SI – socijalno izolovane životinje. $*p<0,05$, t-test za nezavisne uzorke. Za podatke dobijene u testu otvorenog polja poređenja između i unutar grupa tokom vremena su predstavljena u vidu linija iznad grafičkih kolona; $*p<0,05$, u odnosu nagrupno gajene kontrole, U-test; # $p<0,05$, pri 5 u odnosu na drugih 5 minuta testiranja, Wilcoxon test. Preuzeto i modifikovano od Potrebčić i sar., 2021.

4.3. Konzumatorna hipohedonija i konzumiranje hrane kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije

Na slici 4.6. prikazani su rezultati merenja preference 1% i 20% rastvora saharoze, kao i količina konzumirane hrane po gramu telesne mase adolescentnih pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom 7 i 14 dana. Kako se na slici može videti, preferenca za 1% rastvor saharoze, merena tokom 2 uzastopna dana kao prosečna vrednost potrošnje rastvora, bila je manja kod adolescentnih pacova nakon 7 (Slika 4.6A, * $p < 0,05$, U -test) i 14 dana izolacije (Slika 4.6B, * $p < 0,05$) u poređenju sa grupno gajenim životinjama. Takođe, kod socijalno izolovanih životinja smanjena preferenca saharoze je bila značajno izraženija nakon dvonedeljne izolacije u poređenju sa jednonedeljnom (Slika 4.6A i B, # $p < 0,05$, Wilcoxon test). Ovi rezultati ukazuju da socijalna izolacija dovodi do pojave konzumatorne hipohedonije, koja se često povezuje sa simptomima depresije, kao i da se u ovom modelu konzumatorna hipohedonija kod socijalno izolovanih peripubertetskih pacova vremenom produbljuje.

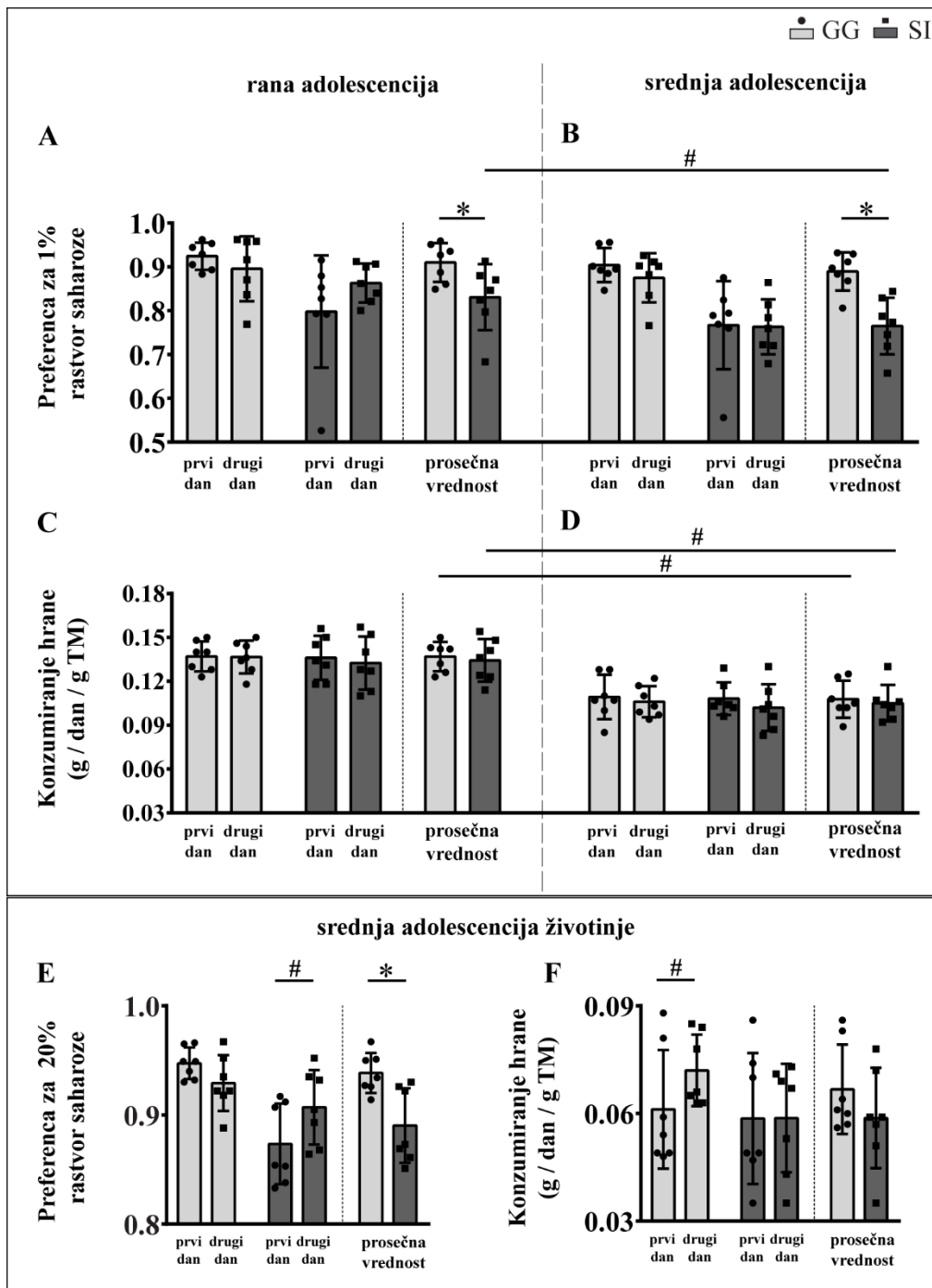
Promene u količini pojedene hrane nisu primećene između dve grupe životinja tokom testiranja, ali je primećen trend smanjenja unosa hrane kod obe grupe pacova u periodu od rane ka srednjoj adolescenciji (Slika 4.6C i D, # $p < 0,05$, Wilcoxon test), što ukazuje da je u pitanju razvojno-specifični fenomen kada su u pitanju laboratorijski pacovi gajeni u kontrolisanim/standardnim uslovima. Promene u drugom u odnosu na prvi dan merenja nisu detektovane ni u jednoj eksperimentalnoj grupi ni za jedan od ispitivanih parametara (Slika 4.6A-D).

Preferenca za 20% rastvor saharoze (prosečna vrednost potrošnje rastvora je računata na osnovu merenja za 2 uzastopna dana) je bila manja kod socijalno izolovanih životinja u odnosu na grupno gajene (Slika 4.6E, * $p < 0,05$) bez značajnih promena u prosečnoj količini konzumirane hrane (Slika 4.6F). Ipak, ovde je postojala bitna razlika: podjednako konzumiranje 20% rastvora saharoze kod kontrolnih životinja u dva uzastopna dana merenja je bilo praćeno povećanim konzumiranjem hrane u drugom danu testiranja (Slika 4.6F, # $p < 0,05$, Wilcoxon test), dok povećanje preference za 20% rastvor saharoze kod izolovanih životinja u dva uzastopna dana merenja (Slika 4.6E, # $p < 0,05$) nije bilo praćeno povećanim unosom hrane (Slika 4.6F).

Preferenca za 20% rastvor saharoze (prosečna vrednost potrošnje rastvora je računata na osnovu merenja za 2 uzastopna dana) je bila manja kod socijalno izolovanih životinja u odnosu na grupno gajene (Slika 4.6E, * $p < 0,05$) bez značajnih promena u prosečnoj količini konzumirane hrane (Slika 4.6F). Ipak, ovde je postojala bitna razlika: podjednako konzumiranje 20% rastvora saharoze kod kontrolnih životinja u dva uzastopna dana merenja je bilo praćeno povećanim konzumiranjem hrane u drugom danu testiranja (Slika 4.6F, # $p < 0,05$, Wilcoxon test), dok povećanje preference za 20% rastvor saharoze kod izolovanih životinja u dva uzastopna dana merenja (Slika 4.6E, # $p < 0,05$) nije bilo praćeno povećanim unosom hrane (Slika 4.6F).

Ovi rezultati ukazuju da socijalna izolacija tokom peripuberteta kod pacova narušava pozitivni uticaj konzumiranja visokoprocenatnog rastvora saharoze na konzumiranje hrane kao motivisano ponašanje, odnosno remeti ravnotežu između konzumatornog i motivisanog ponašanja.

Statističko upoređivanje i tačne p vrednosti su date u Tabeli 1.



Slika 4.6 Test preference saharoznog rastvora i konzumiranje hrane kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija). Testirane su rano adolescentne (P36) i srednje adolescentne životinje (P43). Merenje konzumiranja 1% rastvora saharoze nakon jedne (A,C) i dve (B,D) nedelje. Merenja konzumiranja 20% rastvora saharoze (neposredno nakon praćenja 1% rastvora saharoze) i hrane nakon dve nedelje eksperimenta (E,F). Za svaku tačku merenja od interesa mere su date za svaki pojedinačno od dva uzastopna dana testiranja, kao i njihove prosečne vrednosti. Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba ($n=7$ SI; $n=7$ GG – 3 životinje iz istog legla po kavezu). Poređenja između i unutar grupa tokom definisanog vremena su prikazana u vidu linija iznad grafičkih stubova. * $p<0,05$, u odnosu na grupno gajenu kontrolu, U -test; # $p<0,05$, pri 5 u odnosu na drugih 5 minuta testiranja, Wilcoxon test. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2021.

Tabela 1. Sumirani prikaz analiziranih parametara, testova korišćenih u statističkoj analizi, dobijenih p vrednosti i broja korišćenih životinja (n) za rezultate prikazane u okviru podnaslova 4.1.-4.3. Analizirani parametri kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43, rana i srednja adolescencija). GG - grupno gajene životinje po tri u kavezu, SI - socijalno izolovane životinje.

Ponašanje peripubertetskih (P29) mužjaka pacova u otvorenoj areni pre podele na odgovarajuće eksperimentalne grupe				
n = 8 (životinja po grupi)	buduće SI vs. buduće GG životinje			
	U - test			
	0 - 10 minuta		10 - 20 minuta	
Slika 4.1A Lokomotorna aktivnost	$p = 0,916$	$Z = 0,105$	$p = 0,462$	$Z = -0,735$
Slika 4.1B Stereotipni pokreti	$p = 0,793$	$Z = -0,263$	$p = 0,431$	$Z = -0,788$
Slika 4.1C Vertikalna aktivnost	$p = 0,875$	$Z = 0,158$	$p = 0,227$	$Z = -1,208$
Slika 4.1D Broj ulaza u CP	$p = 0,141$	$Z = 1,470$	$p = 0,875$	$Z = -0,158$
Slika 4.1E Vreme provedeno u CP	$p = 0,227$	$Z = 1,208$	$p = 0,834$	$Z = -0,210$
Psihomotorni i emotivni odgovor na novinu sa različitim anksiogenim potencijalom kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije				
n = 8 (životinja po grupi)	U - test		Wilcoxon test	
	SI vs. GG		GG	SI
	0 - 10	10 - 20	[0 - 10] vs. [10 - 20]	[0 - 10] vs. [10 - 20]
Slika 4.2A Lokomotorna aktivnost	$p = 0,021$	$p = 0,345$	$p = 0,012$	$p = 0,011$
	$Z = -2,310$	$Z = -0,945$	$Z = 2,521$	$Z = 2,521$
Slika 4.2B Stereotipni pokreti	$p = 0,018$	$p = 0,074$	$p = 0,018$	$p = 0,012$
	$Z = -2,363$	$Z = -1,785$	$Z = 2,366$	$Z = 2,521$
Slika 4.2C Vertikalna aktivnost	$p = 0,006$	$p = 0,318$	$p = 0,012$	$p = 0,012$
	$Z = -2,731$	$Z = -0,998$	$Z = 2,521$	$Z = 2,521$
	U - test		Wilcoxon test	
	SI vs. GG		GG	SI
	0 - 5	5 - 10	[0 - 5] vs. [5 - 10]	[0 - 5] vs. [5 - 10]
Slika 4.2E Broj prilaza NO	$p = 0,713$	$p = 0,227$	$p = 0,893$	$p = 0,715$
	$Z = 0,368$	$Z = 1,208$	$Z = 0,135$	$Z = 0,365$
Slika 4.2F Vreme istraživanja NO	$p = 0,753$	$p = 0,270$	$p = 0,834$	$p = 0,465$
	$Z = 0,315$	$Z = 1,103$	$Z = 0,210$	$Z = 0,730$
Slika 4.2H Vreme provedeno u prve dve trećine OK	$p = 0,002$	$p = 0,793$	$p = 0,012$	$p = 0,017$
	$Z = 3,046$	$Z = -0,263$	$Z = 2,521$	$Z = 2,380$
Slika 4.2I Vreme provedeno u najdistalnijoj trećini OK	$p = 0,600$	$p = 0,599$	$p = 0,017$	$p = 0,093$
	$Z = 0,525$	$Z = -0,525$	$Z = 2,380$	$Z = 1,680$
Slika 4.2J Broj ulaza u OK	$p = 0,401$	$p = 0,529$	$p = 0,042$	$p = 0,600$
	$Z = 0,840$	$Z = -0,630$	$Z = 2,028$	$Z = 0,524$
Slika 4.2K Broj ulaza u ZK	$p = 0,401$	$p = 0,345$	$p = 0,012$	$p = 0,345$
	$Z = 0,840$	$Z = -0,945$	$Z = 2,521$	$Z = 0,943$
Slika 4.2L	$p = 0,083$	$p = 0,462$	$p = 0,012$	$p = 0,012$

Vreme provedeno u ZK	$Z = -1,733$	$Z = 0,735$	$Z = 2,521$	$Z = 2,521$
Slika 4.2M Vreme provedeno u CZ	$p = 0,637$	$p = 0,674$	$p = 0,012$	$p = 0,018$
	$Z = 0,473$	$Z = -0,420$	$Z = 2,521$	$Z = 2,366$
Slika 4.2N Vreme provedeno u izvirivanju u OK	$p = 0,916$	$p = 0,027$	$p = 0,401$	$p = 0,042$
	$Z = 0,105$	$Z = -2,205$	$Z = 0,840$	$Z = 2,030$
SI vs. GG, <i>U</i> - test				
Slika 4.2D Latenca prilaska NO	$p = 0,294, \quad Z = 1,050$			
Slika 4.2G Transfer latenca	$p = 0,046, \quad Z = 1,995$			
	0-10 minuta		10-20 minuta	
Slika 4.3A Broj ulaza u CP	$p = 0,046$	$Z = -1,995$	$p = 0,600$	$Z = 0,525$
Slika 4.3B Vreme provedeno u CP	$p = 0,074$	$Z = -1,785$	$p = 1,000$	$Z = 0,000$
Motorni i neuronski odgovor na D-AMPH kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije				
n = 8 (životinja po grupi)	SI vs. GG, <i>U</i> - test			
	0-10 minuta		10-20 minuta	
Slika 4.4A Broj ulaza u CP	$p = 0,875$	$Z = -0,158$	$p = 0,958$	$Z = 0,053$
Slika 4.4B Vreme provedeno u CP	$p = 0,793$	$Z = -0,263$	$p = 0,875$	$Z = 0,158$
	<i>U</i> - test		<i>Wilcoxon test</i>	
	SI vs. GG		GG	SI
minuti testiranja	0 - 10	10 - 20	[0 - 10] vs. [10 - 20]	[0 - 10] vs. [10 - 20]
Slika 4.5A Lokomotorna aktivnost	$p = 0,600$	$p = 0,318$	$p = 0,012$	$p = 0,012$
	$Z = -0,525$	$Z = -0,998$	$Z = 2,521$	$Z = 2,521$
Slika 4.5B Stereotipni pokreti	$p = 0,916$	$p = 0,674$	$p = 0,012$	$p = 0,025$
	$Z = 0,105$	$Z = -0,420$	$Z = 2,521$	$Z = 2,240$
Slika 4.5C Vertikalna aktivnost	$p = 0,753$	$p = 0,431$	$p = 0,012$	$p = 0,012$
	$Z = -0,315$	$Z = -0,788$	$Z = 2,521$	$Z = 2,521$
	<i>U</i> - test		<i>Wilcoxon test</i>	
	SI vs. GG		GG	SI
minuti testiranja	0 - 50	50 - 100	[0 - 50] vs. [50 - 100]	[0 - 50] vs. [50 - 100]
Slika 4.5D Lokomotorna aktivnost	$p = 0,002$	$p = 0,752$	$p = 0,018$	$p = 0,575$
	$Z = 3,046$	$Z = 0,315$	$Z = 2,380$	$Z = 0,560$
Slika 4.5E Stereotipni pokreti	$p = 0,027$	$p = 0,563$	$p = 0,017$	$p = 0,017$
	$Z = 2,205$	$Z = 0,578$	$Z = 2,380$	$Z = 2,380$
Slika 4.5F Vertikalna aktivnost	$p = 0,156$	$p = 0,563$	$p = 0,012$	$p = 0,575$
	$Z = 1,418$	$Z = -0,578$	$Z = 2,521$	$Z = 0,560$
n = 5 (životinja po grupi)	SI vs. GG, <i>t</i> - test			
	t	df	p	
Slika 4.5G Odnos gustine c-FOS/ β -AKTIN mPFC	$t = -3,814$	$df = 8$	$p = 0,005$	
Slika 4.5H Odnos gustine EGR1/ β -AKTIN mPFC	$t = -2,593$	$df = 8$	$p = 0,032$	
Slika 4.5I Odnos gustine c-FOS/ β -AKTIN STR	$t = 0,635$	$df = 8$	$p = 0,543$	

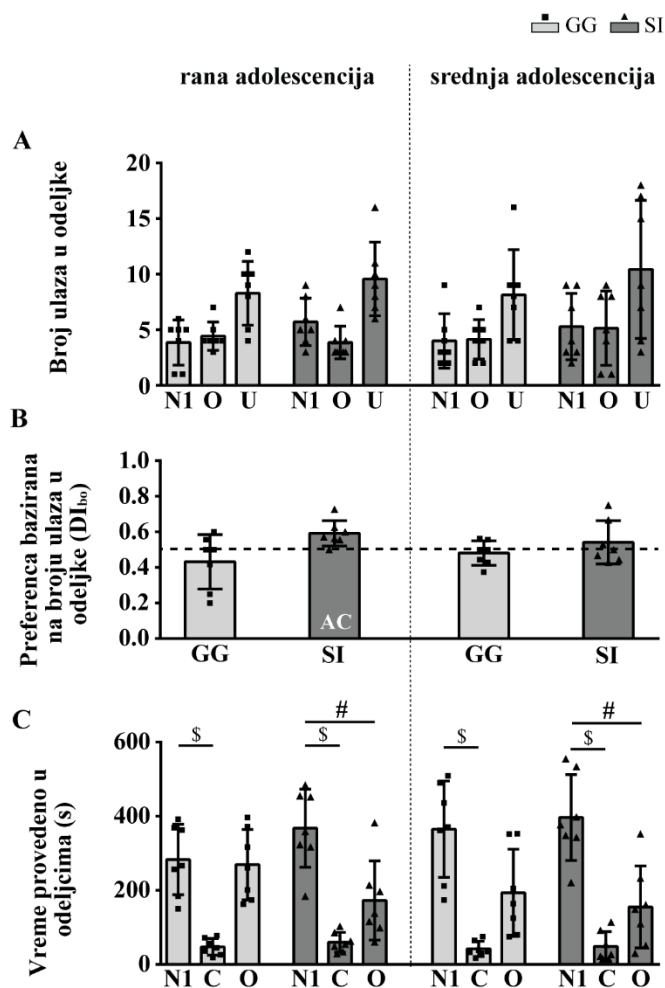
Slika 4.5J Odnos gustine EGR1/ β -AKTIN STR		$t = -0,427$	$df = 8$	$p = 0,680$	
Test preference saharoznog rastvora i konzumiranje hrane kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije					
n = 7 (životinja po grupi)	Wilcoxon test		U - test	Wilcoxon test	
	prvo vs. drugo merenje		prosečna vrednost SI vs. GG	prosečna vrednost nakon jedne nedelje vs. prosečna vrednost nakon dve nedelje	
	GG	SI		GG	SI
Slika 4.6A Preferenca za 1% rastvor saharoze Rano adolescentne životinje	$p = 0,310$ $Z = 1,014$	$p = 0,237$ $Z = 1,183$	$p = 0,025$ $Z = 2,236$		
Slika 4.6B Preferenca za 1% rastvor saharoze Srednje adolescentne životinje	$p = 0,128$ $Z = 1,521$	$p = 0,612$ $Z = 0,507$	$p = 0,004$ $Z = 2,875$	$p = 0,128$ $Z = 1,521$	$p = 0,018$ $Z = 2,366$
Slika 4.6C Konzumiranje hrane Rano adolescentne životinje	$p = 0,917$ $Z = 0,105$	$p = 0,499$ $Z = 0,676$	$p = 0,609$ $Z = 0,511$		
Slika 4.6D Konzumiranje hrane Srednje adolescentne životinje	$p = 0,237$ $Z = 1,183$	$p = 0,310$ $Z = 1,014$	$p = 0,749$ $Z = 0,319$	$p = 0,018$ $Z = 2,366$	$p = 0,018$ $Z = 2,366$
Slika 4.6E Preferenca za 20% rastvor saharoze	$p = 0,063$ $Z = 1,859$	$p = 0,018$ $Z = 2,366$	$p = 0,015$ $Z = 2,427$		
Slika 4.6F Konzumiranje hrane	$p = 0,027$ $Z = 2,197$	$p = 0,735$ $Z = 0,314$	$p = 0,250$ $Z = 1,150$		

4.4. Socijalno ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije - preferenca socijalnog u odnosu na nesocijalni kontekst u Trokomornom testu

4.4.1. Broj ulaza i vreme provedeno u odeljku sa novom jedinkom u odnosu na odeljak sa objektom (socijalna orijentacija - preferenca socijalnog prostora)

Na slici 4.7 prikazani su rezultati merenja ponašanja socijalne orijentacije u Trokomornom testu. Parametri koji su bili mereni su broj ulazaka, kao i vreme provedeno u odeljcima sa socijalnom novinom N1, praznim kavezom O ili centralnom odeljku C. Broj ulaza u odeljak N1 sa socijalnim stimulusom (nova jedinka 1 unutar rešetkastog kaveza) i odeljak O bez socijalnog stimulusa (prazan rešetkasti kavez) bio je isti kod svih eksperimentalnih grupa životinja, osim kod socijalno izolovanih pacova nakon nedelju dana kod kojih je bilo povećano interesovanje za odeljak N1 (Slika 4.7A). Usled toga, relativna preferenca za socijalni (N1) u odnosu na nesocijalni (O) prostor primećena je jedino kod ove grupe izolovanih životinja kod kojih je diskriminacioni indeks baziran na broju ulaza u odeljke (DI_{bo} ; broj ulaza u odeljak sa N1/broj ulaza u odeljak N1+O) bio iznad nivoa slučajnosti (0,5) (Slika 4.7B; t-test: $p=0,014$, $t=3,428$, $df=6$). Nakon dve nedelje gajenja u definisanim socijalnim uslovima, kada jedinke dostižu srednju adolescentnu fazu, nije uočena razlika u preferenci odeljaka. Dvofaktorska ANOVA analiza, sa faktorima *društveno okruženje* i *maturacija* u datim uslovima društvenog okruženja je pokazala da za parametre od interesa (broj ulaza u N1 i O odeljak, kao i ukupan broj ulaza (U) i DI_{bo}) značajne promene postoje jedino u parametru DI_{bo} i to za faktor *društveno okruženje* ($F_{(1,12)}=5,864$, $p=0,032$).

Sve ispitivane životinje su više vremena provodile u N1 odeljku nego u centralnom odeljku (C) (Slika 4.7C; $^{\$}p < 0,001$, t-test), dok je vreme provedeno u odeljku N1 u odnosu na vreme provedeno u odeljku O bilo više jedino kod SI pacova i to u obe vremenske tačke, tj. nakon nedelju dana gajenja u definisanim socijalnim uslovima, kada jedinke dostižu punu ranu adolescenciju (Slika 4.7C;



Slika 4.7 Trokomorni test: socijalna orijentacija peripubertetskih mužjaka gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija). Testovi su rađeni na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. (A) Broj ulaza u odeljke sa socijalnim stimulusom (nova jedinka – N1) i prazan kavez (objekat – O), kao i ukupan broj ulaza (U). (B) Diskriminacioni indeks baziran na broju ulaza u odeljke (DI_{bo}), koji odražava aspekt „želje” boravka u socijalnom (N1) odeljku. (C) Vreme provedeno u N1, O ili C odeljku, koji odražava aspekt „sviđanja” socijalnog (N1) u odnosu na druga dva odeljka; AC – značajno iznad nivoa slučajnosti (0,5); $^{\$}p \leq 0,001$ (vreme provedeno u N1 odeljku u odnosu na vreme provedeno u C odeljku); $^{\#}p \leq 0,05$ (vreme provedeno u N1 odeljku u odnosu na vreme provedeno u O odeljku). GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2022a.

$^{\#}p=0,049$), i nakon dve nedelje gajenja u definisanim socijalnim uslovima kada jedinke dostižu srednju adolescentnu fazu ($^{\#}p=0,029$).

Vreme provedeno u N1 odeljku, nesocijalnom O odeljku i centralnom C odeljku se nije značajno razlikovalo između eksperimentalnih grupa bez obzira na fazu adolescencije (faktor *maturacije*), kao ni uslova društvenog okruženja - gajene po tri u kavezima i socijalno izolovane (faktor različitog *društvenog okruženja*). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući *p* vrednosti, su predstavljeni u Tabeli 2.

Rezultati ovog dela eksperimenta ukazuju da tokom faze socijalnosti u Trokomornom testu, grupno gajeni adolescentni pacovi nemaju preferencu za socijalni prostor ni kroz apetitivno (broj prilaza) ni konzumatorno (vreme istraživanja) ponašanje. Sa druge strane, socijalna izolacija podstiče preferencu socijalnog prostora u vidu povećane konzumatorne preference (bez obzira na uzrast izolovanih pacova), dok je apetitivna preferenca prisutna jedino kod rano adolescentnih SI pacova.

4.4.2. Broj direktnih prilaza, kao i vreme provedeno u direktnom kontaktu sa novom jedinkom u odnosu na objekat (socijalnost)

Na slici 4.8 prikazani su rezultati merenja broja prilaza kao i vremena provedenog u istraživanju socijalne novine N1 ili praznog kaveza O.

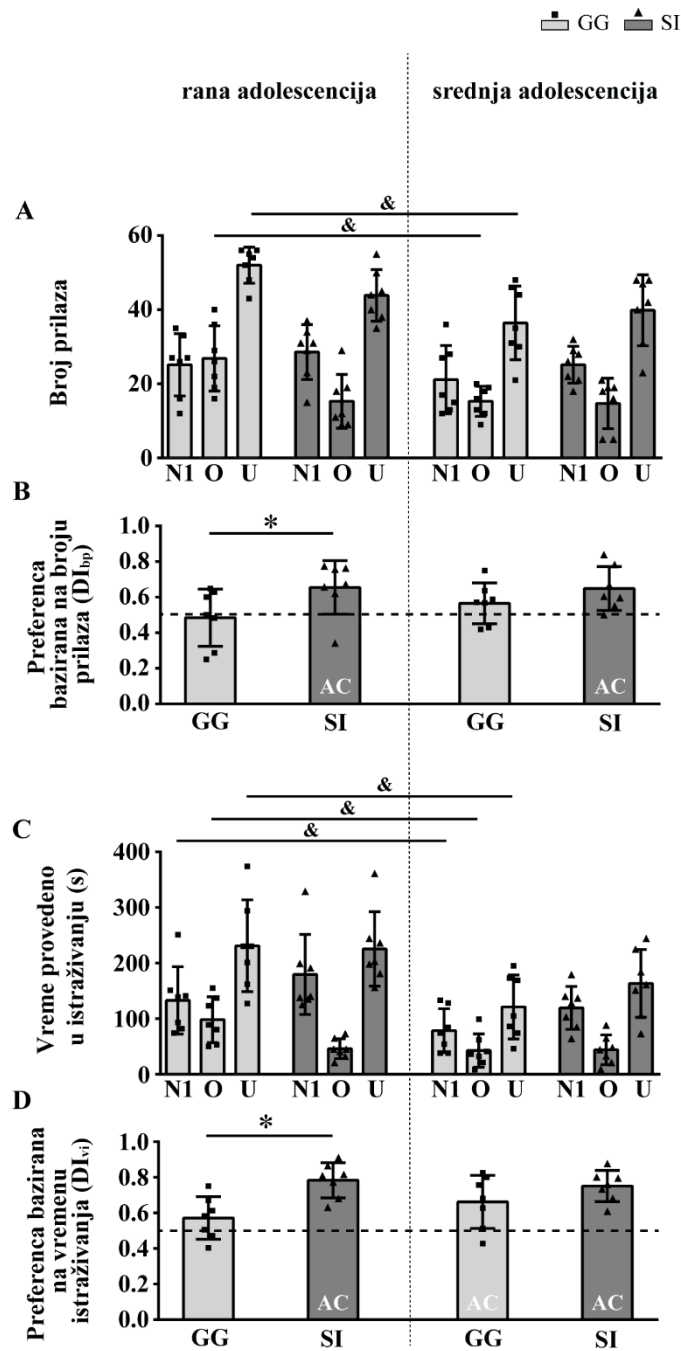
Broj prilaza novoj jedinki (N1) i objektu (O) je bio izbalansiran kod grupno gajenih pacova i tokom rane i srednje adolescencije, međutim životinje izolovane tokom 7 i 14 dana su više puta prilazile novoj jedinki nego praznom kavezu (Slika 4.8A). Kao posledica toga, diskriminacioni indeks baziran na broju prilaza - DI_{bp} (broj prilaza N1/proj prilaza N1+O) je ukazao na postojanje socijalne preference kod socijalno izolovanih pacova kako nakon jedne, tako i nakon dve nedelje gajenja u uslovima izolacije, kada oni dostižu ranu (Slika 4.8B, t-test: $p=0,035$, $t=2,716$, $df=6$) i srednju adolescenciju ($p=0,014$, $t=3,428$, $df=6$). Faktorskom analizom je utvrđeno (Slika 4.8A) da faktori *maturacija* i *društveno okruženje* zasebno i u interakciji (*maturacija x društveno okruženje*) ne dovode do promena u broju prilaza N1 kod različitih eksperimentalnih grupa. Kada je reč o broju prilaza praznom kavezu O, faktorska ANOVA analiza je ukazala na značajnost faktora *maturacije* ($F_{(1,12)}=7,107$, $p=0,021$), kao i interakciju faktora *maturacija x društveno okruženje* ($F_{(1,12)}=5,832$, $p=0,033$) a *post hoc* analiza je ukazala na smanjenje broja prilaza grupno gajenih pacova praznom kavezu tokom *maturacije* (Slika 4.8A, $^*p=0,017$, Tukey test). Takođe, pokazano je da *maturacija* ima značajan efekat ($F_{(1,12)}=10,6$, $p=0,007$) na ukupan broj prilaza tokom testiranja, u vidu smanjenja ovog parametra kod grupno gajenih pacova (Slika 4.8A, $^*p=0,015$).

Diskriminacioni indeks baziran na broju prilaza, D_{bp} (Slika 4.8B) je bio značajno viši kod rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova u odnosu na njihove grupno gajene vršnjake ($^*p=0,025$, $U=7$), dok ovakva promena nije primećena kod srednje adolescentnih životinja. Statistički značajna razlika u diskriminacionom indeksu (D_{bp}) tokom *maturacije* pod različitim uslovima gajenja nije ustanovljena (Wilcoxon test).

Na slici 4.8C su prikazani rezultati merenja vremena provedenog u direktnom istraživanju N1 i O, kao i ukupnog vremena provedenog u istraživanju. Značajne razlike u vremenu provedenom u istraživanju N1 između grupno gajenih i socijalno izolovanih pacova istog uzrasta nisu primećene, ali je uočena razlika u smanjenju ovog parametra tokom *maturacije*, u smislu da je smanjenje u vremenu provedenom u istraživanju N1 tokom *maturacije* uočeno samo kod grupno gajenih pacova (Slika 4.8C, $^*p=0,043$, Wilcoxon test).

Za vreme provedeno u istraživanju objekta O kao značajan se pokazao faktor *maturacija* ($F_{(1,12)}=18,494$, $p=0,001$) kao i u interakcija faktora *maturacija x društveno okruženje* ($F_{(1,12)}=16,008$, $p=0,002$), a *post hoc* analiza je ukazala na smanjenje ovog parametra jedino kod grupno gajenih pacova (Slika 4.8C, $^*p=0,001$, Tukey test). Za ukupno vreme istraživanja kao značajan se pokazao faktor *maturacija* ($F_{(1,12)}=16,014$, $p=0,002$), a *post hoc* analiza je ukazala na smanjenje ovog parametra jedino kod grupno gajenih pacova (Slika 4.8C, $^*p=0,016$, Tukey test).

Na slici 4.8D predstavljena je preferenca za N1 bazirana na osnovu vremena istraživanja - DI_{vi} (vreme istraživanja N1/vreme istraživanja N1+O). Prisustvo socijalne preference (iznad nivoa slučajnosti 0,5) primećeno je kod srednje adolescentnih grupno gajenih životinja (Slika 4.8D; t-test: $p=0,028$, $t=2,876$, $df=6$), kao i rano ($p<0,001$, $t=7,589$, $df=6$) i srednje adolescentnih socijalno izolovanih jedinki ($p<0,001$, $t=7,633$, $df=6$). Dvofaktorska ANOVA je ukazala na značajan efekat *društvenog okruženja* ($F_{(1,12)}=11,759$, $p=0,005$), dok je *post hoc* analiza ukazala na veću preferencu rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova u odnosu na njihove grupno gajenje vršnjake (Slika 4.8D, $^*p=0,023$). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, su predstavljeni u Tabeli 2.



Slika 4.8 Trokomorni test: socijalnost peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija). Testovi su rađeni na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. (A) Broj prilaza novoj jedinki (N1), objektu (O) i ukupan broj prilaza (U). (B) Diskriminacioni indeks baziran na broju prilaza (DI_{bp}) – odražava aspekt „želje” preference za N1 u odnosu na O. (C) Vreme provedeno u istraživanju N1, O i ukupno vreme istraživanja (U). (D) Diskriminacioni indeks baziran na vremenu istraživanja (DI_{vt}) – odražava aspekt „svidanja” preference za N1 u odnosu na O. AC – značajno iznad nivoa slučajnosti (0,5); & $p \leq 0,05$ (rana adolescencija u odnosu na kasnu, unutar istih uslova gajenja); * $p \leq 0,05$ (SI u odnosu na GG u istom periodu maturacije). GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2022a.

Ovi rezultati ukazuju da se socijalnost srednje adolescentnih grupno gajenih pacova manifestuje isključivo kroz konzumatornu preferencu uprkos opštem smanjenju vremena istraživanja tokom maturacije. Sa druge strane, socijalna izolacija podstiče i apetitivne i konzumatorne aspekte

socijalnosti bez obzira na starost životinja, što je, u poređenju sa grupno gajenim vršnjacima očigledno jedino kod rano adolescentnih pacova.

4.5. Socijalno ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije - preferenca socijalne novine u trokomornom testu

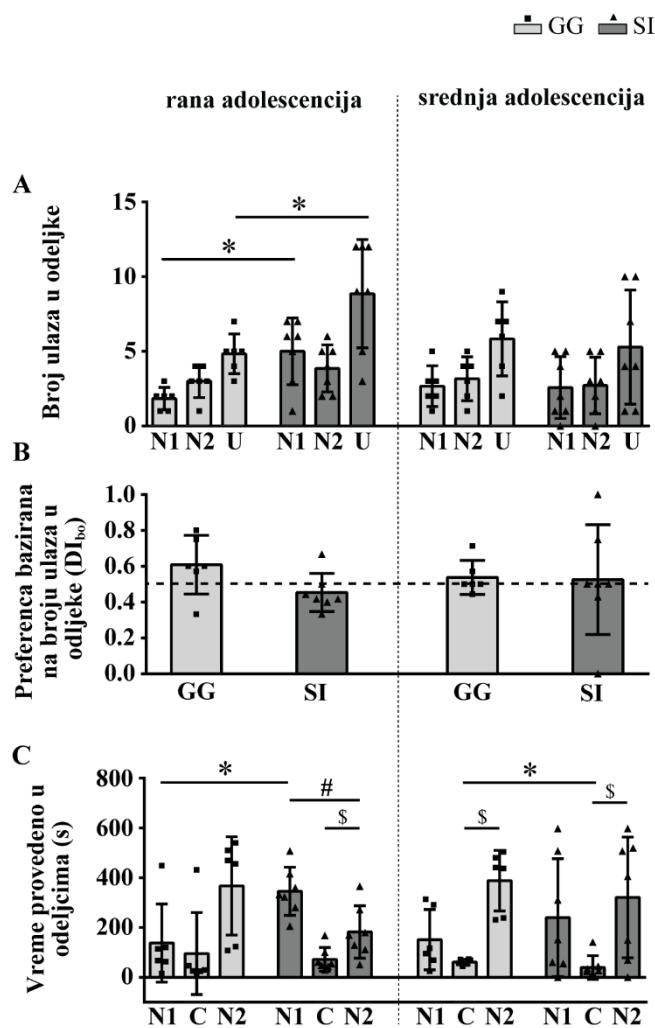
4.5.1. Broj ulaza i vreme provedeno u odeljku sa novom jedinkom u odnosu na odeljak sa poznatom jedinkom (orijentacija ka socijalnoj novini)

Na slici 4.9 prikazani su rezultati merenja broja ulazaka, kao i vreme provedeno u odeljcima sa poznatom jedinkom N1, kao i novom jedinkom N2. Broj ulazaka u odeljke sa poznatom jedinkom (N1) i novom jedinkom (N2) je bio isti kod svih grupa životinja (Slika 4.9A), te je diskriminacioni indeks baziran na broju ulaza u odeljke - DI_{bo} (broj ulaza u odeljak sa N2/broj ulaza u odeljak sa N2+N1) pokazao odustvo preference za N2 odeljak u svim eksperimentalnim grupama (Slike 4.9B). Dvofaktorska ANOVA analiza je ukazala na postojanje značajnog efekta *društvenog okruženja* na broj ulaza u N1 odeljak ($F_{(1,11)}=14,442$, $p=0,003$), kao i na ukupan broj ulazaka ($F_{(1,11)}=5,788$, $p=0,035$), a dodatna *post hoc* analiza je ukazala da je povećan broj ulazaka u N1 odeljak (Slika 4.9A; $*p=0,001$), kao i ukupan broj ulaza u oba odeljka ($*p=0,014$) kod pacova izolovanih tokom 7 dana, u periodu rane adolescencije, u poređenju sa grupno gajenim vršnjacima. Faktori *maturacija* i *društveno okruženje* zasebno, kao i njihova interakcija nisu pokazali značajan efekat na vrednosti diskriminacionog indeksa zasnovanog na broju ulazaka u odeljke (Slika 4.9B). Ovi rezultati ukazuju da prisustvo socijalne novine dovodi do hiperaktivnosti rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova u odnosu na njihove grupno gajene vršnjake, podstičući ulaske u odeljke sa poznatom životinjom.

Slika 4.9C sumira rezultate vremena provedenog u različitim odeljcima Trokomornog aparata. Vreme provedeno u N2 odeljku u odnosu na centar (C) je značajno više kod svih grupa životinja ($0 < T < 2$; $2,028 < Z < 2,201$; $0,028 < p < 0,043$, Wilcoxon test), osim kod rano adolescentnih grupno gajenih životinja ($T=2$, $Z=1,782$, $p=0,075$). Takođe, vreme provedeno u N2 odeljku je u odnosu na vreme provedeno u N1 odeljku je bilo manje jedino kod rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova, nakon jedne nedelje gajenja u uslovima izolacije, kada dostižu punu ranu fazu adolescencije (Slika 4.9C; $T=2$, $Z=2,028$, $#p=0,043$), što ukazujući na prisustvo socijalne orijentacije ka prostoru sa poznatom jedinkom kod ove eksperimentalne grupe. Vreme provedeno u odeljcima N1, N2 i C tokom maturacije se nije razlikovalo kod grupno gajenih i socijalno izolovanih životinja, dok je društveno okruženje tokom maturacije imalo efekata na vreme provedeno u N1 odeljku kod rano adolescentnih životinja, budući da su rano adolescentne izolovane životinje više vremena provodile u odeljku sa poznatom (N1) jedinkom u poređenju sa grupno gajenim kontrolama (Slika 4.9C; $*p=0,032$). Osim toga, životinje izolovane tokom rane i srednje adolescencije su manje vremena provodile u centralnom odeljku u poređenju sa grupno gajenim kontrolama (Slika 4.9C; $*p=0,038$).

Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, su predstavljeni u Tabeli 2.

Ovi rezultati ukazuju da faktori *maturacija* i *društveno okruženje* ne utiču na preferiranje prostora sa socijalnom novinom. Životinje izolovane u ranom adolescentnom dobu u odnosu na grupno gajene jedinice iste starosti pokazuju povećanu zainteresovanost za prostor u kome se nalazi poznata jedinka (u vidu povećanog broja ulaza u odeljak), kao i povećanu konzumatornu preferencu ka poznatom socijalnom prostoru.



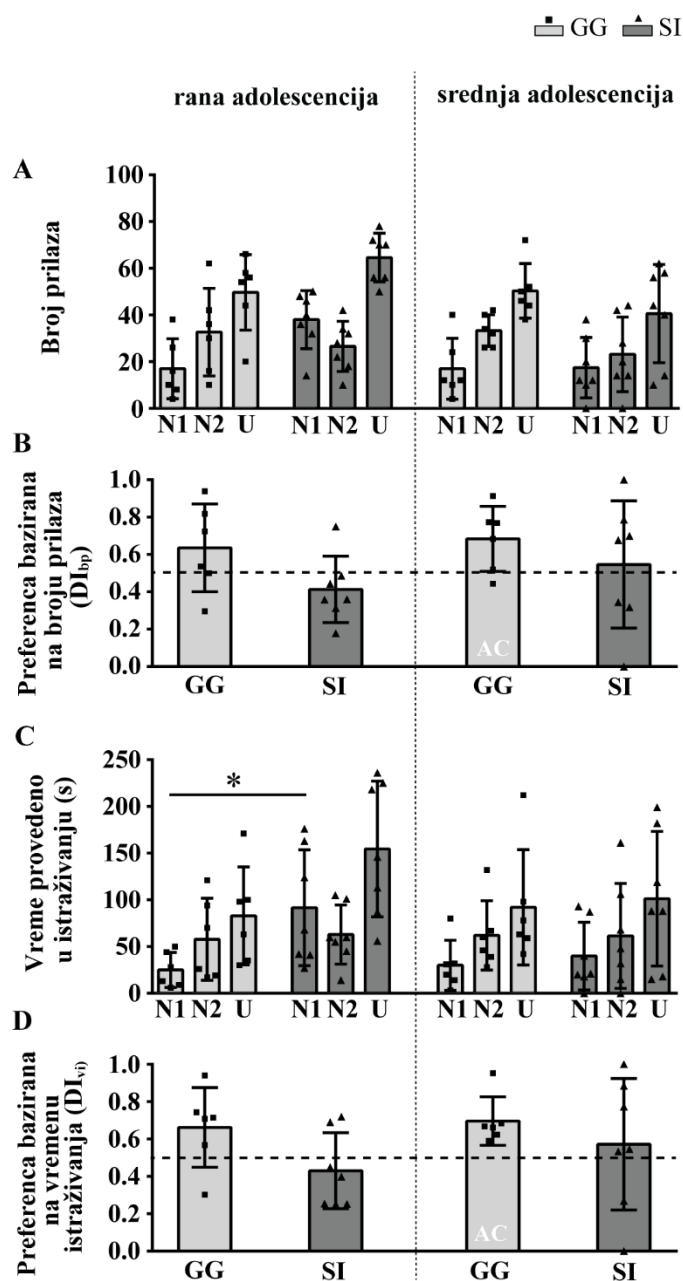
Slika 4.9 Preferenca novog socijalnog prostora kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija). Testovi su rađeni na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. **(A)** Broj ulaza u odeljak sa poznatom jedinkom (N1), novom jedinkom (N2) i ukupan broj ulaza (U). **(B)** Diskriminacioni indeks bazirana na broju ulaza u odeljke (DI_{bo}) – odražava aspekt „želje” preference odeljka sa socijalnom novinom (N2 odeljak). **(C)** Vreme provedeno u N1, N2 i centralnom odeljku – odražava aspekt „svidanja” preference za odeljkom sa socijalnom novinom (N2 odeljak) u odnosu na druga dva odeljka; $^{\S}p \leq 0,05$ (vreme provedeno u N2 odeljku u odnosu na vreme provedeno u C odeljku); $^{\#}p \leq 0,05$ (vreme provedeno u N2 odeljku u odnosu na vreme provedeno u N1 odeljku); $^*p \leq 0,05$ (SI u odnosu na GG u okviru istog maturacionog perioda). GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2022a.

4.5.2. Broj direktnih prilaza i vreme provedeno u direktnom kontaktu sa novom u odnosu na staru jedinku (preferenca za socijalnom novinom)

Slika 4.10A prikazuje sumirane rezultate broja direktnih prilaza poznatoj (N1) u odnosu na nepoznatu (N2) životinju, kao i ukupan broj prilaza (U), dok slika 4.10B predstavlja relativnu preferencu za N2, baziranu na broju prilaza - DI_{bp} (broj prilaza N2/broj prilaza N2+N1). Dvofaktorska ANOVA nije pokazala značajan efekat *maturacije*, *društvenog okruženja*, kao i interakcije ova dva faktora u svim analiziranim parametrima. Preferenca socijalne novine bazirana na diskriminacionom indeksu broja prilaza primećena je jedino kod srednje adolescentnih gajenih životinja, kod kojih je

ovaj parametar pokazao vrednost iznad nivoa slučajnosti (0,5) (Slika 4.10B; t-test za jedan uzorak, $p=0,048$, $t=2,590$, $df=5$). Slika 4.10C prikazuje vreme provedeno u istraživanju poznate (N1) i nepoznate (N2) životinje, kao i ukupno vreme istraživanja (U), dok slika 4.10D predstavlja relativne preference za N2, zasnovane na vremenu istraživanja (DI_{vi}). Dvofaktorska ANOVA analiza je ukazala na značajan efekat društvenog okruženja na vreme provedeno u istraživanju N1 životinje (Slika 4.10C; $F_{(1,11)}=9,59$, $p=0,011$), dok je *post hoc* analiza ukazala da samo jedinke izolovane tokom rane faze adolescencije provode više vremena u istraživanju N1 jedinke u poređenju sa svojim grupno gajenim vršnjacima (Slika 4.10C; $*p=0,017$, Tukey test). Dvofaktorska ANOVA je pokazala da faktori maturacija, društveno okruženje, kao i njihova interakcija ne utiču značajno na interesovanje za N2 jedinku, ukupno vreme istraživanja, kao i vrednosti DI_{vi} . Preferenca socijalne novine bazirana na DI_{vi} (vreme istraživanja N2/vreme istraživanja N2+N1) je detektovana kod srednje dolescentnih grupno gajenih životinja (Slika 4.10D; $p=0,014$, $t=3,693$, $df=5$), ali ne i kod njihovih vršnjaka koji su dve nedelje živeli u uslovima izolacije, tokom rane i srednje adolescencije. Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, su predstavljeni u Tabeli 2.

Ovi rezultati ukazuju da se kod grupno gajenih adolescentnih pacova preferenca socijalne novine javlja sa sazrevanjem, tokom srednje adolescencije i to i kroz apetitivne i konzumatorne aspekte socijalne motivacije. Sa druge strane socijalna izolacija narušava preferencu za socijalnom novinom kod srednje adolescentnih socijalno izolovanih (koji su dve nedelje, tj. fazu rane i srednje adolescencije, živeli u uslovima izolacije), dok kod rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova uprkos već pomenutom postojanju preference za poznatim socijalnim prostorom (rezultat prikazan u okviru 4.5.1.) ne dovodi do preference ni poznate ni nove životinje (tj. promovise pamćenje socijalnog prostora u kome se nalazi poznata životinja, ali ne i pamćenje same životinje kao takve).



Slika 4.10 Preferenca socijalne novine kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija). Testovi su rađeni na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti ± SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. **(A)** Broj prilaza poznatoj jedinci (N1), novoj jedinci (N2) i ukupan broj prilaza (U). **(B)** Diskriminacioni indeks baziran na broju prilaza (DI_{bp}) – odražava aspekt „želje” preference za N2 u odnosu na N1, odnosno preferencu socijalne novine. **(C)** Vreme provedeno u istraživanju N1, N2 i ukupno vreme istraživanja. **(D)** Diskriminacioni indeks baziran na vremenu istraživanja (DI_{vi}) – odražava aspekt „sviđanja” preference za N2 u odnosu na N1, odnosno preferencu socijalne novine. AC – značajno iznad nivoa slučajnosti (0,5); * $p \leq 0,05$ (SI u odnosu na GG pacove u okviru istog maturanog perioda). GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2022a.

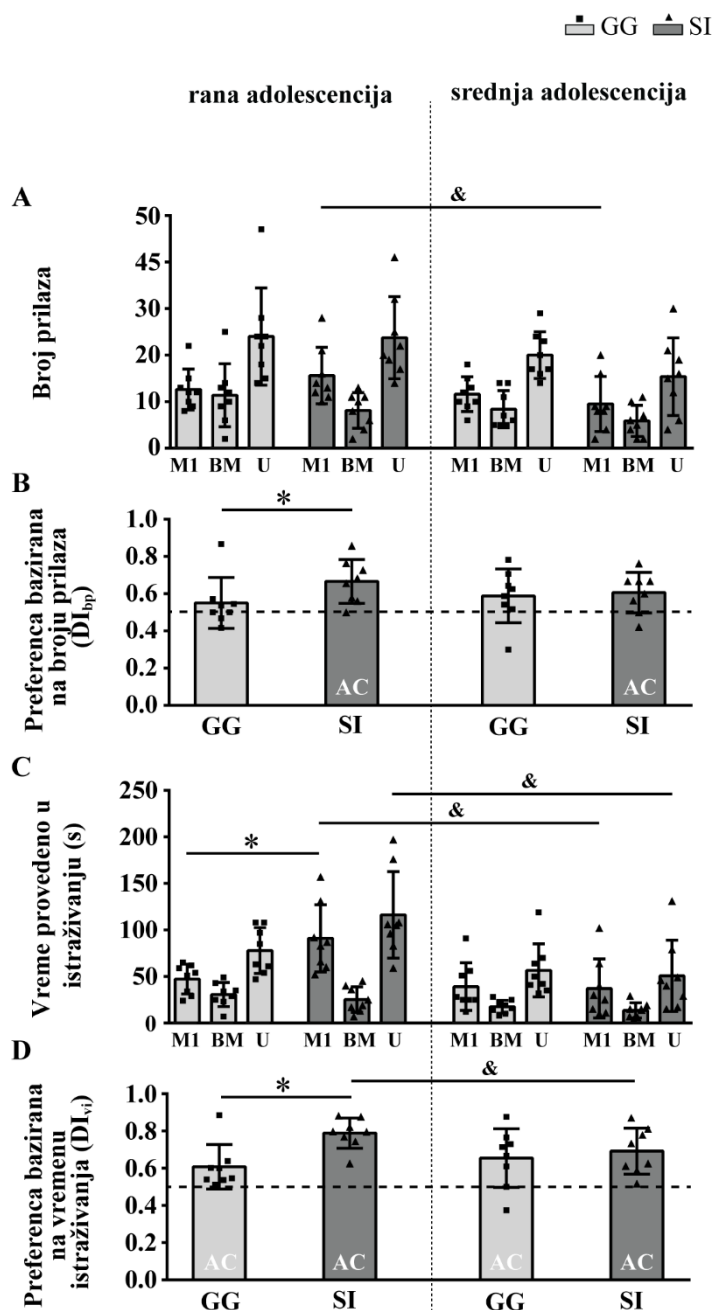
4.6. Ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije u socijalnom olfaktornom testu - faza preference socijalnog mirisa

Slika 4.11A prikazuje rezultate broja prilaza perforiranoj kutijici sa trodnevnom šuškom (socijalni miris 1, M1), praznoj kutijici bez mirisa (BM), kao i ukupnog broja prilaza (U). Dvofaktorska ANOVA je ukazala na postojanje značajnog efekta faktora *maturacija* na broj prilaza M1 ($F_{(1,14)}=6,723, p=0,021$), dok je *post hoc* analiza ukazala na značajno smanjenje broja prilaza M1 kod socijalno izolovanih (ali ne i kod grupno gajenih) pacova tokom *maturacije* (Slika 4.11A; $^{\&}p=0,032$, Tukey test). Takođe, pokazalo se da je *maturacija* značajan faktor i za ukupan broj prilaza ($F_{(1,14)}=4,718, p=0,048$). Na Slici 4.11B prikazane su relativne preference za M1 zasnovane na broju prilaza kutijicama. Preferenca za M1 kutijicu (DI iznad nivoa slučajnosti, 0,5; broj prilaza M1/broj prilaza M1+BM) postojala je i kod rano (Slika 4.11B; $p=0,005, t=3,979, df=7$) i srednje adolescentnih socijalno izolovanih životinja ($p=0,029, t=2,751, df=7$). Preferenca za M1 kutijicu je bila značajno povećana kod rano adolescentnih socijalno izolovanih životinja u odnosu na njihove grupno gajene vršnjake (Slika 4.11B; $^*p=0,046, U$ -test), dok razlike kod srednje adolescentnih životinja nisu primećene. Wilcoxon test nije pokazao značajne promene u ovim parametrima kroz *maturaciju* u okviru određenih uslova gajenja.

Na Slici 4.11C prikazano je vreme provedeno u istraživanju kutijice sa socijalnim mirisom (M1), kutijice bez mirisa (BM), kao i ukupno vreme istraživanja (U). Dvofaktorska ANOVA je ukazala na postojanje značajnog efekta faktora *maturacije* ($F_{(1,14)}=10,860, p=0,005$) kao i interakcije faktora *maturacija* x *društveno okruženje* ($F_{(1,14)}=5,913, p=0,029$) na vreme provedeno u istraživanju M1, a *post hoc* analiza je ukazala na povećanje ovog parametra kod rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova u odnosu na grupno gajene vršnjake (Slika 4.11C; $^*p=0,049$, Tukey test), kao i značajno smanjenje u ovom parametru kod socijalno izolovanih pacova tokom *maturacije* (Slika 4.11C; $^{\&}p=0,006$).

Značajan efekat faktora *maturacija* na vreme provedeno u istraživanju kutijice bez mirisa, kao i na ukupno vreme istraživanja (U) je takođe utvrđen (Slika 4.11C; $F_{(1,14)}=10,971, p=0,005, F_{(1,14)}=15,381, p=0,002$), sa smanjenjem ukupnog vremena istraživanja kod socijalno izolovanih životinja (Slika 4.11C; $^{\&}p=0,005$). Slika 4.11D ukazuje da, na osnovu vremena posvećenog istraživanju M1 i BM, pacovi svih grupa pokazuju preferencu ka kutijici sa socijalnim mirisom (t-test za jedan uzorak: $0,040 < p < 0,001; 9,968 < t < 2,522; df=7$). Preferenca je bila viša kod rano adolescentnih socijalno izolovanih životinja u odnosu na njihove grupno gajene vršnjake (Slika 4.11D; $^*p=0,016, U$ -test) i blago, ali značajno je opadala tokom *maturacije* kod socijalno izolovanih životinja (Slika 4.11D; $^{\&}p=0,036, Wilcoxon$ test). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući *p* vrednosti, su predstavljeni u Tabeli 2.

Ovi rezultati ukazuju da je konzumatorni aspekt preference socijalnog mirisa prisutan kod pacova tokom *maturacije* bez obzira na uslove u kojima su gajeni, dok je apetitivni aspekt prisutan jedino kod socijalno izolovanih pacova bez obzira na njihov uzrast. Oba aspekta preference socijalnog mirisa su bila veća kod rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova u odnosu na njihove grupno gajene vršnjake. Takođe, kod socijalno izolovanih pacova je primećeno opšte smanjenje zainteresovanosti za socijalne mirise tokom adolescentnog sazrevanja, što je doprinelo smanjenju konzumatornog aspekta preference kod srednje adolescentnih u odnosu na rano adolescentne pacove.



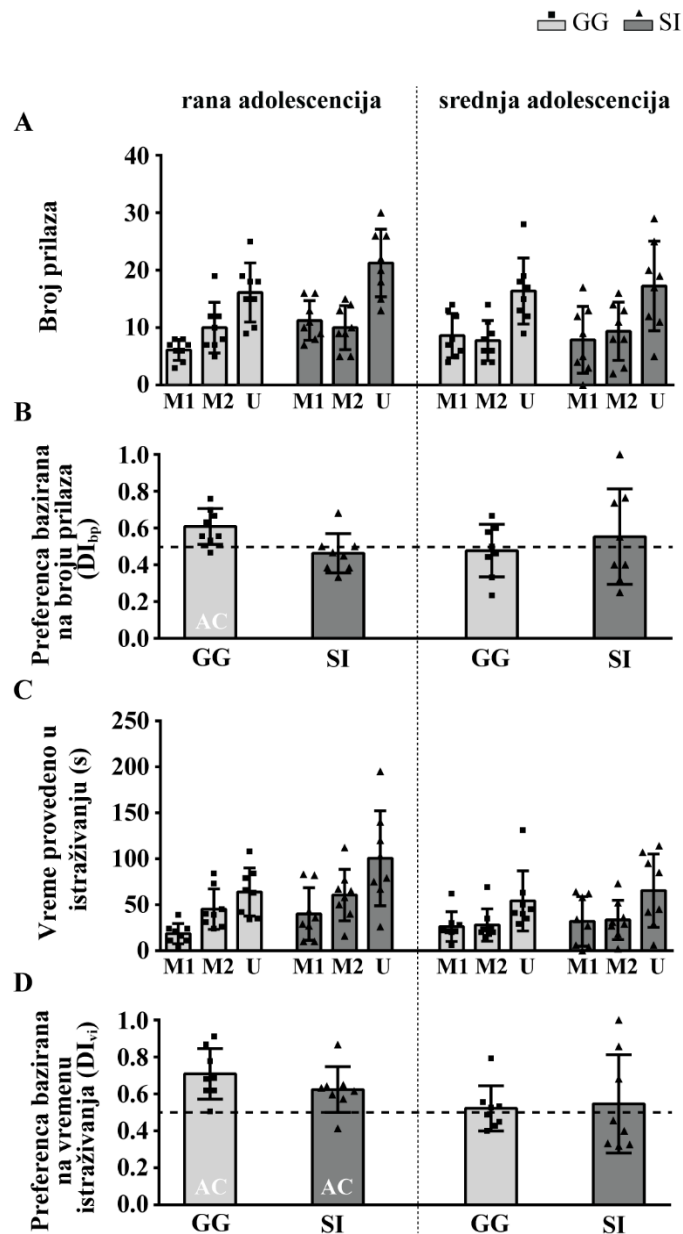
Slika 4.11 Ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija) – faza preference socijalnog mirisa u socijalnom olfaktornom testu. Testovi su rađeni na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. **(A)** Broj prilaza kutijici sa novim socijalnim mirisom (M1), kutijici bez mirisa (BM), kao i ukupan broj prilaza (U). **(B)** Relativna preferenca za M1 bazirana na broju prilaza kutijicama. **(C)** Vreme provedeno u istraživanju M1 kutijice, kao i kutijice bez mirisa (BM), kao i ukupno vreme istraživanja (U). **(D)** Relativna preferenca za M1 bazirana na vremenu istraživanja (DI_{vi}). AC – značajno iznad nivoa slučajnosti (0,5); $\&p \leq 0,05$ (rana u odnosu na kasnu adolescenciju u okviru istih uslova gajenja); $*p \leq 0,05$ (SI u odnosu na GG u okviru istog perioda maturacije). GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2022a.

4.7. Ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije u socijalnom olfaktornom testu - faza preference novog socijalnog mirisa

Na slici 4.12A prikazani su rezultati broja prilaza kutijici sa poznatim socijalnim mirisom (M1), kutijici sa novim socijalnim mirisom (M2), kao i ukupan broj prilaza (U), dok je na slici 4.12B prikazana relativna preferenca za M2 zasnovana na broju prilaza kutijicama sa mirisom. Dvofaktorska ANOVA analiza je ukazala da *maturacija* i *društveno okruženje*, kao i njihova interakcija, nisu uticali na broj prilaza kutijicama sa poznatim i nepoznatim socijalnim mirisom. Diskriminacioni indeks zasnovan na broju prilaza (broj prilaza M2/broj prilaza M2+M1) je bio iznad nivoa slučajnosti (0,5) jedino kod rano adolescentnih grupno gajenih životinja (Slika 4.12B; t-test za jedan uzorak: $p=0,016$, $t=3,146$, $df=7$).

Slika 4.12C prikazuje vreme provedeno u istraživanju kutijice sa poznatim socijalnim mirisom (M1), kutijice sa novim socijalnim mirisom (M2), kao i ukupnim vremenom istraživanja (U), dok slika 4.12D prikazuje relativnu preferencu za M2 zasnovanu na vremenu njenog istraživanja kutijica sa mirisom. Nije primećen efekat faktora *maturacije* i *društvenog okruženja*, kao i njihove interakcije na vreme istraživanja ali se faktor *maturacija* pokazao kao značajan kada je u pitanju DI ($F_{(1,14)}=5,497$, $p=0,034$), čija je vrednost bila iznad nivoa slučajnosti (0,5) samo kod rano adolescentnih životinja bez obzira na uslove gajenja (Slika 4.12D; za grupno gajene jedinke $p=0,003$, $t=4,346$, $df=7$; za socijalno izolovane jedinke $p=0,025$, $t=2,824$, $df=7$; t-test za jedan uzorak). Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, su predstavljeni u Tabeli 2.

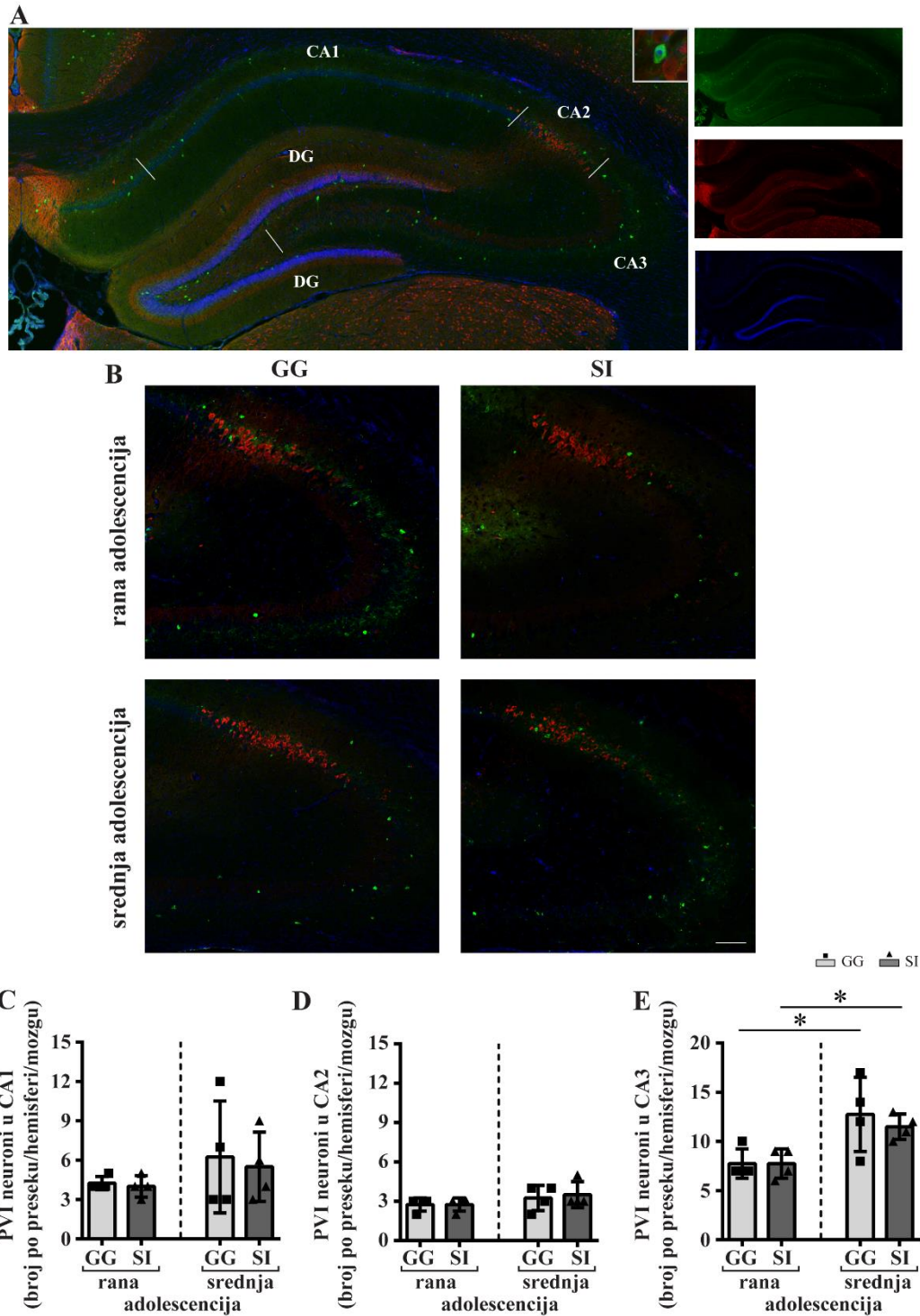
Ovi rezultati ukazuju da se apetitivni i konzumatorni aspekt preference novog socijalnog mirisa kod grupno gajenih pacova javljaju jedino kod rano adolescentnih životinja. Konzumatorni aspekt preference novog socijalnog mirisa kod rano adolescentnih životinja nije osetljiv na uslove gajenja (tj. postoji i kod grupno gajenih i kod socijalno izolovanih jedinki), dok je apetitivni aspekt ove preference osetljiv na uslove gajenja i narušen je kod rano adolescentnih socijalno izolovanih jedinki.



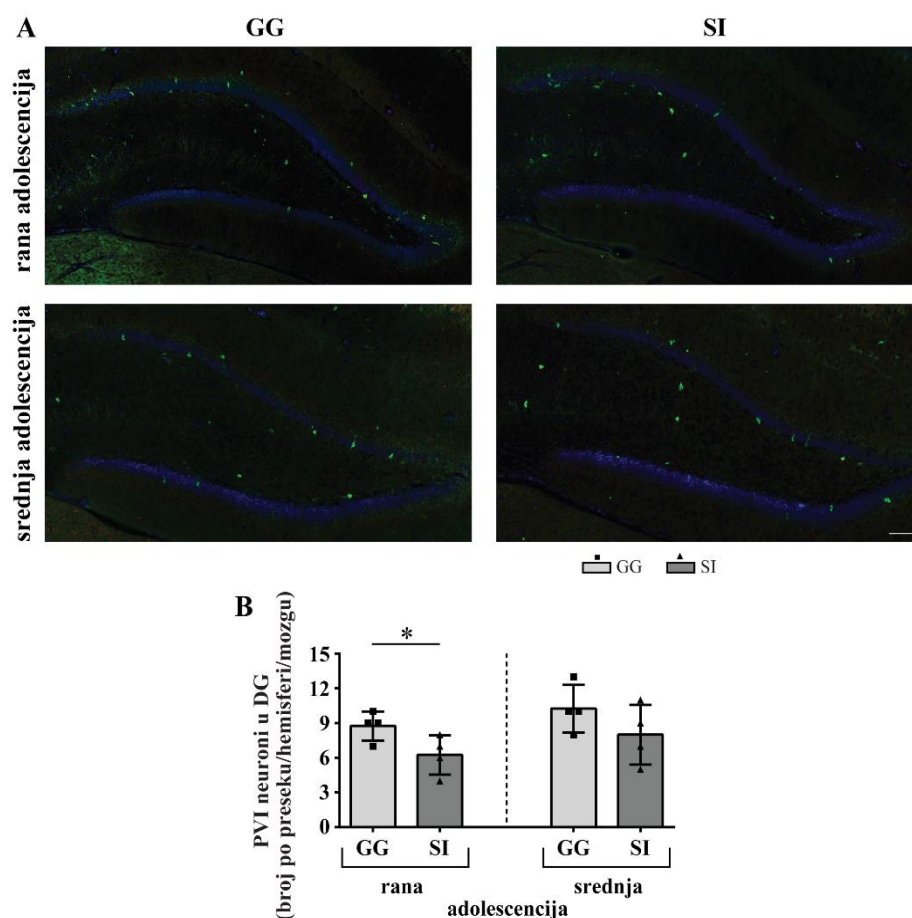
Slika 4.12 Ponašanje peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija) – faza preference novog socijalnog mirisa u socijalnom olfaktornom testu. Testovi su rađeni na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. **(A)** Broj prilaza kutijici sa poznatim socijalnim mirisom (M1), kutijici sa novim socijalnim mirisom (M2), kao i ukupan broj prilaza (U). **(B)** Relativna preferenca za M2 bazirana na broju prilaza kutijicama. **(C)** Vreme provedeno u istraživanju M1 kutijice, M2 kutijice, kao i ukupno vreme istraživanja (U). **(D)** Relativna preferenca za M2 bazirana na vremenu istraživanja (DI_{vi}). AC – značajno iznad nivoa slučajnosti (0,5). GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2022a.

4.8. Broj parvalbumim (PV) imunoreaktivnih neurona u dorzalnom hipokampusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije

Reprezentativna mikrografija dorzalnog hipokampusa kontrolnih (grupno gajenih) peripubertetskih pacova, sa označenim subregionima (CA1, CA2, CA3 i *dentatni girus* (DG)) predstavljena je na slici 4.13A. Mikrografija je dobijena preklapanjem signala nakon imunohistohemijskog obeležavanja gde zeleni signal predstavlja obeležene PV neurone, crveni signal predstavlja obeležen region CA2, dok plavi signal predstavlja obojena jedra neurona (pojedinačni prikaz signala dat je u vidu manjih mikrografija, slika 4.13A). Na većem uveličanju prikazane su reprezentativne mikrografije CA2/CA3 subregiona hipokampusa (Slika 4.13B), kao i dentatnog girusa (Slika 4.14A) rano i srednje adolescentnih grupno gajenih i socijalno izolovanih pacova. Broj PV obeleženih neurona se nije razlikovao ni u jednom subregionu dorzalnog hipokampusa socijalno izolovanih i grupno gajenih životinja, istog perioda adolescencije (Slika 4.13C-E). Nasuprot tome, statistička analiza je ukazala da se tokom maturacije povećava broj PV obeleženih neurona, ali samo u CA3 subregionu (Slika 4.13C-E), kako u hipokampusu socijalno izolovanih tako i grupno gajenih pacova (Slika 4.13E; GG životinje $*p=0,043$, SI životinje $*p=0,021$, *U*-test). Broj PV obeleženih neurona u DG je bio značajno manji kod rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova u odnosu na njihove grupno gajene vršnjake (Slika 4.14B; $*p=0,043$), međutim ova razlika nije uočena kod srednje adolescentnih jedinki. Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući *p* vrednosti, su predstavljeni u Tabeli 2.



Slika 4.13 Parvalbumin (PV) imunoreaktivni neuroni u dorzalnom hipokampusu (CA1, CA2 i CA3 subregion) peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija). Analize su rađene na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). (A) Reprerzentativna mikrografija PV obeleženih neurona hipokampusu peripubertetskih pacova kontrolne grupe. (B) Reprerzentativna slika CA2/CA3 subregiona GG i SI pacova u ranoj i srednjoj adolescenciji nakon bojenja PV (zeleno) i jedara (Hoechst, plavo). (C–E) Broj PV obeleženih neurona unutar CA1/CA2 i CA3 subregiona. Dorzalni hipokampus je analiziran po atlasu adultnog pacovskog mozga (-2,9 do -3,6 mm od bregme, (Paxinos and Watson, 2005)). Bar – 100 μ m. * $p \leq 0,05$ (rana u odnosu na kasnu adolescenciju u okviru istih uslova gajenja). GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2022a.



Slika 4.14 Parvalbumin (PV) imunoreaktivni neuroni u dentatnom girusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija). Analize su rađene na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). (A) Reprezentativna mikrografija dentatnog girusa (DG) SI i GG pacova u ranoj i srednjoj adolescenciji nakon bojenja PV (zeleno) i jedara (Hoechst, plavo). (B) Broj PV obeleženih neurona unutar DG. Bar – 100 μ m. * $p \leq 0,05$ (SI u odnosu na GG pacove u okviru istog maturacionog perioda). GG – kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2022a.

Tabela 2. Sumirani prikaz analiziranih parametara, testova korišćenih u statističkoj analizi, dobijenih p vrednosti i broja korišćenih životinja (n) za rezultate prikazane u okviru podnaslova 4.4.-4.8. Analizirani su parametri kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43, rana i srednja adolescencija). GG - grupno gajene životinje po tri u kavezu; SI - socijalno izolovane životinje.

Trokomorni test: socijalna orijentacija peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije								
n = 7 (životinja po grupi)	Faktor: Maturacija pod odgovarajućim društvenim okruženjem rana vs. srednja adolescencija <i>Wilcoxon test</i>				Faktor: društveno okruženje GG vs. SI <i>Mann Whitney U-test</i>			
		t	Z	p		U	Z	p
Slika 4.7A	GG	9,5	0,210	0,834	rana	15	1,214	0,225

Broj ulaza u socijalni odeljak (sa novom jedinkom; N1)	SI	7,5	0,629	0,529	srednja	18,5	0,767	0,443	
Broj ulaza u nesocijalni odeljak (sa objektom; O)	GG	8,5	0,419	0,675	rana	14,5	-1,278	0,201	
	SI	8	1,014	0,310	srednja	20	0,575	0,565	
Ukupan broj ulaza u odeljke (N1+O)	GG	10	0,105	0,917	rana	21	0,447	0,655	
	SI	10,5	0,592	0,554	srednja	20,5	0,511	0,609	
Slika 4.7B	dvofaktorska ANOVA				Tukey (HSD)				
Preferenca bazirana na broju ulaza u odeljke (DI _{bo})	društveno okruženje		F _(1,12) = 5,852, p = 0,032		GG rana vs. GG srednja		p = 0,784		
	maturacija		F _(1,12) = 0,001, p = 0,982		SI rana vs. SI srednja		p = 0,766		
	maturacija x okruženje		F _(1,12) = 1,836, p = 0,200		GG rana vs. SI rana		p = 0,112		
					GG srednja vs. SI srednja		p = 0,788		
Slika 4.7C	rana adolescencija				srednja adolescencija				
Vreme provedeno u socijalnom odeljku (N1) vs. vreme provedeno u centru (C) (t test za nezavisne uzorke)		t	df	p		t	df	p	
	GG	6,232	6	< 0,001	GG	5,927	6	< 0,001	
	SI	7,359	6	< 0,001	SI	6,922	6	< 0,001	
Vreme provedeno u socijalnom odeljku (N1) vs. vreme provedeno u odeljku sa objektom (O) (t test za zavisne uzorke)		t	df	p		t	df	p	
	GG	0,194	6	0,852	GG	1,835	6	0,116	
	SI	2,455	6	0,049	SI	2,864	6	0,029	
	dvofaktorska ANOVA				Post hoc test				
Vreme provedeno u socijalnom odeljku (N1)	društveno okruženje		F _(1,12) = 1,705, p = 0,216		bez značajnosti između grupa				
	maturacija		F _(1,12) = 1,888, p = 0,195						
	maturacija x okruženje		F _(1,12) = 0,432, p = 0,524						
Vreme provedeno u centru (C)	društveno okruženje		F _(1,12) = 0,851, p = 0,375		bez značajnosti između grupa				
	maturacija		F _(1,12) = 0,559, p = 0,469						
	maturacija x okruženje		F _(1,12) = 0,066, p = 0,801						
Vreme provedeno u odeljku sa objektom (O)	društveno okruženje		F _(1,12) = 2,385, p = 0,148		bez značajnosti između grupa				
	maturacija		F _(1,12) = 1,538, p = 0,239						
	maturacija x okruženje		F _(1,12) = 0,608, p = 0,451						
Trokomorni test: socijabilnost peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije									
Slika 4.8A	dvofaktorska ANOVA				Tukey (HSD)				
Broj prilaza novoj jedinci 1 (N1)	društveno okruženje		F _(1,12) = 1,498, p = 0,244		bez značajnosti između grupa				
	maturacija		F _(1,12) = 1,831, p = 0,201						
	maturacija x okruženje		F _(1,12) = 0,011, p = 0,919						
Broj prilaza objektu (O)	društveno okruženje		F _(1,12) = 4,280, p = 0,061		GG rana vs. GG srednja		p = 0,017		
	maturacija		F _(1,12) = 7,107, p = 0,021		SI rana vs. SI srednja		p = 0,998		
	maturacija x okruženje		F _(1,12) = 5,832, p = 0,033		GG rana vs. SI rana		p = 0,068		
					GG srednja vs. SI srednja		p = 0,999		
Ukupan broj prilaza (N1+O)	društveno okruženje		F _(1,12) = 0,570, p = 0,465		GG rana vs. GG srednja		p = 0,015		
	maturacija		F _(1,12) = 10,600, p = 0,007		SI rana vs. SI srednja		p = 0,784		
	maturacija x okruženje		F _(1,12) = 3,705, p = 0,078		GG rana vs. SI rana		p = 0,301		
					GG srednja vs. SI srednja		p = 0,864		
Slika 4.8B	Faktor: Maturacija pod odgovarajućim društvenim okruženjem rana vs. srednja adolescencija Wilcoxon test				Faktor: društveno okruženje GG vs. SI Mann Whitney U-test				
		N	T	Z	p		U	Z	p
Preferenca bazirana na broju prilaza (DI _{bp})	GG	7	8	1,014	0,310	rana	7	2,236	0,025
	SI	7	14	0	1,000	srednja	15	1,214	0,225
Slika 4.8C	Faktor: Maturacija rana vs. srednja adolescencija Wilcoxon test				Faktor: društveno okruženje GG vs. SI Mann Whitney U-test				

		N	T	Z	p		U	Z	p
Vreme provedeno u istraživanju nove jedinke I (N1)	GG	7	2	2,028	0,043	rana	17	0,958	0,338
	SI	7	5	1,153	0,249	srednja	9,5	1,917	0,055
dvofaktorska ANOVA						Tukey (HSD)			
Vreme provedeno u istraživanju objekta (O)	društveno okruženje maturacija maturacija x okruženje	F _(1,12) = 3,023, p = 0,108				GG rana vs. GG srednja	p = 0,001		
		F _(1,12) = 18,494, p = 0,001				SI rana vs. SI srednja	p = 0,997		
		F _(1,12) = 16,008, p = 0,002				GG rana vs. SI rana	p = 0,107		
						GG srednja vs. SI srednja	p = 1,000		
Ukupno vreme istraživanja (N1+O)	društveno okruženje maturacija maturacija x okruženje	F _(1,12) = 0,398, p = 0,540				GG rana vs. GG srednja	p = 0,016		
		F _(1,12) = 16,014, p = 0,002				SI rana vs. SI srednja	p = 0,226		
		F _(1,12) = 1,238, p = 0,288				GG rana vs. SI rana	p = 0,999		
						GG srednja vs. SI srednja	p = 0,737		
Slika 4.8D	dvofaktorska ANOVA					Tukey (HSD)			
Preferenca bazirana na vremenu istraživanja (DI _{vi})	društveno okruženje maturacija maturacija x okruženje	F _(1,12) = 11,759, p = 0,005				GG rana vs. GG srednja	p = 0,491		
		F _(1,12) = 0,437, p = 0,521				SI rana vs. SI srednja	p = 0,952		
		F _(1,12) = 1,959, p = 0,187				GG rana vs. SI rana	p = 0,023		
						GG srednja vs. SI srednja	p = 0,503		
Preferenca novog socijalnog prostora kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije									
Slika 4.9A	dvofaktorska ANOVA					Tukey (HSD)			
Broj ulaza u odeljak sa poznatom jedinkom (N1)	društveno okruženje maturacija maturacija x okruženje	F _(1,11) = 14,442, p = 0,003				GG rana vs. GG srednja	p = 0,918		
		F _(1,11) = 0,804, p = 0,389				SI rana vs. SI srednja	p = 0,243		
		F _(1,11) = 3,360, p = 0,094				GG rana vs. SI rana	p = 0,001		
						GG srednja vs. SI srednja	p = 0,998		
Broj ulaza u odeljak sa novom jedinkom (N2)	društveno okruženje	F _(1,11) = 0,179, p = 0,680				bez značajnosti između grupa			
	maturacija	F _(1,11) = 0,460, p = 0,512							
	maturacija x okruženje	F _(1,11) = 0,827, p = 0,383							
Ukupan broj ulaza u oba odeljka (N1+N2)	društveno okruženje maturacija maturacija x okruženje	F _(1,11) = 5,788, p = 0,035				GG rana vs. GG srednja	p = 0,970		
		F _(1,11) = 0,696, p = 0,422				SI rana vs. SI srednja	p = 0,366		
		F _(1,11) = 2,199, p = 0,166				GG rana vs. SI rana	p = 0,014		
						GG srednja vs. SI srednja	p = 0,953		
Slika 4.9B	dvofaktorska ANOVA					Post hoc test			
Preferenca bazirana na broju ulaza u odeljke (DI _{bo})	društveno okruženje	F _(1,11) = 1,105, p = 0,316				bez značajnosti između grupa			
	maturacija	F _(1,11) = 0,000, p = 0,996							
	maturacija x okruženje	F _(1,11) = 1,011, p = 0,336							
Slika 4.9C	rana adolescencija					srednja adolescencija			
Wilcoxon test		N	T	Z	p	N	T	Z	p
Vreme provedeno u N2 odeljku vs. vreme provedeno u centru	GG	6	2	1,782	0,075	6	0	2,201	0,028
	SI	7	2	0,028	0,043	7	1	2,197	0,028
Vreme provedeno u N2 odeljku vs. vreme provedeno u N1 odeljku	GG	6	2	1,782	0,075	6	3	1,572	0,116
	SI	7	2	0,028	0,043	7	10,5	0,592	0,554
Vreme provedeno u odeljku sa poznatom jedinkom (N1)	Faktor: društveno okruženje GG vs. SI		rana adolescencija			srednja adolescencija			
	Mann Whitney U-test		U	Z	p	U	Z	p	
			6	-2,143	0,032	19	-0,286	0,775	
	Faktor: Maturacija		rana vs. srednja adolescencija						
	Wilcoxon test			N	t	Z	p		
		GG	6	8	0,524	0,600			
		SI	7	9	0,485	0,398			
Vreme provedeno u centru (C)	Faktor: društveno okruženje GG vs. SI		rana adolescencija			srednja adolescencija			
	Mann Whitney U-test		U	Z	p	U	Z	p	
			9,5	-1,643	0,100	6,5	2,071	0,038	
	Faktor:		rana vs. srednja adolescencija						

	Maturacija <i>Wilcoxon test</i>		N	t	Z	p			
	GG		6	6	0,943	0,345			
	SI		7	6	1,352	0,176			
Vreme provedeno u odeljku sa socijalnom novinom (N2)	Faktor: društveno okruženje GG vs. SI <i>Mann Whitney U-test</i>	rana adolescencija			srednja adolescencija				
		U	Z	p	U	Z	p		
		11	1,429	0,153	20	0,143	0,886		
	Faktor: Maturacija <i>Wilcoxon test</i>	rana vs. srednja adolescencija							
			N	t	Z	p			
		GG	6	10	0,105	0,197			
	SI	7	7	0,183	0,237				
Preferenca socijalne novine kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije									
Slika 4.10A	<i>dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Post hoc test</i>					
Broj prilaza poznatoj jedinici (N1)	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 4,476, p = 0,058$	bez značajnosti između grupa						
	<i>maturacija</i>	$F_{(1,11)} = 4,227, p = 0,064$							
	<i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 4,227, p = 0,064$							
Broj prilaza novoj jedinici (N2)	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 1,959, p = 0,189$	bez značajnosti između grupa						
	<i>maturacija</i>	$F_{(1,11)} = 0,075, p = 0,789$							
	<i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 0,165, p = 0,692$							
Ukupan broj prilaza (N1+N2)	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 0,168, p = 0,690$	bez značajnosti između grupa						
	<i>maturacija</i>	$F_{(1,11)} = 3,866, p = 0,075$							
	<i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 4,320, p = 0,062$							
Slika 4.10B	<i>dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Post hoc test</i>					
Preferenca bazirana na broju prilaza (DI _{bp})	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 3,254, p = 0,099$	bez značajnosti između grupa						
	<i>maturacija</i>	$F_{(1,11)} = 0,967, p = 0,347$							
	<i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 0,212, p = 0,654$							
Slika 4.10C	<i>dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Tukey (HSD)</i>					
Vreme provedeno u istraživanju N1	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 9,590, p = 0,010$	GG rana vs. GG srednja	$p = 0,998$					
	<i>maturacija</i>	$F_{(1,11)} = 1,526, p = 0,242$	SI rana vs. SI srednja	$p = 0,241$					
	<i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 2,250, p = 0,162$	GG rana vs. SI rana	$p = 0,017$					
				GG srednja vs. SI srednja	$p = 0,946$				
Vreme provedeno u istraživanju N2	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 0,018, p = 0,897$	bez značajnosti između grupa						
	<i>maturacija</i>	$F_{(1,11)} = 0,006, p = 0,939$							
	<i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 0,026, p = 0,875$							
Vreme provedeno u istraživanju (N1+N2)	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 2,056, p = 0,179$	bez značajnosti između grupa						
	<i>maturacija</i>	$F_{(1,11)} = 0,673, p = 0,429$							
	<i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 1,433, p = 0,256$							
Slika 4.10D	<i>dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Post hoc test</i>					
Preferenca bazirana na vremenu istraživanja (DI _{vi})	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 4,695, p = 0,053$	bez značajnosti između grupa						
	<i>maturacija</i>	$F_{(1,11)} = 0,665, p = 0,432$							
	<i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 0,251, p = 0,626$							
Preferenca socijalnog mirisa kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije									
Slika 4.11A	<i>dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Tukey (HSD)</i>					
Broj prilaza kutijici sa socijalnim mirisom (M1)	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 0,041, p = 0,843$	GG rana vs. GG srednja	$p = 0,954$					
	<i>maturacija</i>	$F_{(1,11)} = 6,723, p = 0,021$	SI rana vs. SI srednja	$p = 0,032$					
	<i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,11)} = 3,478, p = 0,083$	GG rana vs. SI rana	$p = 0,763$					
				GG srednja vs. SI srednja	$p = 0,898$				
	Faktor: maturacija pod odgovarajućim društvenim okruženjem rana vs. srednja adolescencija <i>Wilcoxon test</i>					Faktor: društveno okruženje GG vs. SI <i>Mann Whitney U-test</i>			
		N	T	Z	p		U	Z	p
Broj prilaza kutijici bez socijalnog mirisa (BM)	GG	8	10	0,676	0,499	rana	22	-1,05	0,294
	SI	8	9,5	1,190	0,234	srednja	20	-1,26	0,208
	<i>dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Tukey (HSD)</i>					
Ukupan broj prilaza	<i>društveno okruženje</i>	$F_{(1,14)} = 0,623, p = 0,443$			GG rana vs. GG srednja		$p = 0,756$		

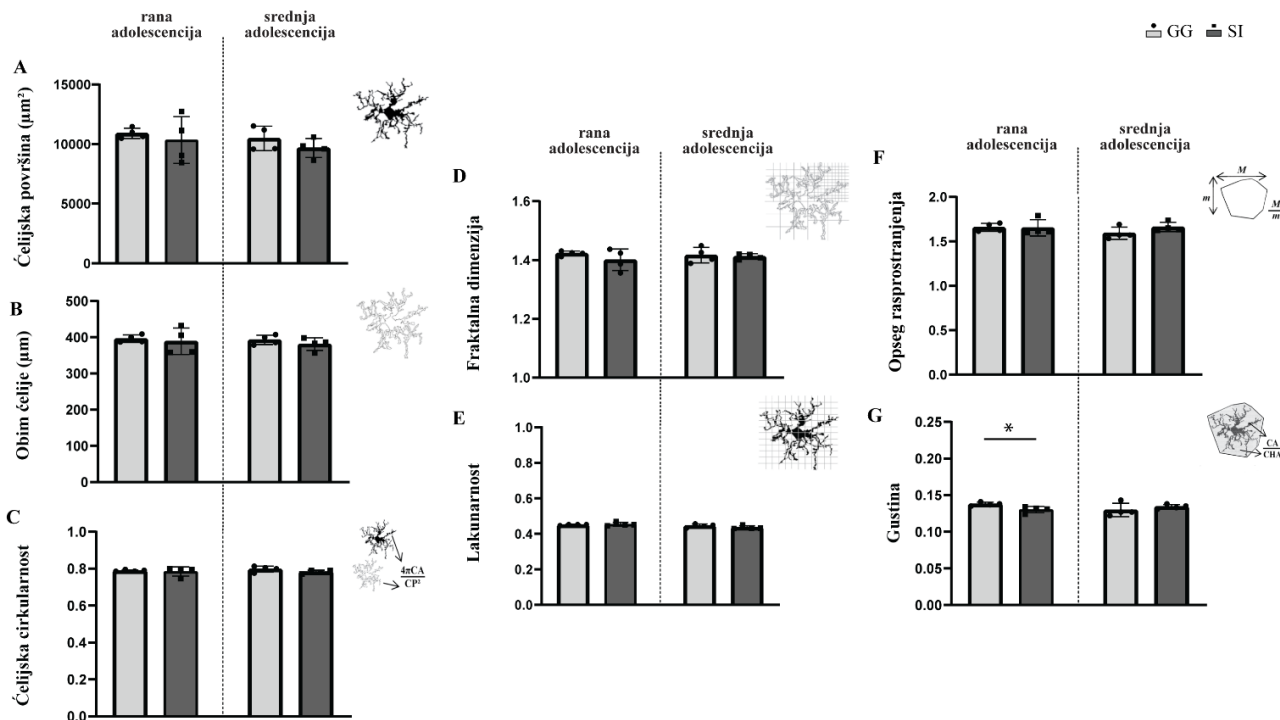
(M1+BM)	<i>maturacija</i> $F_{(1,14)} = 4,718, p = 0,048$					SI rana vs. SI srednja	$p = 0,208$		
	<i>maturacija x okruženje</i> $F_{(1,14)} = 0,590, p = 0,455$					GG rana vs. SI rana	$p = 1,000$		
						GG srednja vs. SI srednja	$p = 0,719$		
Slika 4.11B	Faktor: <i>maturacija pod odgovarajućim društvenim okruženjem</i> <i>rana vs. srednja adolescencija</i> <i>Wilcoxon test</i>					Faktor: <i>društveno okruženje</i> <i>GG vs. SI</i> <i>Mann Whitney U-test</i>			
		N	T	Z	<i>p</i>		U	Z	<i>p</i>
Preferenca bazirana na broju prilaza sa socijalnim mirisom 1 (DI _{bp})	GG	8	12	0,840	0,401	rana	13	1,995	0,046
	SI	8	10	0,676	0,499	srednja	30	0,210	0,834
Slika 4.11C	<i>dvofaktorska ANOVA</i>					<i>Tukey (HSD)</i>			
Vreme provedeno u istraživanju kutijice sa socijalnim mirisom 1 (M1)	<i>društveno okruženje</i> $F_{(1,14)} = 3,864, p = 0,070$					GG rana vs. GG srednja	$p = 0,927$		
	<i>maturacija</i> $F_{(1,14)} = 10,860, p = 0,005$					SI rana vs. SI srednja	$p = 0,006$		
	<i>maturacija x okruženje</i> $F_{(1,14)} = 5,913, p = 0,029$					GG rana vs. SI rana	$p = 0,049$		
						GG srednja vs. SI srednja	$p = 0,999$		
Vreme provedeno u istraživanju kutijice bez socijalnog mirisa (BM)	<i>društveno okruženje</i> $F_{(1,14)} = 1,391, p = 0,258$					GG rana vs. GG srednja	$p = 0,106$		
	<i>maturacija</i> $F_{(1,14)} = 10,971, p = 0,005$					SI rana vs. SI srednja	$p = 0,171$		
	<i>maturacija x okruženje</i> $F_{(1,14)} = 0,040, p = 0,844$					GG rana vs. SI rana	$p = 0,769$		
						GG srednja vs. SI srednja	$p = 0,896$		
Ukupno vreme istraživanja (M1+BM)	<i>društveno okruženje</i> $F_{(1,14)} = 0,478, p = 0,402$					GG rana vs. GG srednja	$p = 0,490$		
	<i>maturacija</i> $F_{(1,14)} = 15,381, p = 0,002$					SI rana vs. SI srednja	$p = 0,005$		
	<i>maturacija x okruženje</i> $F_{(1,14)} = 3,488, p = 0,083$					GG rana vs. SI rana	$p = 0,301$		
						GG srednja vs. SI srednja	$p = 0,928$		
Slika 4.11D	Faktor: <i>maturacija pod odgovarajućim društvenim okruženjem</i> <i>rana vs. srednja adolescencija</i> <i>Wilcoxon test</i>					Faktor: <i>društveno okruženje</i> <i>GG vs. SI</i> <i>Mann Whitney U-test</i>			
		N	T	Z	<i>p</i>		U	Z	<i>p</i>
Preferenca bazirana na vremenu istraživanja (DI _{vi})	GG	8	14	0,560	0,575	rana	9	2,415	0,016
	SI	8	3	2,100	0,036	srednja	27	0,525	0,600
Preferenca novog socijalnog mirisa kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije									
Slika 4.12A	<i>dvofaktorska ANOVA</i>					<i>Post hoc test</i>			
Broj prilaza kutijici sa poznatim socijalnim mirisom (M1)	<i>društveno okruženje</i> $F_{(1,14)} = 2,168, p = 0,163$ <i>maturacija</i> $F_{(1,14)} = 0,107, p = 0,748$ <i>maturacija x okruženje</i> $F_{(1,14)} = 4,834, p = 0,055$					bez značajnosti između grupa			
Broj prilaza kutijici sa novim socijalnim mirisom (M2)	<i>društveno okruženje</i> $F_{(1,14)} = 0,305, p = 0,590$ <i>maturacija</i> $F_{(1,14)} = 0,888, p = 0,362$ <i>maturacija x okruženje</i> $F_{(1,14)} = 0,284, p = 0,603$					bez značajnosti između grupa			
Ukupan broj prilaza (M1+M2)	<i>društveno okruženje</i> $F_{(1,14)} = 2,028, p = 0,176$ <i>maturacija</i> $F_{(1,14)} = 0,671, p = 0,426$ <i>maturacija x okruženje</i> $F_{(1,14)} = 0,862, p = 0,369$					bez značajnosti između grupa			
Slika 4.12B	<i>dvofaktorska ANOVA</i>					<i>Post hoc test</i>			
Preferenca bazirana na broju prilaza (DI _{bp})	<i>društveno okruženje</i> $F_{(1,14)} = 0,340, p = 0,569$ <i>maturacija</i> $F_{(1,14)} = 0,134, p = 0,720$ <i>maturacija x okruženje</i> $F_{(1,14)} = 3,932, p = 0,067$					bez značajnosti između grupa			
Slika 4.12C	<i>dvofaktorska ANOVA</i>					<i>Post hoc test</i>			
Vreme provedeno u istraživanju kutijice sa poznatim socijalnim mirisom (M1)	<i>društveno okruženje</i> $F_{(1,14)} = 1,036, p = 0,326$ <i>maturacija</i> $F_{(1,14)} = 0,048, p = 0,830$ <i>maturacija x okruženje</i> $F_{(1,14)} = 2,194, p = 0,161$					bez značajnosti između grupa			
	Faktor: <i>maturacija pod odgovarajućim društvenim okruženjem</i> <i>rana vs. srednja adolescencija</i> <i>Wilcoxon test</i>					Faktor: <i>društveno okruženje</i> <i>GG vs. SI</i> <i>Mann Whitney U-test</i>			
		N	t	Z	<i>p</i>		U	Z	<i>p</i>

Vreme provedeno u istraživanju kutijice sa novim socijalnim mirisom (M2)	GG	8	5,5	1,750	0,080	rana	20,5	1,208	0,227	
	SI	8	6	1,680	0,093	srednja	22,5	0,998	0,318	
Ukupno vreme istraživanja (M1+M2)	GG	8	11,5	0,910	0,363	rana	17,5	1,523	0,128	
	SI	8	6	1,680	0,093	srednja	27	0,525	0,600	
Slika 4.12D	<i>dvofaktorska ANOVA</i>					<i>Post hoc test</i>				
Preferenca bazirana na vremenu istraživanja (DI _{vi})	<i>društveno okruženje</i> <i>maturacija</i> <i>maturacija x okruženje</i>	$F_{(1,14)} = 0,400, p = 0,537$				GG rana vs. GG srednja				$p = 0,186$
		$F_{(1,14)} = 5,497, p = 0,034$				SI rana vs. SI srednja				$p = 0,657$
		$F_{(1,14)} = 0,483, p = 0,499$				GG rana vs. SI rana				$p = 0,780$
						GG srednja vs. SI srednja				$p = 1,000$
Broj parvalbumin (PV) imunoreaktivnih neurona u dorzalnom hipokampusu (CA1, CA2 i CA3 subregion) peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije										
		Faktor: <i>maturacija pod odgovarajućim društvenim okruženjem</i> rana vs. srednja adolescencija <i>Mann Whitney U-test</i>					Faktor: <i>društveno okruženje</i> GG vs. SI <i>Mann Whitney U-test</i>			
Slika 4.13C		N	U	Z	<i>p</i>		U	Z	<i>p</i>	
PV neuroni u CA1 subregionu	GG	4	8	0	1	rana	7	0,289	0,773	
	SI	4	5	-0,866	0,386	srednja	8	0	1	
Slika 4.13D		N	U	Z	<i>p</i>		U	Z	<i>p</i>	
PV neuroni u CA2 subregionu	GG	4	5	0,866	0,386	rana	4	-1,155	0,248	
	SI	4	7	-0,289	0,773	srednja	6,5	-0,433	0,665	
Slika 4.13E		N	U	Z	<i>p</i>		U	Z	<i>p</i>	
PV neuroni u CA3 subregionu	GG	4	1	-2,021	0,043	rana	7,5	-0,144	0,885	
	SI	4	0	-2,309	0,021	srednja	5	0,866	0,386	
Broj parvalbumin (PV) imunoreaktivnih neurona u dentatnom girusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije										
Slika 4.14B		N	U	Z	<i>p</i>		U	Z	<i>p</i>	
PV neuroni u DG subregionu	GG	4	4,5	1,010	0,312	rana	1	2,021	0,043	
	SI	4	4	-1,155	0,248	srednja	4	1,155	0,248	

4.9. Aktivacioni fenotip mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije

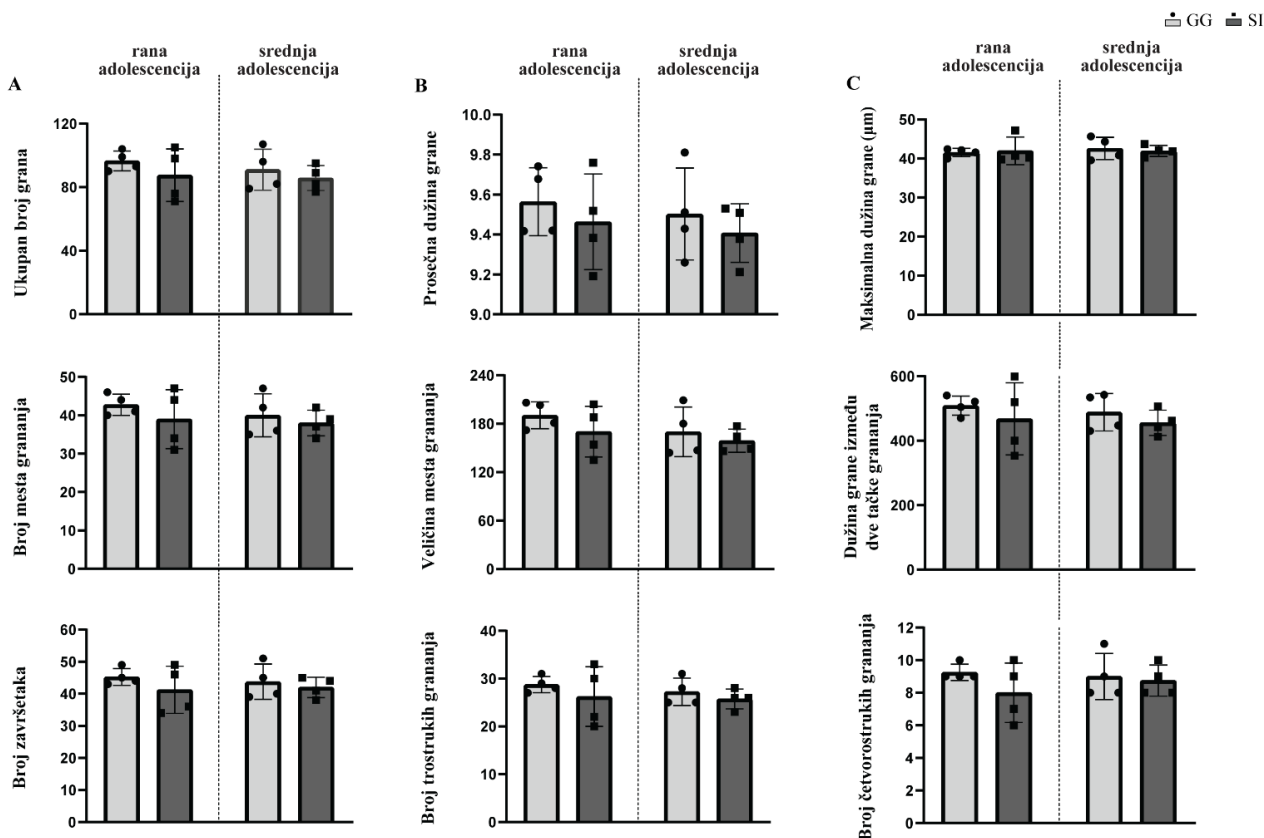
Detaljna analiza aktivacionog fenotipa mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu rađena je na grupno gajenim i socijalno izolovanim životinjama nakon jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43, rana i srednja adolescencija) gajenja u definisanim uslovima. Tabelarni prikaz parametara, statističkih komparacija i dobijenih p vrednosti dat je u Tabeli 3.

Fraktalna analiza je pokazala da faktori *društveno okruženje* i *maturacija* ne utiču značajno na analizirane parametre: ćelijska površina, obim ćelije, ćelijska cirkularnost, fraktalna dimenzija, lakunarnost, kao i opseg rasprostranjenja (Slika 4.15A-F). Jedina promena u parametrima fraktalne analize mikroglijskih ćelija se ogledala u statistički značajno manjoj gustini ćelija dentatnog girusa rano adolescentnih SI jedinki u odnosu na njihove GG vršnjake (Slika 4.15G, $*p=0,030$, U -test), dok je vrednost ovog parametra kod srednje adolescentnih jedinki bila slična između SI i GG životinja.



Slika 4.15 Fraktalna analiza mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43, rana i srednja adolescencija). Analize su rađene na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). (A) Ćelijska površina. (B) Obim ćelije. (C) Ćelijska cirkularnost. (D) Fraktalna dimenzija. (E) Lakunarnost. (F) Opseg rasprostranjenja. (G) Gustina. $*p \leq 0,05$ (SI u odnosu na GG u okviru istog perioda maturacije). Statistička poređenja i tačne p vrednosti su date u Tabeli 3. GG – grupno gajene/kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje.

Skeletonizacija je pokazala odsustvo statistički značajnih razlika u svim ispitivanim parametrima, odnosno: ukupan broj mikroglijskih nastavaka (grana), prosečna i maksimalna dužina grana, broj mesta grananja, veličina mesta grananja, dužina grana između dve tačke grananja, broj završetaka grana, kao i broj trostrukih i četvorostrukih grananja (Slika 4.16A-C) kod svih eksperimentalnih grupa (GG vs. SI, faktor društveno okruženje, kao i faktor maturacija).



Slika 4.16 Skeletonizacija mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43, rana i srednja adolescencija). Analize su rađene na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). (A) Ukupan broj grana, broj mesta grananja, broj završetaka. (B) Prosečna dužina grane, veličina mesta grananja, broj trostrukih grananja. (C) Maksimalna dužina grane, dužina grane između dve tačke grananja, broj četvorostrukih grananja. Statistička poređenja i tačne p vrednosti su date u Tabeli 3. GG – grupno gajene/kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje.

Tabela 3. Sumirani prikaz analiziranih parametara, testova korišćenih u statističkoj analizi, dobijenih p vrednosti i broja korišćenih životinja (n) za rezultate prikazane u okviru podnaslova 4.9. Analizirani su parametri kod peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolovanih tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43, rana i srednja adolescencija). GG - grupno gajene životinje po tri u kavezu, SI - socijalno izolovane životinje

Aktivacioni fenotip mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije								
Slika 4.15	Fraktalna analiza mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije							
	Faktor: Maturacija pod odgovarajućim društvenim okruženjem rana vs. srednja adolescencija <i>Mann Whitney U-test</i>				Faktor: društveno okruženje GG vs. SI <i>Mann Whitney U-test</i>			
$n = 4$		U	Z	p		U	Z	p
Slika 4.15A	rani GG vs. srednji GG	7	0,289	0,733	rana	7	0,144	0,885
	rani SI vs. srednji SI	7	0,289	0,733	srednja	6	0,433	0,665
Slika 4.15B	rani GG vs. srednji GG	7	0,289	0,733	rana	7	0,144	0,885

	rani SI vs. srednji SI	6	0,577	0,564	srednja	4	1,010	0,312
Slika 4.15C	rani GG vs. srednji GG	4	-1,155	0,248	rana	4	-1,010	0,312
	rani SI vs. srednji SI	4	-1,155	0,248	srednja	2	1,588	0,112
Slika 4.15D	rani GG vs. srednji GG	7	0,289	0,773	rana	6	0,433	0,665
	rani SI vs. srednji SI	8	0,000	1,000	srednja	8	0,000	1,000
Slika 4.15E	rani GG vs. srednji GG	5	0,866	0,386	rana	6	0,433	0,665
	rani SI vs. srednji SI	2	1,732	0,083	srednja	3	1,299	0,194
Slika 4.15F	rani GG vs. srednji GG	2	1,732	0,083	rana	5	0,722	0,470
	rani SI vs. srednji SI	6	-0,577	0,564	srednja	2	-1,588	0,112
Slika 4.15G	rani GG vs. srednji GG	4	1,155	0,248	rana	0	2,165	0,030
	rani SI vs. srednji SI	5	-0,866	0,386	srednja	4	-1,010	0,312
Slika 4.16	Skeletonizacija mikrogljivskih ćelija u dentatnom girusu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije							
	Faktor: Maturacija pod odgovarajućim društvenim okruženjem rana vs. srednja adolescencija <i>Mann Whitney U-test</i>				Faktor: društveno okruženje GG vs SI <i>Mann Whitney U-test</i>			
Slika 4.16A		U	Z	p		U	Z	p
Ukupan broj grana	rani GG vs. srednji GG	6	0,577	0,564	rana	6	0,433	0,665
	rani SI vs. srednji SI	8	0,000	1,000	srednja	6	0,433	0,665
Prosečna dužina grane	rani GG vs. srednji GG	8	0,000	1,000	rana	6	0,433	0,665
	rani SI vs. srednji SI	7	0,289	0,773	srednja	6	0,433	0,665
Maksimalna dužina grane	rani GG vs. srednji GG	7	-0,289	0,773	rana	7	0,144	0,885
	rani SI vs. srednji SI	5	-0,866	0,386	srednja	6	0,433	0,665
Slika 4.16B		U	Z	p		U	Z	p
Broj mesta grananja	rani GG vs. srednji GG	6	0,577	0,564	rana	7	0,144	0,885
	rani SI vs. srednji SI	8	0,000	1,000	srednja	6	0,433	0,665
Veličina mesta grananja	rani GG vs. srednji GG	5	0,866	0,386	rana	5	0,722	0,470
	rani SI vs. srednji SI	6	0,577	0,564	srednja	7	0,144	0,885
Dužina grane između dve tačke grananja	rani GG vs. srednji GG	7	0,289	0,773	rana	6	0,433	0,665
	rani SI vs. srednji SI	8	0,000	1,000	srednja	5	0,722	0,470
Slika 4.16C		U	Z	p		U	Z	p
Broj završetaka	rani GG vs. srednji GG	7	0,289	0,773	rana	7	0,144	0,885
	rani SI vs. srednji SI	8	0,000	1,000	srednja	6	0,433	0,665
Broj trostrukih grananja	rani GG vs. srednji GG	5	0,866	0,386	rana	7	0,144	0,885
	rani SI vs. srednji SI	8	0,000	1,000	srednja	6	0,433	0,665
Broj četvorostrukih grananja	rani GG vs. srednji GG	6	0,577	0,564	rana	6	0,433	0,665
	rani SI vs. srednji SI	7	-0,289	0,773	srednja	7	-0,144	0,885

4.10. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u perifernim organima i eritrocitima, kao i biohemijski parametri iz krvi i promene u telesnoj masi peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji i dodatno izlaganih prekonocnom gladovanju

4.10.1. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u perifernim organima i eritrocitima

Kako bi se ispitaio uticaj socijalne izolacije na aktivnost enzima antioksidativnog sistema u perifernim organima i eritrocitima izolovani su jetra, bubreg, srce i testisi, krv i eritrociti peripubertetskih pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne nedelje, u periodu rane adolescencije, i dve nedelje, u periodu rane i srednje adolescencije. Radi sticanja boljeg uvida u to kako socijalno okruženje utiče na kapacitet antioksidativnog sistema da odgovori na dodatni stres, deo eksperimentalnih životinja izlagan je stresoru prekonocnog gladovanja.

Za analizu uticaja faktora *društveno okruženje i prekonocno gladovanje* na aktivnost enzima antioksidativnog sistema u perifernim organima i eritrocitima peripubertetskih mužjaka pacova korišćene su jedinke koje su shodno uslovima gajenja pripadale jednoj od sledećih grupa: grupno gajene jedinke koje su izlagane prekonocnom gladovanju (GGg), grupno gajene jedinke koje nisu gladovale (GGng), socijalno izolovane jedinke koje su izlagane prekonocnom gladovanju (SIg) i socijalno izolovane jedinke koje nisu gladovale (SIng). Navedene grupe su formirane i za rano adolescentnu i za srednje adolescentnu kohortu jedinki. Statistička analiza vršena je korišćenjem dvofaktorske ANOVA i Unequal N HSD analiza, kao i *post hoc* testa gde je bilo indikovano. Testovi korišćeni u statističkoj analizi podataka i dobijeni statistički parametri, uključujući *p* vrednosti, su dati tabelarno (Tabela 4-8).

4.10.1.1. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u jetri

Detaljni prikaz parametara aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u jetri peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji i izlaganih stresu prekonocnog gladovanja, primenjeni statistički testovi i dobijene statističke vrednosti sumirane su u Tabeli 4.

KAT: Faktori *društveno okruženje i prekonocno gladovanje*, kao i međusobna interakcija ova dva faktora nisu značajno uticali na aktivnost KAT u jetri peripubertetskih mužjaka pacova u ranom adolescentnom periodu. Tokom sazrevanja, *gladovanje* je postalo značajan faktor ($F_{(1,31)}=10,035$, $p=0,003$) uticaja na aktivnost KAT u jetri srednje adolescentnih peripubertetskih pacova, dok faktor *društveno okruženje* i interakcija faktora *društveno okruženje i gladovanje* ANOVA analiza nije prepoznala kao značajne.

GSH-Px: Dvofaktorska ANOVA analiza je ukazala da *gladovanje* značajno utiče na aktivnost GSH-Px u jetri peripubertetskih mužjaka pacova u ranom adolescentnom dobu ($F_{(1,29)}=59,118$, $p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanu aktivnost ovog enzima u jetri grupno gajenih jedinki koje su gladovale u odnosu na grupno gajene jedinke koje nisu gladovale (GGg vs. GGng, $p<0,001$), kao i jetri socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u odnosu na izolovane jedinke koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p<0,001$). Takođe, ista promena je primećena i kod životinja u srednjem adolescentnom dobu ($F_{(1,31)}=49,095$, $p<0,001$), gde je *post hoc* analiza (Unequal N HSD) ukazala na povećanu aktivnost GSH-Px u jetri jedinki koje su gladovale u poređenju sa jedinkama koje nisu gladovale, u okviru istog režima gajenja (GGg vs. GGng, $p<0,001$; SIg vs. SIng, $p<0,001$). Ovi rezultati ukazuju da faktor *gladovanje* dovodi do povećanja aktivnosti GSH-Px u oba režima socijalnog okruženja u obe ispitivane starosne grupe životinja.

GR: Dvofaktorska ANOVA je ukazala da *gladovanje* značajno utiče na aktivnost ovog enzima u jetri peripubertetskih mužjaka ranog adolescentnog dobu ($F_{(1,29)}=12,799$, $p=0,001$). Dodatna *post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na smanjenje aktivnosti ovog enzima kod socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u poređenju sa izolovanim jedinkama koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p=0,032$). Faktor *društveno okruženje*, kao i *okruženje x gladovanje* se nisu pokazali kao značajni za promenu aktivnosti ovog enzima u jetri u ranom i srednjem adolescentnom dobu. Takođe,

ni jedan od faktora zasebno, kao i njihova interakcija se nisu pokazali kao značajni za promenu aktivnosti ovog enzima u jetri srednje adolescentnih životinja.

SOD (ukupna forma): Faktor *gladovanje* ($F_{(1,29)}=12,173, p=0,002$), kao i njegova interakcija sa faktorom *društveno okruženje* ($F_{(1,29)}=8,926, p=0,006$) doveli su do značajnih promena u aktivnosti SOD enzima u jetri peripubertetskih mužjaka pacova u ranom adolescentnom dobu, dok se *društveno okruženje* kao samostalni faktor nije pokazao kao značajan. Dodatna *post hoc* analiza (Unequal N HSD) ukazala je na značajno smanjenje aktivnosti ukupne SOD u jetri rano adolescentnih socijalno izolovanih životinja koje su gladovale u odnosu na socijalno izolovane jedinke iste starosti koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p<0,001$). Faktor *gladovanje* značajno je uticao i na aktivnost ukupne SOD u jetri srednje adolescentnih socijalno izolovanih životinja ($F_{(1,31)}=20,291, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na smanjenu aktivnost ovog enzima u jetri socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u odnosu na socijalno izolovane jedinke iste starosti koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p=0,002$). Faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *društveno okruženje x gladovanje*, nisu pokazali značajan uticaj na aktivnosti ukupne SOD u jetri životinja srednjeg adolescentnog doba.

CuZnSOD (SOD1): Trend promena uočen kod ukupne SOD uočen je i kod SOD1. Faktor *gladovanje* ($F_{(1,29)}=11,575, p=0,002$), kao i *društveno okruženje x gladovanje* ($F_{(1,29)}=8,556, p=0,007$) značajno su uticali na aktivnost SOD1 u jetri jedinki gajenih izolovano ili u grupama po tri tokom rane adolescencije, dok se *društveno okruženje* kao samostalni faktor nije pokazao kao značajan. *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na značajno smanjenje enzimske aktivnosti u jetri rano adolescentnih socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u odnosu na socijalno izolovane jedinke iste starosti koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p<0,001$). Kod životinja koje su dve nedelje gajene izolovano ili u grupama po tri, faktor *gladovanje* pokazao se kao značajan za aktivnost SOD1 ($F_{(1,31)}=18,911, p<0,001$). Dodatnom *post hoc* analizom (Unequal N HSD) je pokazano da srednje adolescentne socijalno izolovane jedinke koje su gladovale imaju nižu aktivnost ovog enzima u jetri u odnosu na socijalno izolovane jedinke iste starosti koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p = 0,002$). Faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *okruženje x gladovanje* nisu pokazali značajan uticaj na aktivnosti SOD1 u jetri životinja srednjeg adolescentnog doba.

MnSOD (SOD2): Dvofaktorska ANOVA analiza je pokazala da kod rano adolescentnih životinja, nakon jedne nedelje gajenja u izolaciji ili u grupama po tri, oba analizirana faktora, kao i njihova interakcija značajno utiču na aktivnost SOD2 u jetri (*društveno okruženje* $F_{(1,29)}=11,933, p=0,002$; *gladovanje* $F_{(1,29)}=7,219, p=0,012$; *društveno okruženje x gladovanje* $F_{(1,29)}=4,361, p=0,046$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) ukazala je da rano adolescentne socijalno izolovane jedinke koje su gladovale imaju nižu aktivnost ovog enzima u jetri u odnosu na socijalno izolovane jedinke iste starosti koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p=0,012$), ali i u odnosu na grupno gajene jedinke iste starosti koje su gladovale (SIg vs. GGg, $p=0,003$). Nakon dve nedelje gajenja u izolaciji ili u grupama po tri, faktor *gladovanje* pokazao se kao značajan za aktivnost SOD2 u jetri ($F_{(1,31)}=10,389, p=0,003$), ali *post hoc* komparacija (Unequal N HSD) nije ukazala na značajne razlike između grupa srednje adolescentnih jedinki.

4.10.1.2. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u bubregu

Detaljni prikaz parametara aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u bubregu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji i izlaganih stresu prekonocnog gladovanja, primenjeni statistički testovi i dobijene statističke vrednosti sumirane su u Tabeli 5.

KAT: Faktori *društveno okruženje* i *gladovanje*, kao i njihova interakcija se nisu pokazali kao značajni u regulaciji aktivnosti ovog enzima u bubregu peripubertetskih mužjaka pacova tokom rane adolescencije. Kod srednje adolescentnih jedinki, koje su dve nedelje, tokom rane i srednje adolescencije, gajene izolovano ili u grupama po tri, dvofaktorska ANOVA je pokazala da je *gladovanje* značajan faktor u regulaciji aktivnosti ovog enzima ($F_{(1,31)}=7,304, p<0,001$), ali bez značajnih razlika između eksperimentalnih grupa srednje adolescentnih životinja.

GSH-Px: Faktor *gladovanje* ($F_{(1,29)}=157,100, p<0,001$), kao i *društveno okruženje x gladovanje* ($F_{(1,29)}=4,662, p=0,039$) pokazali su se kao značajni za regulaciju aktivnosti GSH-Px u tkivu bubrega rano adolescentnih mužjaka pacova, nakon jedne nedelje gajenja u izolaciji ili u grupama po tri, dok to nije bio slučaj za faktor *društveno okruženje*. Kod srednje adolescentnih mužjaka pacova, nakon dve nedelje gajenja u izolaciji ili u grupama po tri, kao značajan se pokazao faktor *gladovanje* ($F_{(1,31)}=141,218, p<0,001$), dok faktor *društveno okruženje*, kao i *okruženje x gladovanje* nisu pokazali statistički značajan uticaj. Dodatna *post hoc* analiza (Unequal N HSD) je pokazala povećanu aktivnost ovog enzima u bubregu jedinki koje su gladovale u oba režima socijalnog okruženja (GGg vs. GGng, $p<0,001$; SIg vs. SIng, $p<0,001$), kako kod rano adolescentnih jedinki tako i kod srednje adolescentnih jedinki. Takođe, kod rano adolescentnih mužjaka pacova uočena je povećana aktivnost GSH-Px u bubregu socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim jedinkama koje su gladovale (SIg vs. GGg, $p=0,035$). Kod srednje adolescentnih jedinki nije bilo značajnih razlika između grupa koje su živele u različitim socijalnim uslovima i bile izlagane prekonocnom gladovanju (SIg vs. GGg, $p=0,896$).

GR: Faktor *gladovanje* je značajno uticao na aktivnost GR u bubregu peripubertetskih pacova u ranom adolescentnom dobu ($F_{(1,29)}=33,968, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanje aktivnosti ovog enzima kod jedinki koje su gladovale u odnosu na one koje nisu gladovale, za oba uslova društvenog okruženja (GGg vs. GGng, $p=0,006$; SIg vs. SIng, $p<0,001$). Faktor *gladovanje* je pokazao značajan uticaj na aktivnost GR u bubregu srednje adolescentnih životinja gajenih dve nedelje u grupi ili socijalnoj izolaciji ($F_{(1,31)}=13,055, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je pokazala povećanje aktivnosti ovog enzima u bubregu srednje adolescentnih socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u poređenju sa izolovanim jedinkama iste starosti koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p=0,025$). Faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *društveno okruženje x gladovanje* nisu značajno uticali na aktivnost GR enzima ni u jednoj starosnoj grupi eksperimentalnih životinja.

SOD (ukupna forma): Faktor *gladovanje* je pokazao značajan uticaj na aktivnost SOD u bubregu rano adolescentnih mužjaka pacova gajenih nedelju dana u izolaciji ili u grupama po tri ($F_{(1,29)}=15,707, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanje aktivnosti ovog enzima kod socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u odnosu na socijalno izolovane jedinke koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p=0,020$). Faktor *gladovanje* je značajno uticao i na aktivnost SOD u bubregu srednje adolescentnih mužjaka pacova gajenih dve nedelje u grupama od po tri ili u izolaciji ($F_{(1,31)}=7,019, p=0,013$). *Post hoc* analiza je ukazala na povećanje aktivnosti ovog enzima u bubregu grupno gajenih jedinki koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim vršnjacima koji su siti, odnosno normalno hranjeni (GGg vs. GGng, $p=0,014$). Faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *okruženje x gladovanje* nisu značajno uticali na aktivnost SOD ni u jednoj starosnoj grupi eksperimentalnih životinja.

CuZnSOD (SOD1): Faktor *gladovanje* je pokazao značajan uticaj na aktivnost SOD1 u bubregu rano adolescentnih pacova, nakon jedne nedelje gajenja u u izolaciji ili u grupama po tri ($F_{(1,29)}=15,418, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je pokazala na povećanje aktivnosti ovog enzima kod socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u odnosu na socijalno izolovane jedinke koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p=0,023$). Faktor *gladovanje* je značajno uticao na aktivnost SOD1 u bubregu srednje adolescentnih pacova, nakon dve nedelje gajenja u izolaciji ili u grupama po tri ($F_{(1,31)}=6,530, p=0,016$). Dodatna *post hoc* analiza ukazala je na povećanje aktivnosti ovog enzima u bubregu grupno gajenih jedinki koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim jedinkama koje nisu gladovale (GGg vs. GGng, $p=0,017$). Faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *okruženje x gladovanje* nisu značajno uticali na aktivnost SOD1 ni u jednoj starosnoj grupi eksperimentalnih životinja.

MnSOD (SOD2): Faktor *gladovanje* ($F_{(1,29)}=17,710, p<0,001$), kao i interakcija faktora *društveno okruženje x gladovanje* ($F_{(1,29)}=10,236, p=0,003$) značajno su uticali na aktivnost SOD2 u bubregu rano adolescentnih mužjaka pacova. *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je pokazala povećanje aktivnosti SOD2 u bubregu socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u odnosu na

socijalno izolovane jedinke koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p < 0,001$) kao i na smanjenje aktivnosti SOD2 u bubregu socijalno izolovanih u poređenju sa grupno gajenim jedinkama koje nisu gladovale (SIng vs. GGng, $p = 0,017$). Faktor *gladovanje* je pokazao značajan uticaj na aktivnost SOD2 u bubregu srednje adolescentnih mužjaka pacova, nakon dve nedelje gajenja u izolaciji ili u grupama po tri ($F_{(1,29)} = 12,812$, $p = 0,001$).

Post hoc analiza (Unequal N HSD) je ukazala na porast aktivnosti ovog enzima kod grupno gajenih životinja koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim jedinkama koje nisu gladovale (GGg vs. GGng, $p = 0,012$). Kod rano adolescentnih i srednje adolescentnih životinja faktor *društveno okruženje* se nije pokazao kao značajan u regulaciji aktivnosti SOD2 u bubregu. Kod srednje adolescentnih životinja interakcija faktora *okruženje x gladovanje* takođe nije ocenjena kao statistički značajna za regulaciju aktivnosti SOD2 u bubregu ovih životinja.

4.10.1.3. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u testisima

Detaljni prikaz parametara aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u testisima peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji i izlaganih stresu prekonocnog gladovanja, primenjeni statistički testovi i dobijene statističke vrednosti sumirani su u Tabeli 6.

KAT: Faktori *društveno okruženje* i *gladovanje*, kao i njihova interakcija nisu značajno uticali na aktivnost KAT u testisima rano adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova. Faktor *gladovanje* se pokazao kao značajan za regulaciju aktivnosti KAT u testisima srednje adolescentnih pacova, gajenih u uslovima socijalne izolacije ili u grupi od tri, dve nedelje, tokom rane i srednje adolescencije ($F_{(1,31)} = 13,939$, $p < 0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanu aktivnost KAT u testisima srednje adolescentnih socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale u poređenju sa socijalno izolovanim jedinkama iste starosti koje nisu gladovale (SIg vs. SIng, $p = 0,006$).

GSH-Px: Faktori *društveno okruženje* ($F_{(1,29)} = 5,046$, $p = 0,032$) i faktor *gladovanje* ($F_{(1,29)} = 125,492$, $p < 0,001$) pokazali su se kao značajni za aktivnost GSH-Px u testisima rano adolescentnih mužjaka pacova. *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala da je aktivnost GSH-Px povećana u testisima rano adolescentnih grupno gajenih jedinki koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim jedinkama iste starosti koje nisu gladovale (GGg vs. GGng, $p < 0,001$), kao i testisima rano adolescentnih socijalno izolovanih životinja koje su gladovale u poređenju sa socijalno izolovanim životinjama iste starosti koje nisu gladovale (SIg vs. SIng; $p < 0,001$). Faktor *gladovanje* ($F_{(1,31)} = 84,632$, $p < 0,001$) i interakcija faktora *okruženje x gladovanje* ($F_{(1,31)} = 5,265$, $p = 0,029$) značajno su uticali na aktivnost GSH-Px u testisima srednje adolescentnih mužjaka pacova. *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanu aktivnost GSH-Px u testisima srednje adolescentnih životinja koje su gladovale u poređenju sa životinjama iste starosti koje nisu gladovale u oba analizirana režima socijalnog okruženja (GGg vs. GGng, $p < 0,001$; SIg vs. SIng, $p < 0,001$). Takođe, uočeno je da je aktivnost GSH-Px u testisima socijalno izolovanih jedinki koje su gladovale značajno niža u odnosu na grupno gajene životinje koje su gladovale (SIg vs. GGg, $p = 0,029$).

GR: Faktori *društveno okruženje* i *gladovanje*, kao i njihova interakcija se nisu pokazali kao značajni u regulaciji aktivnosti GR u testisima peripubertetskih mužjaka pacova obe ispitivane starosne grupe životinja (rano adolescentne životinje, gajene nedelju dana tokom faze rane adolescencije u uslovima socijalne izolacije ili u grupama od po tri i srednje adolescentne životinje, gajene dve nedelje, tokom faze rane i srednje adolescencije u uslovima socijalne izolacije ili u grupama od po tri).

SOD (ukupna forma): Faktori *društveno okruženje* i *gladovanje*, kao i njihova interakcija nisu značajno uticali na aktivnost ukupne SOD u testisima peripubertetskih mužjaka pacova ranog adolescentnog doba. Interakcija faktora *okruženje x gladovanje* se pokazala kao značajna za regulaciju aktivnosti ukupne SOD u testisima srednje adolescentnih peripubertetskih pacova ($F_{(1,31)} = 5,499$, $p = 0,026$), a *post hoc* analiza je ukazala na povećanu aktivnost ovog enzima u testisima srednje adolescentnih grupno gajenih životinja koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim životinjama koje nisu gladovale (GGg vs. GGng, $p = 0,045$).

Tabela 5. Detaljan prikaz parametara, primenjenih statističkih testova i dobijenih statističkih vrednosti za tkivo bubrega peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43 rana i srednja adolescencija). (GG – grupno gajene/kontrolne životinje; SI – socijalno izolovane životinje) i izlaganja dodatnom stresoru prekonocnog gladovanja (GGng – grupno gajene životinje koje nisu gladovale, SIng – socijalno izolovane životinje koje nisu gladovale, GGg – grupno gajene životinje koje su gladovale, SIng – socijalno izolovane životinje koje su gladovale).

	definisani uslovi gajenja (društveno okruženje)				Dvofaktorska ANOVA				Post hoc analiza (Unequal N HSD test)	
	BUBREG	jedna nedelja	dve nedelje		jedna nedelja	dve nedelje	jedna nedelja	dve nedelje		
KAT (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	243,13 ± 51,33	262,17 ± 80,66	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,039, p = 0,845$	$F_{(1,31)} = 0,129, p = 0,722$				
		261,48 ± 60,85	286,96 ± 63,22	gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,205, p = 0,654$	$F_{(1,31)} = 7,304, p < 0,001$	bez indikacije za Post hoc analizu	bez značajnosti između grupa		
	nakon prekonocnog gladovanja	278,06 ± 110,64	224,34 ± 55,30	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,841, p = 0,367$	$F_{(1,31)} = 0,727, p = 0,400$				
		249,64 ± 42,68	214,25 ± 32,90							
GSH-Px (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	120,18 ± 19,08	122,32 ± 25,13	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 3,896, p = 0,058$	$F_{(1,31)} = 0,925, p = 0,345$	GGg vs. GGng	GGg vs. GGng	$p < 0,001$	$p < 0,001$
		119,00 ± 18,56	131,26 ± 17,60	gladovanje	$F_{(1,29)} = 157,100, p < 0,001$	$F_{(1,31)} = 141,218, p < 0,001$	SIng vs. SIng	SIng vs. SIng	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	nakon prekonocnog gladovanja	186,50 ± 16,60	234,46 ± 30,78	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 4,662, p = 0,039$	$F_{(1,31)} = 0,000, p = 0,987$	SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,999$	$p = 0,918$
		212,91 ± 19,22	243,69 ± 34,20				SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,035$	$p = 0,896$
GR (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	141,56 ± 19,48	146,64 ± 18,98	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,119, p = 0,732$	$F_{(1,31)} = 0,154, p = 0,737$	GGg vs. GGng	GGg vs. GGng	$p = 0,006$	$p = 0,216$
		139,44 ± 16,19	135,42 ± 21,26	gladovanje	$F_{(1,29)} = 33,968, p < 0,001$	$F_{(1,31)} = 13,055, p < 0,001$	SIng vs. SIng	SIng vs. SIng	$p < 0,001$	$p = 0,025$
	nakon prekonocnog gladovanja	177,61 ± 22,14	172,66 ± 34,05	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,424, p = 0,520$	$F_{(1,31)} = 0,725, p = 0,401$	SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,997$	$p = 0,851$
		184,55 ± 21,22	177,48 ± 32,96				SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,893$	$p = 0,983$
ukupna SOD (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	56,03 ± 7,02	43,25 ± 11,49	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,055, p = 0,816$	$F_{(1,31)} = 0,025, p = 0,876$	GGg vs. GGng	GGg vs. GGng	$p = 0,097$	$p = 0,014$
		53,83 ± 17,46	51,96 ± 19,54	gladovanje	$F_{(1,29)} = 15,707, p < 0,001$	$F_{(1,31)} = 7,019, p = 0,013$	SIng vs. SIng	SIng vs. SIng	$p = 0,020$	$p = 0,956$
	nakon prekonocnog gladovanja	84,42 ± 25,78	66,01 ± 15,23	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,253, p = 0,619$	$F_{(1,31)} = 3,601, p = 0,067$	SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,998$	$p = 0,645$
		90,47 ± 34,37	55,73 ± 12,22				SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,955$	$p = 0,464$
CuZnSOD (SOD1) (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	54,60 ± 6,87	42,23 ± 11,66	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,063, p = 0,803$	$F_{(1,31)} = 0,024, p = 0,877$	GGg vs. GGng	GGg vs. GGng	$p = 0,097$	$p = 0,017$
		52,85 ± 17,40	50,81 ± 19,41	gladovanje	$F_{(1,29)} = 15,418, p < 0,001$	$F_{(1,31)} = 6,530, p = 0,016$	SIng vs. SIng	SIng vs. SIng	$p = 0,023$	$p = 0,967$
	nakon prekonocnog gladovanja	82,89 ± 25,69	64,34 ± 15,20	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,217, p = 0,645$	$F_{(1,31)} = 3,513, p = 0,070$	SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,999$	$p = 0,654$
		88,76 ± 34,27	54,21 ± 12,08				SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,958$	$p = 0,475$
MnSOD (SOD2) (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	1,43 ± 0,36	1,02 ± 0,38	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 1,890, p = 0,179$	$F_{(1,31)} = 0,005, p = 0,942$	GGg vs. GGng	GGg vs. GGng	$p = 0,895$	$p = 0,012$
		0,99 ± 0,19	1,16 ± 0,24	gladovanje	$F_{(1,29)} = 17,710, p < 0,001$	$F_{(1,31)} = 12,812, p = 0,001$	SIng vs. SIng	SIng vs. SIng	$p < 0,001$	$p = 0,328$
	nakon prekonocnog gladovanja	1,53 ± 0,17	1,68 ± 0,51	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 10,236, p = 0,003$	$F_{(1,31)} = 1,060, p = 0,311$	SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,017$	$p = 0,916$
		1,71 ± 0,36	1,52 ± 0,48				SIng vs. GGg	SIng vs. GGg	$p = 0,587$	$p = 0,857$

Tabela 6. Detaljan prikaz parametara, primenjenih statističkih testova i dobijenih statističkih vrednosti za tkivo testisa peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43 rana i srednja adolescencija) (GG – grupno gajene/kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje) i izlaganja dodatnom stresoru prekonocnog gladovanja (GGng – grupno gajene životinje koje nisu gladovale, SIng – socijalno izolovane životinje koje nisu gladovale, GGg – grupno gajene životinje koje su gladovale, SIg – socijalno izolovane životinje koje su gladovale).

	TESTISI	definisani uslovi gajenja (društveno okruženje)			Dvofaktorska ANOVA			Post hoc analiza Unequal N HSD test	
		jedna nedelja	dve nedelje	društveno okruženje	jedna nedelja	dve nedelje	jedna nedelja	dve nedelje	
KAT (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng 6,34 ± 0,93	6,21 ± 0,48	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,013, p = 0,911$	$F_{(1,31)} = 0,129, p = 0,722$	bez indikacije za Post hoc analizu	GG vs. GGng $p = 0,436$	
		SIng 6,96 ± 1,39	5,86 ± 0,60	gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,651, p = 0,426$	$F_{(1,31)} = 13,939, p < 0,001 (0,000762)$		SIng vs. SIng $p = 0,006 \uparrow$	
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg 6,53 ± 1,52	6,79 ± 0,55	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 1,513, p = 0,229$	$F_{(1,31)} = 2,593, p = 0,117$		SIng vs. GGng $p = 0,832$	
		SIg 6,01 ± 1,40	7,33 ± 1,31	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 5,046, p = 0,032$	$F_{(1,31)} = 3,334, p = 0,077$	GG vs. GGng $p < 0,001 \uparrow (0,000169)$	SIg vs. SIng $p < 0,001 \uparrow (0,000450)$	
GSH-Px (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng 21,36 ± 1,51	30,65 ± 2,35	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 125,492, p < 0,001$	$F_{(1,31)} = 84,632, p < 0,001$	GG vs. GGng $p = 0,150$	SIg vs. SIng $p = 0,783$	
		SIng 24,35 ± 2,16	31,33 ± 2,80	gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,803, p = 0,378$	$F_{(1,31)} = 5,265, p = 0,029$		SIg vs. GGng $p = 0,988$	
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg 32,87 ± 4,07	47,31 ± 5,37	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,971, p = 0,332$	$F_{(1,31)} = 0,318, p = 0,577$	bez indikacije za Post hoc analizu	SIg vs. GGg $p = 0,029 \uparrow$	
		SIg 34,15 ± 2,23	41,34 ± 5,47	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,266, p = 0,610$	$F_{(1,31)} = 3,686, p = 0,064$		Post hoc analizu	
GR (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng 14,19 ± 2,02	15,45 ± 1,95	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 1,052, p = 0,313$	$F_{(1,31)} = 0,138, p = 0,712$	bez indikacije za Post hoc analizu		
		SIng 15,81 ± 1,99	15,25 ± 1,61	gladovanje	$F_{(1,29)} = 2,424, p = 0,130$	$F_{(1,31)} = 0,006, p = 0,940$		GG vs. GGng $p = 0,045 \uparrow$	
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg 15,43 ± 3,05	13,88 ± 4,92	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 3,114, p = 0,088$	$F_{(1,31)} = 2,264, p = 0,143$	bez indikacije za Post hoc analizu	SIg vs. SIng $p = 0,941$	
		SIg 15,40 ± 1,85	12,92 ± 2,15	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,246, p = 0,624$	$F_{(1,31)} = 5,499, p = 0,026$		SIg vs. GGng $p = 0,429$	
ukupna SOD (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng 17,53 ± 4,31	21,35 ± 2,85	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 3,397, p = 0,076$	$F_{(1,31)} = 0,054, p = 0,818$	GG vs. GGng $p = 0,038 \uparrow$		
		SIng 19,03 ± 2,17	24,00 ± 1,65	gladovanje	$F_{(1,29)} = 2,020, p = 0,166$	$F_{(1,31)} = 2,417, p = 0,130$		SIg vs. SIng $p = 0,942$	
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg 19,33 ± 4,30	25,85 ± 3,39	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,340, p = 0,565$	$F_{(1,31)} = 5,698, p = 0,023$	bez indikacije za Post hoc analizu	SIg vs. GGng $p = 0,474$	
		SIg 22,24 ± 4,91	23,02 ± 4,93	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 3,979, p = 0,055$	$F_{(1,31)} = 2,275, p = 0,142$	GG vs. GGng $p = 0,005 \uparrow$	SIg vs. SIng $p = 0,039 \uparrow$	
CuZnSOD (SOD1) (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng 15,92 ± 4,09	19,46 ± 2,90	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 21,759, p < 0,001 (0,000064)$	$F_{(1,31)} = 0,345, p = 0,561$	bez indikacije za Post hoc analizu		
		SIng 17,61 ± 2,03	22,01 ± 1,77	gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,347, p = 0,561$	$F_{(1,31)} = 0,321, p = 0,575$		SIg vs. GGng $p = 0,762$	
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg 17,05 ± 4,10	24,11 ± 3,54	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,340, p = 0,565$			SIg vs. GGg $p = 0,293$	
		SIg 20,29 ± 4,58	21,02 ± 4,83	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 1,88 ± 0,25$				
MnSOD (SOD2) (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng 1,60 ± 0,25	1,88 ± 0,40	društveno okruženje					
		SIng 1,42 ± 0,21	2,00 ± 0,33	gladovanje					
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg 2,28 ± 0,47	1,74 ± 0,35	okruženje x gladovanje					
		SIg 1,95 ± 0,46	2,00 ± 0,37						

CuZnSOD (SOD1): Faktori *društveno okruženje* i *gladovanje*, kao i njihova interakcija nisu značajno uticali na aktivnost SOD1 u testisima peripubertetskih mužjaka pacova u ranom adolescentnom dobu. Interakcija faktora *okruženje x gladovanje* se pokazala kao značajna za regulaciju aktivnosti SOD1 u testisima GG srednje adolescentnih peripubertetskih pacova ($F_{(1,31)}=5,698, p<0,023$), a *post hoc* analiza je ukazala na povećanu aktivnost ovog enzima u testisima srednje adolescentnih grupno gajenih životinja koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim životinjama koje nisu gladovale (GGg vs. GGng, $p=0,038$).

MnSOD (SOD2): Faktor *gladovanje* se pokazao kao značajan za aktivnost SOD2 u testisima peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u uslovima socijalne izolacije ili u grupama od po tri tokom perioda rane adolescencije ($F_{(1,31)}=21,759, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanu aktivnost ovog enzima u testisima rano adolescentnih životinja koje su gladovale u oba režima socijalnog okruženja (GGg vs. GGng, $p=0,005$; SIg vs. SIng, $p=0,039$). Faktori *društveno okruženje* i *gladovanje*, kao i njihova interakcija se nisu pokazali kao značajni u regulaciji aktivnosti SOD2 u testisima srednje adolescentnih mužjaka pacova gajenih u uslovima socijalne izolacije ili u grupama od po tri dve nedelje, tokom faze rane i srednje adolescencije.

4.10.1.4. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u srcu

Detaljni prikaz parametara aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u srcu peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji i izlaganih stresu prekonocnog gladovanja, primenjeni statistički testovi i dobijene statističke vrednosti sumirani su u Tabeli 7.

KAT: Faktor *gladovanje* je pokazao značajan uticaj na aktivnost KAT u srcu rano adolescentnih životinja koje su jednu nedelju gajene izolovane ili u grupama po tri ($F_{(1,29)}=48,220, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanu aktivnost KAT u srcu životinja koje su gladovale u okviru oba režima socijalnog okruženja (GGg vs. GGng, $p<0,001$; SIg vs. SIng, $p=0,005$). Faktor *gladovanje* je pokazao značajan uticaj na aktivnost KAT i u srcu srednje adolescentnih životinja koje su dve nedelje gajene izolovane ili u grupama po tri ($F_{(1,31)}=16,083, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na statistički značajno povećanje aktivnosti KAT nakon prekonocnog gladovanja kod grupno gajenih životinja (GGg vs. GGng, $p=0,034$) i na graničnu statističku značajnost u povećanju aktivnosti KAT kod socijalno izolovanih životinja koje su gladovale (SIg vs. SIng, $p=0,051$). Kod obe starosne grupe životinja (rano adolescentne i srednje adolescentne) faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *društveno okruženje x gladovanje* se nisu pokazali kao značajni u regulaciji aktivnosti KAT u srcu.

GSH-Px: Faktor *gladovanje* je pokazao značajan uticaj na aktivnost GSH-Px u srcu rano adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova ($F_{(1,29)}=25,027, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanje aktivnosti ovog enzima kod životinja koje su gladovale, u okviru oba režima socijalnog okruženja (GGg vs. GGng, $p=0,003$; SIg vs. SIng, $p=0,021$). Faktor *gladovanje* je značajno uticao na aktivnost GSH-Px i u srcu srednje adolescentnih životinja koje su dve nedelje gajene u izolaciji ili u grupama po tri ($F_{(1,31)}=6,405, p=0,017$). *Post hoc* analiza je ukazala na povećanu aktivnost GSH-Px kod srednje adolescentnih grupno gajenih životinja koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim vršnjacima koji su siti, odnosno normalno hranjeni (GGg vs. GGng, $p=0,017$). Kod obe starosne grupe životinja (rano adolescentne i srednje adolescentne) faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *društveno okruženje x gladovanje* se nisu pokazali kao značajni u regulaciji aktivnosti GSH-Px u srcu.

GR: Faktor *gladovanje* je pokazao značajan uticaj na aktivnost GR u srcu rano adolescentnih mužjaka pacova nakon jedne nedelje gajenja u izolaciji ili grupi od po tri jединke ($F_{(1,29)}=13,497, p<0,001$). *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanu aktivnost ovog enzima kod rano adolescentnih grupno gajenih životinja koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim životinjama iste starosti koje nisu gladovale (GGg vs. GGng, $p=0,014$). Faktor *okruženje* i interakcija faktora *društveno okruženje x gladovanje* se nisu pokazali kao značajni u regulaciji aktivnosti GR u srcu rano adolescentnih životinja. Kod srednje adolescentnih životinja, koje su dve nedelje gajene u uslovima

izolacije ili u grupi od po tri jedinke po kavezu, faktori *gladovanje* i *društveno okruženje*, kao i njihova interakcija se nisu pokazali kao statistički značajni u regulaciji aktivnosti GR u srcu.

SOD (ukupna forma) i CuZnSOD (SOD1): Faktor *društveno okruženje* i *gladovanje*, kao i njihova interakcija se nisu pokazali kao značajni u regulaciji aktivnosti ukupne forme SOD i SOD1 u srcu rano adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova. Faktor *društveno okruženje* se pokazao kao značajan za regulaciju aktivnosti ukupne forme SOD ($F_{(1,31)}=4,557$, $p=0,041$) i SOD1 ($F_{(1,31)}=5,542$, $p=0,025$) u srcu srednje adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova, iako *post hoc* analiza (Unequal N HSD) nije ukazala na značajne razlike između grupa.

MnSOD (SOD2): Faktor *društveno okruženje* i *gladovanje*, kao i njihova interakcija se nisu pokazali kao značajni u regulaciji aktivnosti SOD2 u srcu peripubertetskih mužjaka pacova obe starosne grupe ispitivanih životinja (rano adolescentne i srednje adolescentne) u okviru oba režima socijalnog okruženja.

4.10.1.5. Aktivnost enzima antioksidativnog sistema u eritrocitima

Detaljni prikaz parametara aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u eritrocitima peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji i izlaganih stresu prekonocnog gladovanja, primenjeni statistički testovi i dobijene statističke vrednosti sumirani su u Tabeli 8.

KAT: Faktor *gladovanje* se pokazao kao značajan za aktivnost KAT u eritrocitima rano adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova ($F_{(1,29)}=74,458$, $p<0,001$), dok faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *okruženje x gladovanje* nisu pokazali statistički značajan uticaj. *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanu aktivnost KAT u eritrocitima rano adolescentnih jedinki koje su gladovale u okviru istog režima socijalnog okruženja (GGg vs. GGng, $p<0,001$; SIg vs. SIng, $p<0,001$). Faktor *gladovanje* ($F_{(1,31)}=15,376$, $p<0,001$) i interakcija faktora *okruženje x gladovanje* ($F_{(1,31)}=5,976$, $p=0,020$) su se pokazali kao značajni za aktivnost KAT u eritrocitima srednje adolescentnih životinja. *Post hoc* analiza je ukazala na značajno povećanje aktivnosti KAT u eritrocitima grupno gajenih jedinki koje su gladovale u poređenju sa grupno gajenim vršnjacima koji nisu gladovali (GGg vs. GGng, $p<0,001$). Faktor *društveno okruženje* nije pokazao statistički značajan uticaj na aktivnost KAT u srednje adolescentnoj grupi životinja

GSH-Px: Faktor *gladovanje* se pokazao kao značajan za aktivnost GSH-Px u eritrocitima rano adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova ($F_{(1,29)}=63,825$, $p<0,001$), dok faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *okruženje x gladovanje* nisu pokazali statistički značajan uticaj. *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanu aktivnost ovog enzima u eritrocitima rano adolescentnih životinja koje su gladovale u okviru oba režima gajenja (GGg vs. GGng, $p<0,001$; SIg vs. SIng, $p<0,001$). Faktori *društveno okruženje* ($F_{(1,31)}=5,855$, $p=0,022$) i *gladovanje* ($F_{(1,31)}=114,047$, $p<0,001$), kao i njihova interakcija ($F_{(1,31)}=6,355$, $p=0,017$) su se pokazali kao značajni za aktivnost GSH-Px u eritrocitima srednje-adolescentnih mužjaka pacova, a *post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala na povećanu aktivnost ovog enzima u eritrocitima životinja koje su gladovale kako u okviru režima gajenja u grupi (GGg vs. GGng, $p<0,001$), tako i u uslovima socijalne izolacije (SIg vs. SIng, $p<0,001$). Takođe, značajno povećanje aktivnosti GSH-Px je detektovano u eritrocitima srednje adolescentnih socijalno izolovanih jedinki koje nisu gladovale u poređenju sa grupno gajenim sitim, odnosno normalno hranjenim životinjama (SIng vs. GGng, $p=0,011$).

GR: Dvofaktorska ANOVA je ukazala da *gladovanje* značajno utiče na aktivnost ovog enzima u eritrocitima rano adolescentnih ($F_{(1,29)}=6,326$, $p=0,018$) i srednje adolescentnih ($F_{(1,31)}=7,143$, $p=0,012$) mužjaka pacova, dok *post hoc* analiza nije ukazala na značajne razlike između eksperimentalnih grupa. Faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija faktora *okruženje x gladovanje* nisu pokazali značajan uticaj na aktivnost GR u eritrocitima peripubertetskih mužjaka pacova ni u jednoj starosnoj grupi.

Tabela 7. Detaljan prikaz parametara, primenjenih statističkih testova i dobijenih statističkih vrednosti za tkivo srca peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43 rana i srednja adolescencija). (GG – grupno gajene u kavezima po tri; SI – socijalno izolovane životinje) i izlaganja dodatnom stresoru prekonocnog gladovanja (GGng – grupno gajene životinje koje nisu gladovale, SIng – socijalno izolovane životinje koje nisu gladovale, GGg – grupno gajene životinje koje su gladovale, GGng – grupno gajene životinje koje su gladovale, SIng – socijalno izolovane životinje koje su gladovale).

SRCE	definisani uslovi gajenja (društveno okruženje)				Dvofaktorska ANOVA				Post hoc analiza Unequal N HSD test		
	jedna nedelja	dve nedelje	društveno okruženje	jedna nedelja	jedna nedelja	dve nedelje	jedna nedelja	dve nedelje	jedna nedelja	dve nedelje	
KAT (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	14,61 ± 3,78	19,34 ± 5,95	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,025, p = 0,875$	$F_{(1,31)} = 1,585, p = 0,217$	GGg vs. GGng	$p < 0,001$ ↑	GGg vs. GGng	$p = 0,034$ ↑
		SIng	16,73 ± 3,22	17,48 ± 4,21	gladovanje	$F_{(1,29)} = 48,220, p < 0,0001 (0,000000)$	$F_{(1,31)} = 16,083, p < 0,0001 (0,000355)$	SIng vs. SIng	$p = 0,005$ ↑	SIng vs. SIng	$p = 0,051$ ↑
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	26,83 ± 4,78	25,31 ± 3,10	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 2,714, p = 0,110$	$F_{(1,31)} = 0,001, p = 0,995$	SIng vs. GGng	$p = 0,729$	SIng vs. GGng	$p = 0,831$
		SIng	24,26 ± 4,26	23,43 ± 3,75				SIng vs. GGg	$p = 0,596$	SIng vs. GGg	$p = 0,800$
GSH-Px (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	95,93 ± 16,31	127,51 ± 24,79	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,139, p = 0,712$	$F_{(1,31)} = 0,189, p = 0,667$	GGg vs. GGng	$p = 0,003$ ↑	GGg vs. GGng	$p = 0,017$ ↑
		SIng	100,92 ± 19,63	141,75 ± 20,04	gladovanje	$F_{(1,29)} = 23,027, p < 0,0001 (0,000025)$	$F_{(1,31)} = 6,405, p = 0,017$	SIng vs. SIng	$p = 0,021$ ↑	SIng vs. SIng	$p = 0,970$
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	126,26 ± 11,63	154,68 ± 10,89	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,290, p = 0,595$	$F_{(1,31)} = 3,519, p = 0,070$	SIng vs. GGng	$p = 0,920$	SIng vs. GGng	$p = 0,413$
		SIng	125,35 ± 14,68	145,79 ± 14,17				SIng vs. GGg	$p = 0,999$	SIng vs. GGg	$p = 0,730$
GR (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	8,98 ± 1,54	9,79 ± 1,61	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,308, p = 0,583$	$F_{(1,31)} = 0,715, p = 0,404$	GGg vs. GGng	$p = 0,014$ ↑	GGg vs. GGng	bez indikacije za
		SIng	9,85 ± 1,09	10,00 ± 2,10	gladovanje	$F_{(1,29)} = 13,497, p < 0,0001$	$F_{(1,31)} = 2,893, p = 0,099$	SIng vs. SIng	$p = 0,274$	SIng vs. SIng	Post hoc analizu
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	11,57 ± 1,76	11,46 ± 1,96	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 1,057, p = 0,312$	$F_{(1,31)} = 1,436, p = 0,240$	SIng vs. GGng	$p = 0,690$	SIng vs. GGng	bez indikacije za
		SIng	11,31 ± 1,80	10,28 ± 0,93				SIng vs. GGg	$p = 0,987$	SIng vs. GGg	Post hoc analizu
ukupna SOD (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	8,41 ± 1,82	7,98 ± 1,42	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,058, p = 0,812$	$F_{(1,31)} = 4,557, p = 0,041$	GGg vs. GGng	bez indikacije za	GGg vs. GGng	bez značajnosti između grupa
		SIng	8,17 ± 1,53	9,95 ± 2,12	gladovanje	$F_{(1,29)} = 3,596, p = 0,068$	$F_{(1,31)} = 1,706, p = 0,201$	SIng vs. SIng	Post hoc analizu	SIng vs. SIng	Post hoc analizu
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	9,10 ± 1,00	9,49 ± 1,90	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,442, p = 0,511$	$F_{(1,31)} = 2,113, p = 0,156$	SIng vs. GGng	bez indikacije za	SIng vs. GGng	Post hoc analizu
		SIng	9,61 ± 2,02	9,87 ± 0,74				SIng vs. GGg	$p = 0,025$	SIng vs. GGg	Post hoc analizu
CuZnSOD (SOD1) (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	6,00 ± 1,74	6,02 ± 1,30	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,007, p = 0,932$	$F_{(1,31)} = 5,542, p = 0,025$	GGg vs. GGng	bez indikacije za	GGg vs. GGng	bez značajnosti između grupa
		SIng	5,54 ± 1,58	7,81 ± 1,77	gladovanje	$F_{(1,29)} = 3,747, p = 0,063$	$F_{(1,31)} = 1,468, p = 0,235$	SIng vs. SIng	Post hoc analizu	SIng vs. SIng	Post hoc analizu
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	6,55 ± 0,96	7,24 ± 1,89	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,875, p = 0,357$	$F_{(1,31)} = 1,439, p = 0,239$	SIng vs. GGng	bez indikacije za	SIng vs. GGng	Post hoc analizu
		SIng	7,10 ± 1,86	7,82 ± 0,79				SIng vs. GGg	$p = 0,421$	SIng vs. GGg	Post hoc analizu
MnSOD (SOD2) (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	2,40 ± 0,28	1,96 ± 0,32	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,450, p = 0,507$	$F_{(1,31)} = 0,024, p = 0,878$	GGg vs. GGng	bez indikacije za	GGg vs. GGng	bez indikacije za
		SIng	2,62 ± 0,34	2,13 ± 0,45	gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,024, p = 0,878$	$F_{(1,31)} = 0,665, p = 0,421$	SIng vs. SIng	Post hoc analizu	SIng vs. SIng	Post hoc analizu
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	2,55 ± 0,37	2,26 ± 0,38	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,988, p = 0,328$	$F_{(1,31)} = 2,254, p = 0,143$	SIng vs. GGng	bez indikacije za	SIng vs. GGng	Post hoc analizu
		SIng	2,51 ± 0,50	2,05 ± 0,35				SIng vs. GGg	$p = 0,143$	SIng vs. GGg	Post hoc analizu

CuZnSOD (SOD1): Oba faktora analize, kao i njihova interakcija nisu značajno uticali na aktivnost SOD u eritrocitima rano adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova. Samo je faktor *društveno okruženje* imao značajan uticaj na aktivnost SOD u eritrocitima srednje adolescentnih pacova ($F_{(1,31)}=22,878, p<0,001$), dok faktor *gladovanje*, kao i interakcija faktora *društveno okruženje x gladovanje* nisu pokazali statističku značajnost. *Post hoc* analiza (Unequal N HSD) je ukazala da je aktivnost SOD znatno veća u eritrocitima srednje adolescentnih pacova gajenih u izolaciji u odnosu na životinje gajene u grupi, bez obzira da li je gladovanje bilo sprovedeno (SI_{ng} vs. GG_{ng} $p=0,005$; SI_g vs. GG_g $p=0,026$). Faktor *gladovanje* kao i interakcija faktora *okruženje x gladovanje* nisu imali značajnog uticaja na aktivnost SOD u eritrocitima srednje adolescentnih mužjaka pacova.

Tabela 8. Detaljan prikaz parametara, primenjenih statističkih testova i dobijenih statističkih vrednosti u eritrocitima peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokoma jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43 rana i srednja adolescencija) (GG – grupno gajene/kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje) i izlaganja dodatnom stresoru prekonocnog gladovanja (GGng – grupno gajene životinje koje nisu gladovale, SIng – socijalno izolovane životinje koje nisu gladovale, GGg – grupno gajene životinje koje su gladovale, Slg – socijalno izolovane životinje koje su gladovale).

KRV/ ERITOCITI		definisani uslovi gajenja (društveno okruženje)				Dvofaktorska ANOVA				Post hoc analiza Unequal N HSD test	
		jedna nedelja	dve nedelje	jedna nedelja	dve nedelje	jedna nedelja	dve nedelje	jedna nedelja	dve nedelje	jedna nedelja	dve nedelje
KAT (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	37820,80 ± 8045,58	37246,75 ± 8858,95	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,358, p = 0,555$	$F_{(1,31)} = 0,556, p = 0,461$	GGg vs. GGng	$p < 0,001$ ↑	GGg vs. GGng	$p < 0,001$ ↑
		SIng	35309,27 ± 10598,97	55600,44 ± 14844,93	gladovanje	$F_{(1,29)} = 74,458, p < 0,001$ (0,000000)	$F_{(1,31)} = 15,376, p < 0,001$ (0,000454)	Slg vs. SIng	$p < 0,001$ ↑	Slg vs. SIng	$p = 0,751$
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	68093,99 ± 16504,02	73868,12 ± 11586,70	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 1,473, p = 0,235$	$F_{(1,31)} = 5,976, p = 0,020$	Slg vs. GGng	$p = 0,973$	Slg vs. GGng	$p = 0,153$
		Slg	75493,18 ± 8935,39	64094,88 ± 26713,50				Slg vs. GGg	$p = 0,593$	Slg vs. GGg	$p = 0,619$
GSH-Px (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	40,98 ± 10,32	40,57 ± 5,41	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,738, p = 0,397$	$F_{(1,31)} = 5,855, p = 0,022$	GGg vs. GGng	$p < 0,001$ ↑ (0,000516)	GGg vs. GGng	$p < 0,001$ ↑ (0,000169)
		SIng	34,07 ± 11,07	51,95 ± 8,82	gladovanje	$F_{(1,29)} = 63,825, p < 0,001$	$F_{(1,31)} = 114,047, p < 0,001$	Slg vs. SIng	$p < 0,001$ ↑ (0,000163)	Slg vs. SIng	$p < 0,001$ ↑ (0,000189)
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	61,95 ± 6,53	70,97 ± 7,83	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 1,779, p = 0,193$	$F_{(1,31)} = 6,355, p = 0,017$	Slg vs. GGng	$p = 0,434$	Slg vs. GGng	$p = 0,011$ ↑
		Slg	63,44 ± 7,80	70,74 ± 4,55				Slg vs. GGg	$p = 0,987$	Slg vs. GGg	$p = 0,999$
GR (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	198,07 ± 71,96	197,28 ± 42,79	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 0,030, p = 0,864$	$F_{(1,31)} = 3,504, p = 0,071$				
		SIng	210,30 ± 137,84	336,83 ± 150,01	gladovanje	$F_{(1,29)} = 6,326, p = 0,018$	$F_{(1,31)} = 7,143, p = 0,012$			bez značajnosti između grupa	
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	356,40 ± 212,14	399,33 ± 250,57	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,158, p = 0,694$	$F_{(1,31)} = 0,007, p = 0,934$			bez značajnosti između grupa	
		Slg	325,38 ± 158,45	551,90 ± 348,73							
SODI (U/mg proteina)	životinje koje nisu gladovale	GGng	1877,20 ± 604,58	1296,24 ± 233,76	društveno okruženje	$F_{(1,29)} = 2,900, p = 0,095$	$F_{(1,31)} = 22,878, p < 0,001$ (0,00004)			GGg vs. GGng	$p = 0,568$
		SIng	1778,61 ± 758,94	2527,31 ± 1042,88	gladovanje	$F_{(1,29)} = 0,455, p = 0,515$	$F_{(1,31)} = 1,480, p = 0,233$			Slg vs. SIng	$p = 0,975$
	nakon prekonocnog gladovanja	GGg	2345,69 ± 842,67	1711,24 ± 352,86	okruženje x gladovanje	$F_{(1,29)} = 1,726, p = 0,200$	$F_{(1,31)} = 0,357, p = 0,555$			Slg vs. GGng	$p = 0,005$ ↑
		Slg	1623,40 ± 204,76	2668,92 ± 799,72						Slg vs. GGg	$p = 0,026$ ↑

4.10.2. Biohemijski parametri iz krvi i promene u telesnoj masi

Uticaj faktora *društvenog okruženja* i *stresa prekonocnog gladovanja* na parametre krvi, kao i promene u telesnoj masi peripubertetskih mužjaka pacova ranog i srednjeg adolescentnog doba su analizirane korišćenjem dvofaktorske ANOVA i *post hoc* Tukey testom, gde je bilo indikovano. Detaljni prikaz statističkih parametara i dobijenih *p* vrednosti je dat u Tabeli 9.

Kortikosteron: Dvofaktorskom ANOVA analizom je utvrđeno da faktori *gladovanje* ($F_{(1,24)}=22,416$; $p<0,001$) i *društveno okruženje* ($F_{(1,24)}=4,732$; $p=0,040$), kao i interakcija ova dva faktora ($F_{(1,24)}=5,901$; $p=0,023$) značajno utiču na koncentraciju kortikosterona u plazmi rano adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova (Slika 4.17A), jer je *post hoc* analiza ukazala da je koncentracija kortikosterona veća u plazmi GGg u poređenju sa SIg ($p=0,017$), kao i GGng ($p<0,001$), ali da nema razlike između GGng i SIng životinja, kao i SIng i SIg.

Dvofaktorskom ANOVA analizom je utvrđeno da faktori *gladovanje* ($F_{(1,24)}=33,149$; $p<0,001$) i *društveno okruženje* ($F_{(1,24)}=4,620$; $p=0,042$) značajno utiču na nivo kortikosterona u plazmi srednje adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova, bez značajnog uticaja interakcije ova dva faktora (Slika 4.17A). *Post hoc* analiza je ukazala da se povećala samo koncentracija kortikosterona u plazmi GG koje su gladovale u odnosu na GGng ($p<0,001$), kao i SIg u odnosu na SIng ($p=0,007$).

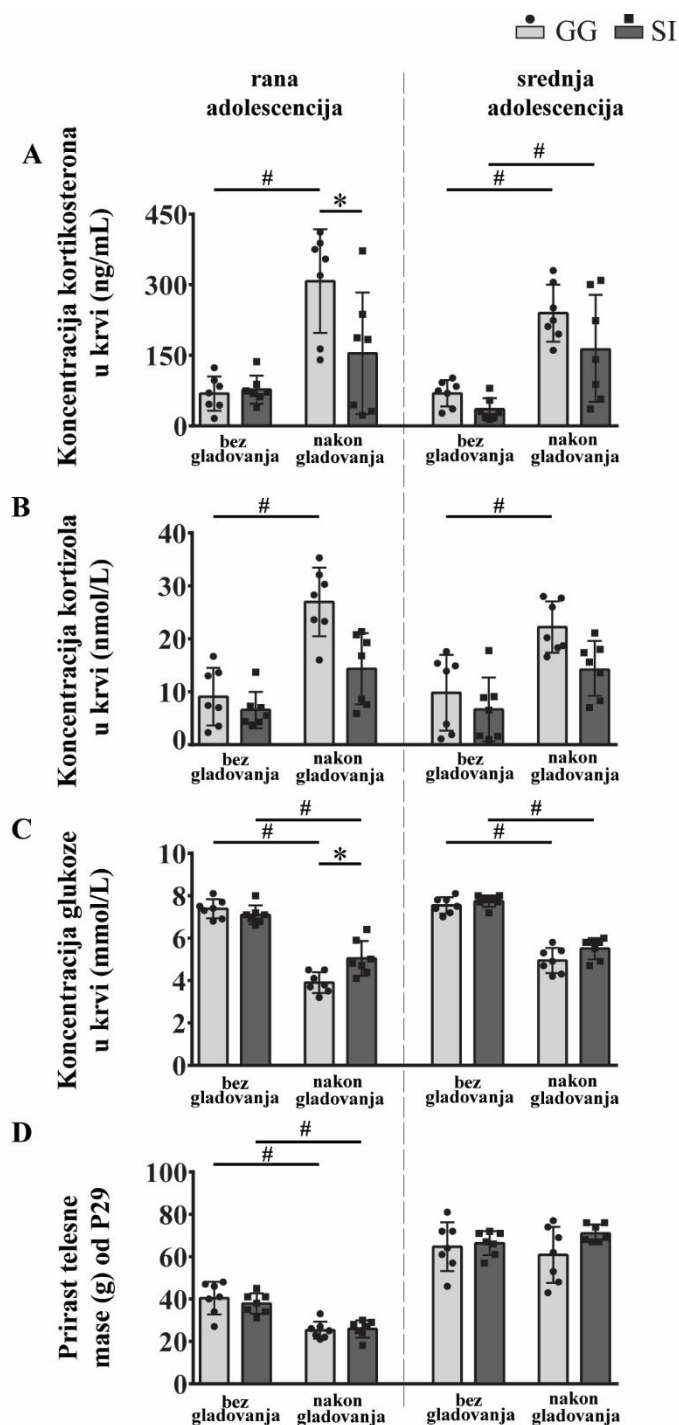
Kortizol: Dvofaktorskom ANOVA analizom je utvrđeno da faktori *gladovanje* ($F_{(1,24)}=25,828$; $p<0,001$) i *društveno okruženje* ($F_{(1,24)}=5,520$; $p=0,027$) značajno utiču na koncentraciju kortizola u plazmi peripubertetskih mužjaka pacova u periodu rane adolescencije, bez značajnog uticaja interakcije ova dva faktora (Slika 4.17B). *Post hoc* analiza je ukazala samo na povećanje koncentracije kortizola u plazmi GG životinja koje su gladovale u poređenju sa GGng ($p<0,001$). Isti trend je uočen i kod srednje adolescentnih mužjaka pacova, sa povećanjem koncentracije kortizola samo u plazmi GG životinja koje su gladovale u poređenju sa onima koje nisu ($p=0,003$).

Takođe, na koncentraciju kortizola u plazmi peripubertetskih mužjaka pacova u periodu srednje adolescencije značajno utiču faktori *gladovanje* ($F_{(1,24)}=20,656$; $p<0,001$) i *društveno okruženje* ($F_{(1,24)}=6,079$; $p=0,021$), bez značajnog uticaja interakcije ova dva faktora (Slika 4.17B).

Glukoza: Faktor *gladovanje* ($F_{(1,24)}=162,809$; $p<0,001$), kao i interakcija faktora *društveno okruženje* x *gladovanje* ($F_{(1,2)}=10,815$; $p=0,003$), pokazali su značajan uticaj na glikemiju peripubertetskih mužjaka u periodu rane adolescencije (Slika 4.17C). *Post hoc* analiza je ukazala da nema razlike u glikemiji između životinja koje nisu gladovale (GGng i SIng), ali da je očekivano niža nakon prekonocnog gladovanja GG i SI jedinki (GGg vs. GGng, $p<0,001$; SIg vs. SIng, $p<0,001$), sa značajno većim smanjenjem kod GGg u poređenju sa SIg ($p=0,006$).

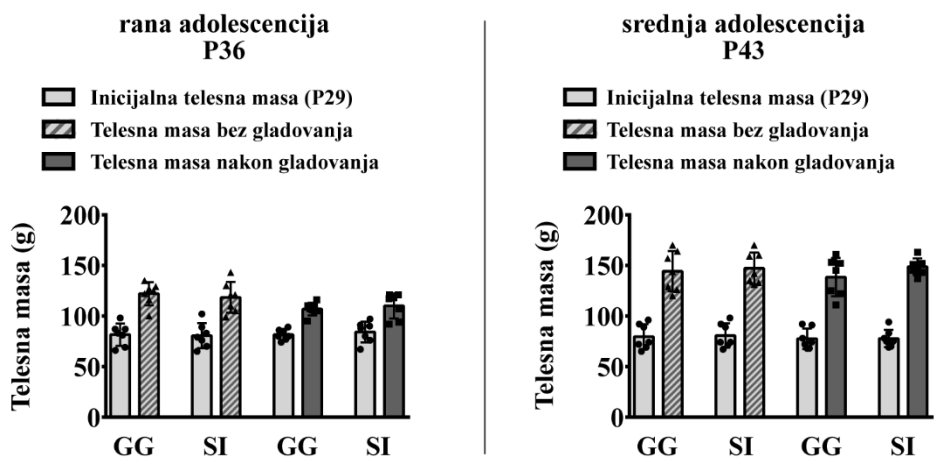
Faktor *društveno okruženje* ($F_{(1,24)}=4,882$; $p=0,037$), kao i faktor *gladovanje* ($F_{(1,24)}=199,747$; $p<0,001$) značajno su uticali na koncentraciju glukoze u plazmi srednje adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova (Slika 4.17C), bez značajnog uticaja interakcije ova dva faktora. *Post hoc* analiza je ukazala da nema razlike u glikemiji životinja koje nisu gladovale (GGng i SIng), ali da je ona smanjena kod životinja koje su gladovale bez obzira na socijalne uslove gajenja (GGg vs. GGng, $p<0,001$; SIg vs. SIng, $p<0,001$).

Prirast telesne mase: Dvofaktorska ANOVA analiza je pokazala da je faktor *gladovanje* značajno uticao na telesnu masu rano adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova (Slika 4.17D), ($F_{(1,24)}=44,789$; $p<0,001$), dok se faktor *društveno okruženje*, kao i interakcija ova dva faktora nisu pokazali kao značajni. *Post hoc* analiza je ukazala da je prekonocno gladovanje rezultovalo smanjenjem telesne mase kako grupno gajenih ($p<0,001$), tako i socijalno izolovanih jedinki ($p<0,002$). Nisu uočene razlike u prirastu telesne mase između grupa pacova koji nisu gladovali (GGng i SIng), kao i grupa pacova koji su gladovali (GGg i SIg).



Slika 4.17 Koncentracija kortikosterona (A), kortizola (B) i glukoze (C) u krvi, kao i prirast telesne mase (D) peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29–P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29–P43, rana i srednja adolescencija) i jednokratno izlaganijem prekonocnom gladovanju. Analize su radene na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba ($n=7$ životinja po grupi). Poređenja između grupa su radena pomoću Tukey testa u vidu *post hoc* analize za jednofaktorsku ANOVA, kao što je pokazano u vidu linija iznad grafičkih stubova * $p<0,05$ unutar istog režima ishrane, # $p<0,05$ unutar istog režima gajenja. GG – grupno gajene/kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje. Preuzeto i modifikovano od Potrebić i sar., 2021.

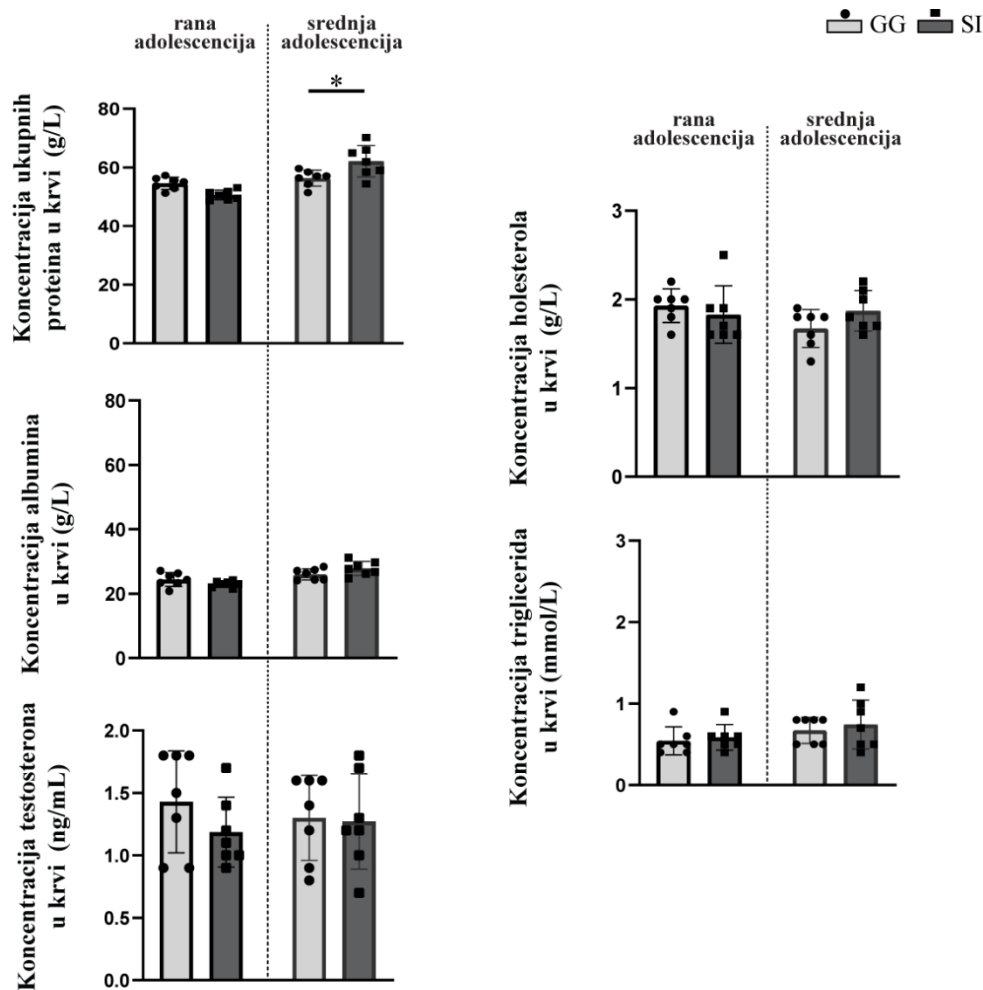
Oba analizirana faktora (*društveno okruženje i gladovanje*), kao i njihova interakcija, nisu imali uticaja na prirast telesne mase srednje adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova svih grupa (Slika 4.17D). Telesne mase životinja na osnovnu kojih je računat prirast date su na slici 4.18.



Slika 4.18 Promena telesne mase (g) peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolovanih tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43, rana i srednja adolescencija) i jednokratno izlaganih prekononoćnom gladovanju u odnosu na inicijalnu telesnu masu merenu P29. GG – grupno gajene/kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje.

4.11. Koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona u krvi peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji

Između grupno gajenih i socijalno izolovanih životinja nisu primećene statistički značajne razlike koncentracije albumina, testosterona, holesterola, kao i triglicerida u krvi (Slika 4.19). Jedini parametar koji je ukazao na postojanje razlika između dve grupe jeste koncentracija ukupnih proteina, koja je bila značajno viša kod socijalno izolovanih srednje adolescentnih peripubertetskih mužjaka pacova izolovanih tokom perioda rane i srednje adolescencije, u odnosu na grupno gajene kontrole (Slika 4.19, $*p=0,035$, *U*-test).



Slika 4.19 Koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona u krvi peripubertetskih pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43, rana i srednja adolescencija). Analize su rađene na rano adolescentnim (P36) i srednje adolescentnim životinjama (P43). Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. $*p < 0,05$, u odnosu na kontrolu, *U*-test. GG – grupno gajene/kontrolne životinje gajene po tri u kavezu; SI – socijalno izolovane životinje.

Tabela 9. Sumirani prikaz analiziranih parametara, testova korišćenih u statističkoj analizi, dobijenih *p* vrednosti i broja korišćenih životinja (*n*) za rezultate prikazane u okviru podnaslova 4.10.2 i 4.11. Analizirani su parametri peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji tokom jedne (P29-P36, rana adolescencija) i dve nedelje (P29-P43, rana i srednja adolescencija). GG - grupno gajene životinje po tri u kavezu, SI - socijalno izolovane životinje

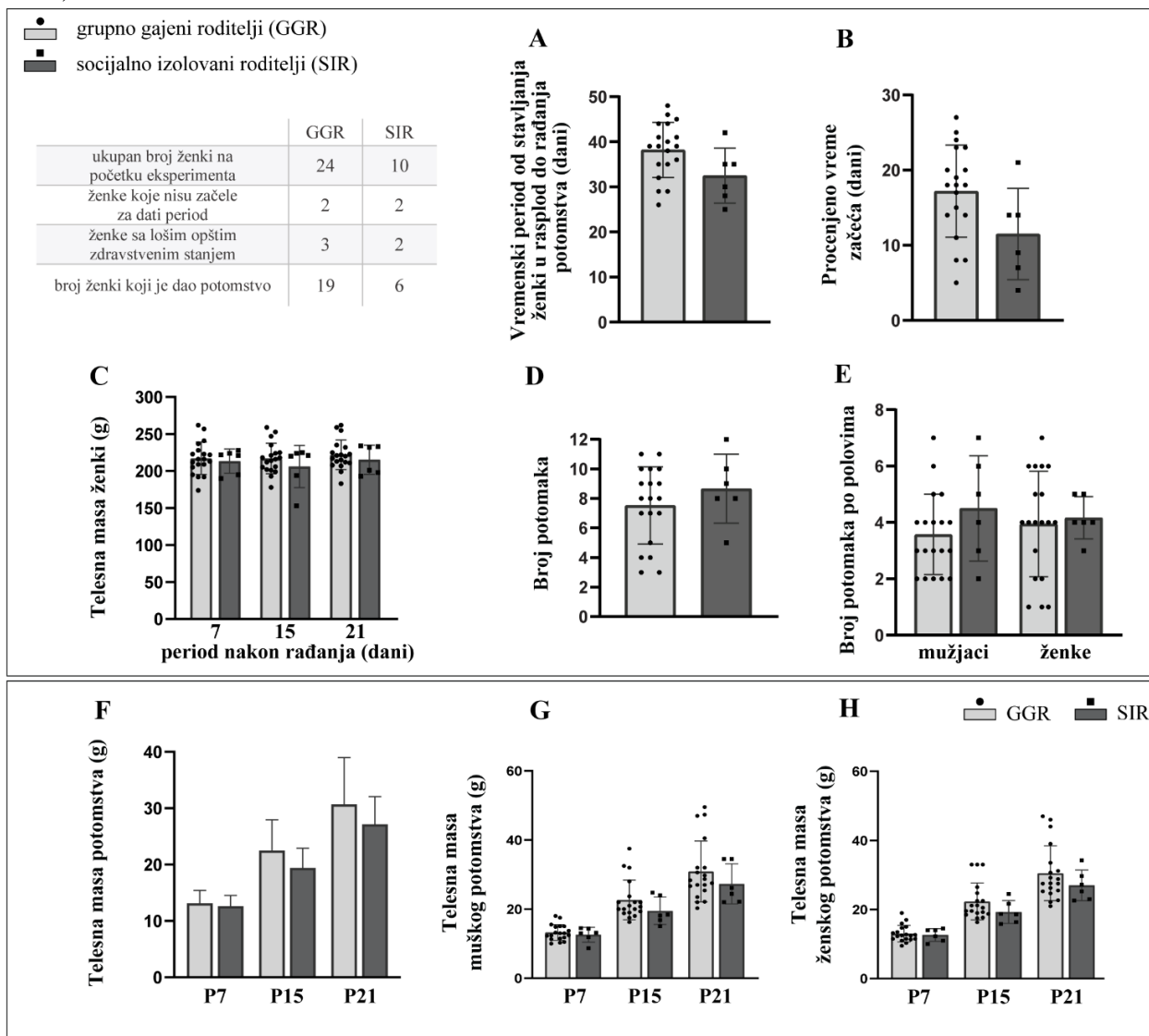
Slika 4.17	Koncentracija hormona stresa (kortikosteron, kortizol) i glukoze u krvi i promene u telesnoj masi peripubertetskih pacova u odgovoru na društveno okruženje i stres prekononočnog gladovanja				
<i>n</i> = 7 (životinja po grupi)	dvofaktorska ANOVA		Post hoc test		
Slika 4.17A Koncentracija kortikosterona u krvi	I nedelja (P29-P36) GG i SI		Tukey HSD	I nedelja	II nedelja
	društveno okruženje	$F_{(1,24)} = 4,732; p = 0,040$	GGng vs. SIng	$p = 0,998$	$p = 0,779$
	gladovanje	$F_{(1,24)} = 22,416; p < 0,001$	GGg vs. SIg	$p = 0,017$	$p = 0,185$
	okruženje x gladovanje	$F_{(1,24)} = 5,901; p = 0,023$	GGng vs. GGg	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	II nedelja (P29-P43) GG i SI		SIng vs. SIg	$p = 0,382$	$p = 0,007$
društveno okruženje	$F_{(1,24)} = 4,620; p = 0,042$				
gladovanje	$F_{(1,24)} = 33,149; p < 0,001$				
okruženje x gladovanje:	$F_{(1,24)} = 0,650; p = 0,428$				
Slika 4.17B Koncentracija kortizola u krvi	I nedelja (P29-P36) GG i SI		Tukey HSD	I nedelja	II nedelja
	društveno okruženje	$F_{(1,24)} = 5,520; p = 0,027$	GGng vs. SIng	$p = 0,867$	$p = 0,748$
	gladovanje	$F_{(1,24)} = 25,828; p < 0,001$	GGg vs. SIg	$p = 0,077$	$p = 0,089$
	okruženje x gladovanje	$F_{(1,24)} = 1,588; p = 0,220$	GGng vs. GGg	$p < 0,001$	$p = 0,003$
	II nedelja (P29-P43) GG i SI		SIng vs. SIg	$p = 0,056$	$p = 0,090$
društveno okruženje	$F_{(1,24)} = 6,079; p = 0,021$				
gladovanje	$F_{(1,24)} = 20,656; p < 0,001$				
okruženje x gladovanje	$F_{(1,24)} = 1,088; p = 0,307$				
Slika 4.17C Koncentracija glukoze u krvi	I nedelja (P29-P36) GG i SI		Tukey HSD	I nedelja	II nedelja
	društveno okruženje	$F_{(1,24)} = 3,893; p = 0,060$	GGng vs. SIng	$p = 0,789$	$p = 0,842$
	gladovanje	$F_{(1,24)} = 162,809; p < 0,001$	GGg vs. SIg	$p = 0,006$	$p = 0,126$
	okruženje x gladovanje	$F_{(1,24)} = 10,815; p = 0,003$	GGng vs. GGg	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	II nedelje (P29-P43) GG i SI		SIng vs. SIg	$p < 0,001$	$p < 0,001$
društveno okruženje	$F_{(1,24)} = 4,882; p = 0,037$				
gladovanje	$F_{(1,24)} = 199,747; p < 0,001$				
okruženje x gladovanje	$F_{(1,24)} = 1,088; p = 0,308$				
Slika 4.17D Promene u telesnoj masi	I nedelja (P29-P36) GG i SI		Tukey HSD	I nedelja	II nedelja
	društveno okruženje	$F_{(1,24)} = 0,243; p = 0,626$	GGng vs. SIng	$p = 0,807$	bez značajnosti između grupa
	gladovanje	$F_{(1,24)} = 44,789; p < 0,001$	GGg vs. SIg	$p = 0,997$	bez značajnosti između grupa
	okruženje x gladovanje	$F_{(1,24)} = 0,600; p = 0,446$	GGng vs. GGg	$p < 0,001$	bez značajnosti između grupa
	II nedelje (P29-P43) GG i SI		SIng vs. SIg	$p = 0,002$	bez značajnosti između grupa
društveno okruženje	$F_{(1,24)} = 2,762; p = 0,109$				
gladovanje	$F_{(1,24)} = 0,010; p = 0,921$				
okruženje x gladovanje	$F_{(1,24)} = 1,396; p = 0,249$				
Slika 4.18	Promena telesne mase (g) peripubertetskih pacova GG i SI tokom ranog i srednjeg adolescentnog perioda				
<i>n</i> = 7 (životinja po grupi)		<i>t</i> - test zavisni uzorci			
		t	df	<i>p</i>	
GG	inicijalna TM vs. bez gladovanja	-13,931	6	$p < 0,001$	
SI	inicijalna TM vs. bez gladovanja	-20,672	6	$p < 0,001$	
GG	inicijalna TM vs. gladovanje	-16,602	6	$p < 0,001$	
SI	inicijalna TM vs. gladovanje	-16,854	6	$p < 0,001$	
Koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona u krvi peripubertetskih pacova u odgovoru na društveno okruženje					
Slika 4.19	GG vs. SI Mann Whitney U-test				
	U		Z		<i>p</i>
	I nedelja	II nedelja	I nedelja	II nedelja	I nedelja II nedelja

Koncentracija ukupnih proteina u krvi	4	7,5	2,619	-2,172	0,009	0,030
Koncentracija albumina u krvi	13	12	1,469	-1,597	0,142	0,110
Koncentracija holesterola u krvi	14,5	15	1,278	-1,214	0,201	0,225
Koncentracija triglicerida u krvi	18	22	-0,831	-0,319	0,406	0,749
	<i>dvofaktorska ANOVA</i>			<i>Post hoc test</i>		
Koncentracija testosterona u krvi	Faktor: <i>društveno okruženje</i> $F_{(1,24)} = 1,019; p = 0,323$ Faktor: <i>maturacija</i> $F_{(1,24)} = 0,025; p = 0,875$ Faktor: <i>okruženje x maturacija</i> $F_{(1,24)} = 0,635; p = 0,433$			bez značajnosti između grupa		

4.12. Karakteristike majki gajenih u grupi ili izolaciji tokom peripuberteta i njihovog potomstva

4.12.1. Reproduktivne karakteristike i telesna masa ženki

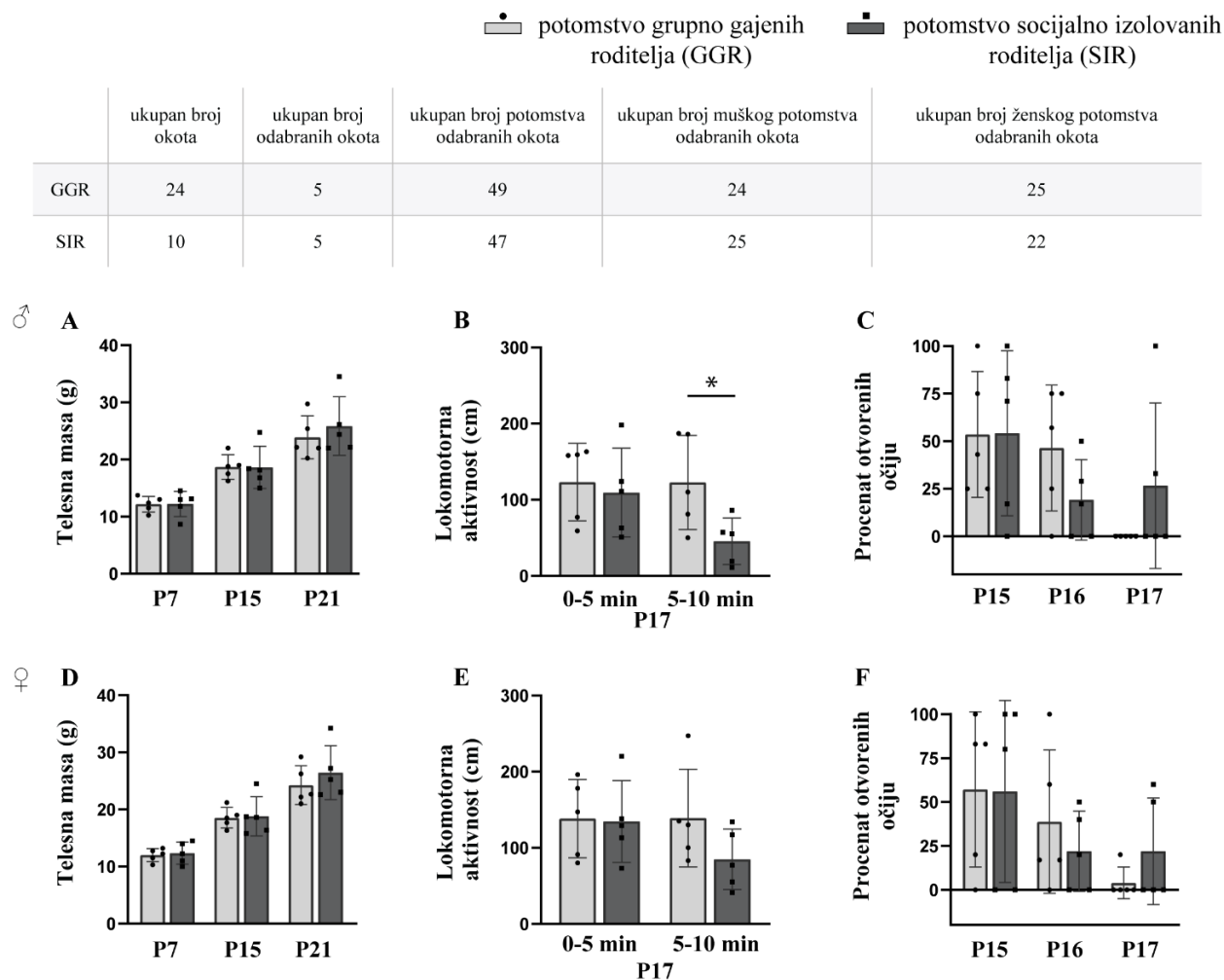
Na slici 4.20 prikazani su rezultati ispitivanja vremena začeća, telesne mase majki, broja i telesne mase muških i ženskih potomaka parova koji su tokom ranog ili ranog i srednjeg adolescentnog perioda gajeni grupno u kavezima po tri (GG) ili izolovano (SI). Kako se na slici može videti nisu uočene razlike u vremenskom periodu od stavljanja u rasplod sa mužjakom, gajenim u istim socijalnim uslovima kao i sama ženka, do rađanja (Slika 4.20A), procenjenom vremenu začeća (Slika 4.20B) i telesnoj masi majki 7., 15. i 21. dana nakon rađanja (Slika 4.20C). Osim toga, broj njihovih potomaka nije se razlikovao (Slika 4.20D), kao ni odnos polova unutar legla (Slika 4.20E, *U*-test).



Slika 4.20 Fizičke karakteristike ženki pre i nakon začeća, kao i njihovog potomstva. (A) Vreme od stavljanja u rasplod sa mužjakom do rađanja potomstva (u danima); n=19 ženki GG, n=6 ženki SI. (B) Procenjeno vreme začeća kod ženki (u danima) (C) Telesna masa ženki 7, 15 i 21 dan nakon rađanja. (D) Ukupan broj potomaka po okotu. (E) Broj potomaka po polovima (muško i žensko potomstvo GG roditelja, muško i žensko potomstvo SI roditelja). (F) Telesna masa potomstva izražena kao srednja vrednost po okotu, 7., 15. i 21. postnatalnog dana. (G) Telesna masa muškog potomstva 7., 15. i 21. postnatalnog dana (H) Telesna masa ženskog potomstva 7., 15. i 21. postnatalnog dana. Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. Statistička poređenja i tačne *p* vrednosti su date u Tabeli 10.

4.12.2. Telesna masa potomstva oba pola

S obzirom da je potomstvo odvajano od majke 21. postnatalnog dana i da za vreme postnatalnog razvoja fizički napredak potomstva zavisi i od ponašanja majke (u smislu brižnosti za potomstvo), telesna masa potomstva oba pola merena je 7., 15. i 21. dana postnatalnog razvoja, a rezultati prikazani u okviru slike 4.20F-H. Rezultati ne pokazuju razlike u telesnoj masi izraženoj kao srednja vrednost po okotu (Slika 4.25F) ili srednjoj vrednosti po okotu po polu (Slika 4.20G-H) potomstva čiji su roditelji imali različite socijalne uslove gajenja.



Slika 4.21 Razvojne osobine odabranog muškog i ženskog potomstva GG i SI roditelja. (A) Telesna masa odabranog muškog potomstva 7., 15. i 21. postnatalnog dana, izražena kao srednja vrednost po okotu. (B) Lokomotorna aktivnost odabranog muškog potomstva u Testu otvorenog polja u P17, izražena kao srednja vrednost po okotu. (C) Otvaranje očiju potomstva muškog pola u periodu P15-P17, izraženo u procentima po okotu. (D) Telesna masa odabranog ženskog potomstva 7., 15. i 21. postnatalnog dana, izražena kao srednja vrednost po okotu. (E) Lokomotorna aktivnost odabranog ženskog potomstva u Testu otvorenog polja u P17, izražena kao srednja vrednost po okotu. (F) Otvaranje očiju potomstva ženskog pola u periodu P15–P17, izraženo u procentima po okotu. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. $*p=0,037$ (muško potomstvo GGR u odnosu na muško potomstvo SIR 17. postnatalnog dana). Statistička poređenja i tačne p vrednosti su date u Tabeli 10.

4.12.3. Otvaranje očiju i rani motorni odgovor potomstva na nepoznatu arenu

Na slici 4.21 su date karakteristike pet odabranih okota GG i SI roditelja pri čemu su sličan ukupan broj potomaka i broj muškog potomstva po okotu (4-5) bili kriterijumi za odabir. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ispitivanih parametara po okotu i polu. Nisu detektovane razlike u telesnoj masi muškog (Slika 4.21A) i ženskog potomstva (Slika 4.21D) 7., 15. i 21. postnatalnog dana. Tokom testiranja potomstva u Testu otvorenog polja u P17 nisu primećene značajne razlike u prosečnoj lokomotornoj aktivnosti ženskog potomstva po okotu tokom 10 minuta testiranja (Slika 4.21E). Međutim, promene su primećene kod muškog potomstva i to tokom drugog dela testiranja ($p=0,037$, U -test), u vidu značajnog smanjenja prosečne lokomotorne aktivnosti po okotu socijalno izolovanih u odnosu na grupno gajene roditelje (Slika 4.21B). Procenat jedinki, po okotu, sa otvorenim očima u periodu P15-P17 nije se razlikovao između dve eksperimentalne grupe, tj. sve jedinke testirane u P17 su imale otvorena oba oka (Slika 4.21C-F).

4.12.4. Karakteristike muških potomaka SI i GG roditelja socijalno izolovanih tokom peripuberteta

Na slikama 4.22 i 4.23 prikazani su rezultati merenja ponašanja muškog potomstva grupno gajenih roditelja (GGR, oba roditelja) i socijalno izolovanih roditelja (SIR, oba roditelja) u testu otvorenog polja 29. postnatalnog dana (P29), radi procene generalne lokomotorne aktivnosti, kao i ispoljavanja ponašanja nalik anksioznom. Utvrđeno je da između grupa ne postoje statistički značajne razlike u telesnoj masi (Slika 4.22A), lokomotornoj aktivnosti (Slika 4.22B), broju vertikalnog uzdizanja (Slika 4.22C), broju ulaza u centralno polje (Slika 4.23A), kao ni vremenu provedenom u centralnom polju (Slika 4.23B) eksperimentalne arene. Time je utvrđeno da se potomstvo pre uvođenja u eksperiment ne razlikuje u parametrima od interesa, tj. da nije ispoljilo izmenjenu lokomotornu aktivnost, kao i ponašanje nalik anksioznom, te je dodatno podeljeno u sledeće grupe: potomstvo (Po) koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR) i koje će tokom peripuberteta (P29-P43) biti grupno gajeno (GGR-GG_{Po}), potomstvo koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR) i koje će tokom peripuberteta biti socijalno izolovano (GGR-SIPo), potomstvo koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR) i koje će tokom peripuberteta (P29-P43) biti grupno gajeno (SIR-GG_{Po}) i potomstvo koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR) i koje će tokom peripuberteta biti socijalno izolovano (SIR-SIPo). Nakon gajenja u definisanim socijalnim uslovima u periodu od 7 dana (tj. tokom perioda rane adolescencije) ili 14 dana (tj. tokom perioda rane i srednje adolescencije), jedinke su testirane u P36 i P43.

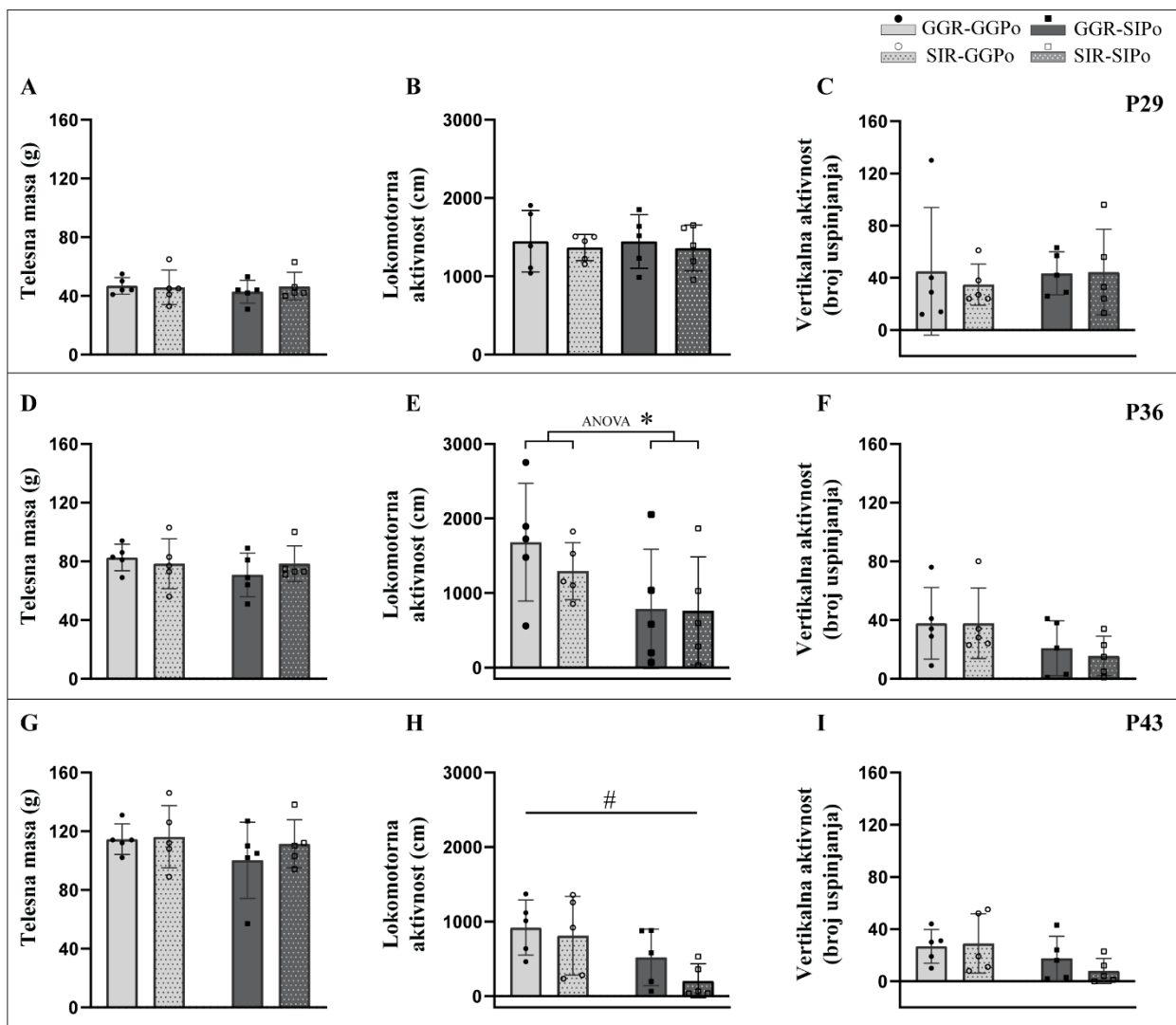
Ponašanje u P36. Dvofaktorskom analizom podataka (sa faktorima *društveno okruženje roditeljske generacije* i *društveno okruženje potomačke generacije*) utvrđeno je da ne postoje statistički značajne razlike u telesnoj masi svih grupa rano adolescentnih potomaka (Slika 4.22D) i broju vertikalnih uzdizanja unutar arene (Slika 4.22F). Međutim, faktor *društveno okruženje potomačke generacije* se izdvojio kao značajan u analizi lokomotorne aktivnosti (Slika 22E; $F_{(1,16)}=5,261$, $*p=0,036$) i broju ulaza u centralni deo otvorene arene (Slika 4.23C; ($F_{(1,16)}=5,996$, $*p=0,026$), jer su grupno gajeni potomci GGR-GG_{Po} i SIR-GG_{Po} bili aktivniji i više puta su ulazili u otvoreni centralni deo arene u odnosu na socijalno izolovane potomke u rano adolescentnom periodu (GGR-SIPo i SIR-SIPo). Razlike u vremenu provedenom u centralnom polju arene između eksperimentalnih grupa nisu utvrđene (Slika 4.23D).

Ponašanje u P43. Rezultati dobijeni merenjem telesne mase i ponašanja srednje adolescentnih potomaka u Testu otvorenog polja pokazali su da ne postoje statistički značajne razlike u telesnoj masi (Slika 4.22G) i broju vertikalnih uzdizanja unutar arene (Slika 4.22I). Međutim, faktor *društveno okruženje potomačke generacije* izdvojio se kao značajan ($F_{(1,16)}=8,269$, $p=0,011$), a *post hoc* analiza je pokazala da su socijalno izolovani potomci socijalno izolovanih roditelja (SIR-SIPo) bili značajno manje aktivni od potomaka kontrolne grupe GGR-GG_{Po} (Slika 4.22H; $#p=0,047$). Razlike u parametrima anksioznosti među potomcima svih grupa nisu ustanovljene (Slika 4.23E i F).

Nakon završenog Testa otvorenog polja praćena je preferenca za 1% rastvor saharoze u odnosu na vodu (prosek meren uokviru 2 uzastopna dana, P44 i P45), kao parametra anhedonije, jednog od simptoma ispoljavanja ponašanja nalik depresivnom. Dobijeni rezultati su pokazali da

faktor *društveno okruženje potomačke generacije* ima značajan uticaj na ispitivani parametar ($F_{(1,16)}=10,773$, $p=0,005$, dvofaktorska ANOVA) i da grupa srednje adolescentnih socijalno izolovanih potomaka socijalno izolovanih roditelja (SIR-SIPo) ima manji indeks preferencije saharoze u poređenju sa potomcima kontrolne grupe GGR-GGPo sa graničnom statističkom značajnošću (Slika 4.24C, $*p=0,054$, Tukey HSD test). Promene u količini pojedene hrane i ukupno popijene tečnosti nisu bile značajne između eksperimentalnih grupa životinja tokom merenja (Slika 4.24A i B).

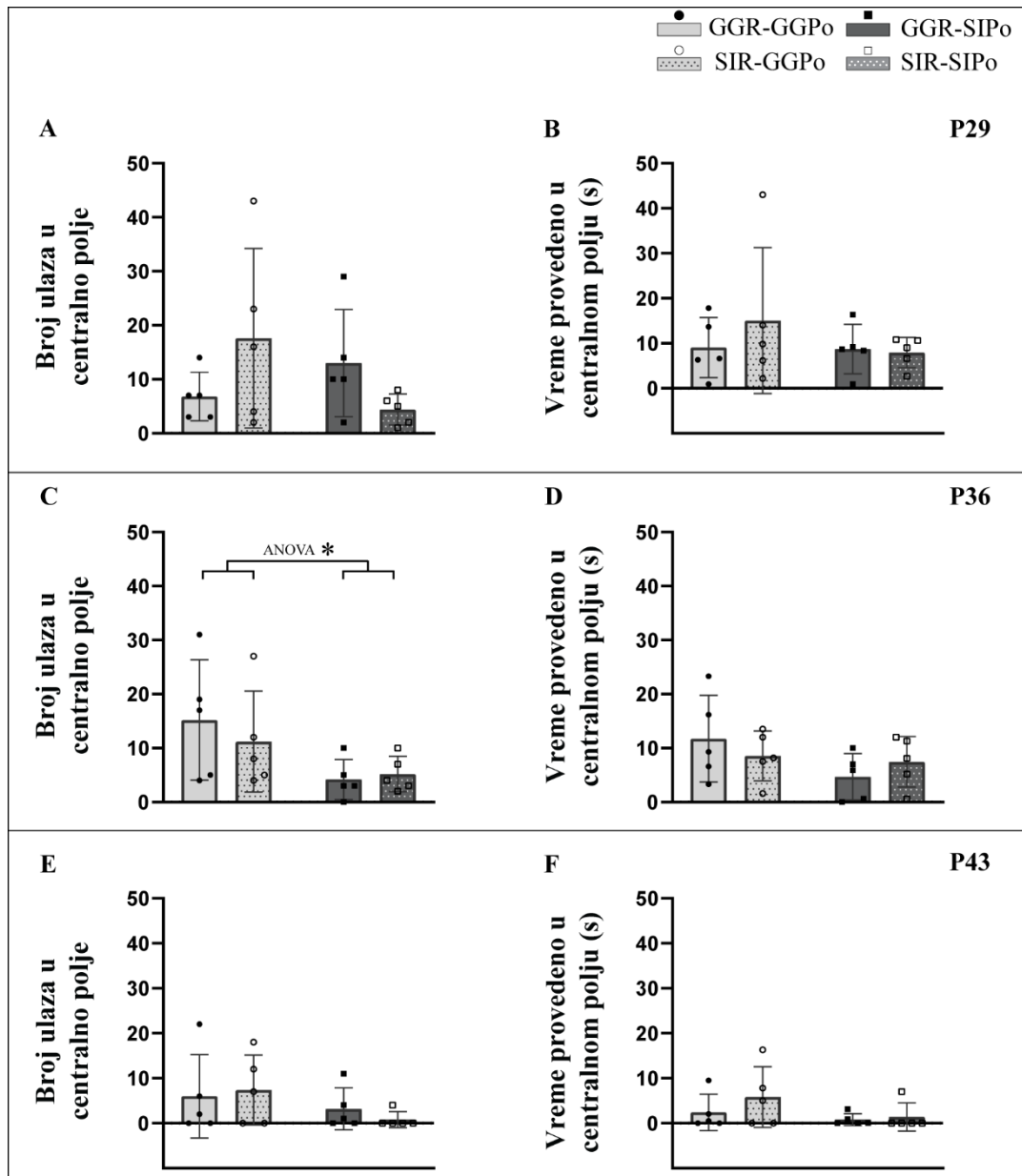
Detaljan prikaz testova korišćenih u statističkoj analizi podataka i dobijenih parametara, uključujući p vrednosti, su predstavljeni u Tabeli 10.



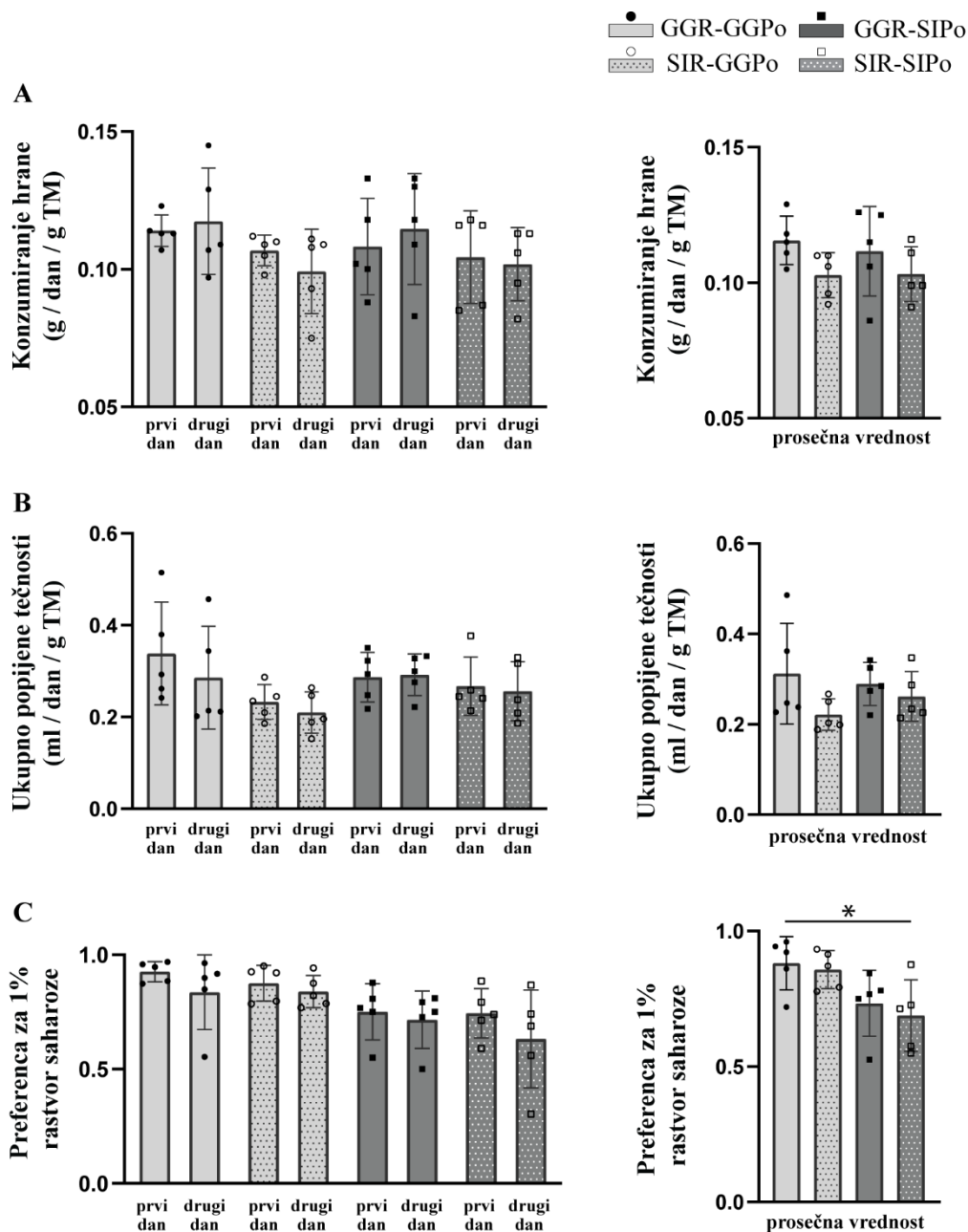
Slika 4.22 Telesne mase i odabrani parametri iz testa otvorenog polja na inicijalnom testiranju 29. postnatalnog dana, kao i 36. i 43. dana nakon socijalne izolacije muških potomaka GG ili SI roditelja.

(A) Telesna masa mužjaka 29. postnatalnog dana, pre razdvajanja muškog potomstva na SI i GG. (B) Lokomotorna aktivnost mužjaka u Testu otvorenog polja pre razdvajanja na SI i GG. (C) Vertikalna aktivnost mužjaka u Testu otvorenog polja pre razdvajanja na SI i GG. (D) Telesna masa mužjaka nakon 7 dana SI ili GG. (E) Lokomotorna aktivnost mužjaka u Testu otvorenog polja nakon 7 dana SI ili GG. (F) Vertikalna aktivnost mužjaka u Testu otvorenog polja nakon 7 dana SI ili GG. (G) Telesna masa mužjaka nakon 14 dana SI ili GG. (H) Lokomotorna aktivnost mužjaka u Testu otvorenog polja nakon 14 dana SI ili GG. (I) Vertikalna aktivnost mužjaka u Testu otvorenog polja nakon 14 dana SI ili GG. (grupno gajeno potomstvo koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR–GGPo), grupno gajeno potomstvo koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR–GGPo), socijalno izolovano potomstvo koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR–SIPo), socijalno izolovano potomstvo koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR–SIPo)).

$p=0,047$ (GGR–GGPo u odnosu na SIR–SIPo). Statistička poređenja i tačne p vrednosti su date u Tabeli 10.



Slika 4.23 Odabrani parametri korišćeni za procenu anksioznosti na inicijalnom testiranju 29. postnatalnog dana, kao i 36. i 43. dana nakon socijalne izolacije muških potomaka GG ili SI roditelja. **(A)** Broj ulaza u centralno polje kod mužjaka 29. postnatalnog dana, pre razdvajanja muškog potomstva na SI i GG. **(B)** Vreme provedeno u centralnom polju 29. postnatalnog dana, pre razdvajanja muškog potomstva na SI i GG. **(C)** Broj ulaza u centralno polje nakon 7 dana SI ili GG. **(D)** Vreme provedeno u centralnom polju nakon 7 dana SI ili GG. **(E)** Broj ulaza u centralno polje nakon 14 dana SI ili GG. **(F)** Vreme provedeno u centralnom polju nakon 14 dana SI ili GG (grupno gajeno potomstvo koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR–GGPo), grupno gajeno potomstvo koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR–GGPo), socijalno izolovano potomstvo koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR–SIPo), socijalno izolovano potomstvo koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR–SIPo)). * $p=0,026$ dvofaktorska ANOVA (GGR–GGPo i SIR–GGPo u odnosu na GGR–SIPo i SIR–SIPo). Statistička poređenja i tačne p vrednosti su date u Tabeli 10.



Slika 4.24 Preferenca za saharozni rastvor i konzumiranje hrane i vode potomstva muškog pola grupno gajenih i socijalno izolovanih roditelja, koji su gajeni u grupi ili izolaciji dve nedelje, tokom rane i srednje adolescencije. Za svaku tačku merenja od interesa mere su date pojedinačno za svaki od dva uzastopna dana testiranja P44 i P45, kao i njihove prosečne vrednosti. Podaci su predstavljeni u vidu srednje vrednosti \pm SD, sa individualnim vrednostima u okviru grupe unutar grafičkog stuba. Poređenja između grupa i unutar grupa tokom definisanog vremena su prikazana u vidu linija iznad grafičkih stubova. (A) Konzumiranje hrane po danima, kao i prosečna vrednost konzumirane hrane. (B) Ukupno popijena tečnost po danima, kao i prosečna vrednost popijene tečnosti. (C) Preferenca 1% rastvora saharoze po danima, kao i prosečna vrednost. (grupno gajeno potomstvo koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR–GGPo), grupno gajeno potomstvo koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR–GGPo), socijalno izolovano potomstvo koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR–SIPo), socijalno izolovano potomstvo koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR–SIPo)). * $p=0,054$, dvofaktorska ANOVA (GGR–GGPo u odnosu na SIR–SIPo). Statistička poređenja i tačne p vrednosti su date u Tabeli 10.

Tabela 10. Sumirani prikaz analiziranih parametara, testova korišćenih u statističkoj analizi, dobijenih p vrednosti i broja korišćenih životinja (n) za rezultate prikazane u okviru podnaslova 4.12. Analiza pokriva fizičke karakteristike roditeljske generacije SI ili GG životinja tokom perioda rane i srednje adolescencije, kao i grupno gajeno potomstvo (GGPo) koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR; grupa GGR-GGPo), grupno gajeno potomstvo (GGPo) koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR; grupa SIR-GGPo), socijalno izolovano potomstvo (SIPo) koje potiče od grupno gajenih roditelja (GGR; grupa GGR-SIPo) i socijalno izolovano potomstvo (SIPo) koje potiče od socijalno izolovanih roditelja (SIR; grupa SIR-SIPo).

Karakteristike majki gajenih u grupi ili izolaciji tokom peripuberteta i njihovog potomstva									
Slika 4.20		Fizičke karakteristike ženki pre i nakon začeća, kao i njihovog potomstva							
		U	Z	p			U	Z	p
Slika 4.20A		25	-1,820	0,069	Slika 4.20B		28	-1,845	0,065
Slika 4.20C	7 dana	51	0,000	1,000	Slika 4.20D		41	0,700	0,484
	15 dana	50,5	-0,035	0,972					
	21 dan	43	-0,560	0,575					
Slika 4.20E	♂	34,5	1,155	0,248	Slika 4.20F (♂+♀)	P7	214	-0,318	0,750
	♀	47	-0,280	0,779		P15	141	-1,976	0,048
						P21	172,5	-1,261	0,207
Slika 4.20G ♂	P7	48	-0,210	0,834	Slika 4.20H ♀	P7	47	-0,280	0,779
	P15	31	-1,400	0,161		P15	30,5	-1,435	0,151
	P21	37,5	-0,945	0,345		P21	37,5	-0,945	0,345
Slika 4.21		Razvojne osobine odabranog muškog i ženskog potomstva GG i SI roditelja							
		t	df	p			t	df	p
Slika 4.21A ♂	P7	0,034	8	0,974	Slika 4.21D ♀	P7	0,345	8	0,739
	P15	-0,044	8	0,966		P15	0,152	8	0,883
	P21	0,680	8	0,516		P21	0,846	8	0,422
Slika 4.21B ♂ GG vs. SI	min	U	Z	p	Slika 4.21E ♀ GG vs. SI	min	t	df	p
	0-5	10	-0,522	0,602		0-5	-0,111	8	0,914
	min	t	df	p		min	t	df	p
	5-10	-2,499	8	0,037		5-10	-2	8	0,149
Slika 4.22	Telesne mase i odabrani parametri iz testa otvorenog polja na inicijalnom testiranju P29, kao i P36 i P43 nakon GG ili SI muških potomaka GG i SI roditelja								
dvofaktorska ANOVA							U	Z	p
Slika 4.22A Telesna masa P29	Faktor: društveno okruženje F_0		$F_{(1,16)} = 0,104, p = 0,751$		Slika 4.22B Lokomotorna aktivnost P29	42	-0,605	0,545	
Faktor: društveno okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 0,179, p = 0,678$							
Faktor: okruženje $F_0 \times$ okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 0,327, p = 0,576$							
Slika 4.22D Telesna masa P36	Faktor: društveno okruženje F_0		$F_{(1,16)} = 0,078, p = 0,783$		Slika 4.22C Vertikalna aktivnost P29	44	-0,454	0,650	
Faktor: društveno okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 0,942, p = 0,346$							
Faktor: okruženje $F_0 \times$ okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 0,942, p = 0,346$							
Slika 4.22G Telesna masa P43	Faktor: društveno okruženje F_0		$F_{(1,16)} = 0,543, p = 0,472$		Post hoc test				
Faktor: društveno okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 1,222, p = 0,285$							
Faktor: okruženje $F_0 \times$ okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 0,306, p = 0,588$							
dvofaktorska ANOVA							Post hoc test		
Slika 4.22E Lokomotorna aktivnost P36	Faktor: društveno okruženje F_0		$F_{(1,16)} = 0,444, p = 0,515$		bez značajnosti između grupa				
Faktor: društveno okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 5,261, p = 0,036$							
Faktor: okruženje $F_0 \times$ okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 0,339, p = 0,568$							
Slika 4.22F Vertikalna aktivnost P36	Faktor: društveno okruženje F_0		$F_{(1,16)} = 0,082, p = 0,778$		bez značajnosti između grupa				
Faktor: društveno okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 4,472, p = 0,051$							
Faktor: okruženje $F_0 \times$ okruženje F_1		$F_{(1,16)} = 0,076, p = 0,786$							

Slika 4.22H Lokomotorna aktivnost P43	Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₀ $F_{(1,16)} = 1,472, p = 0,243$			GGR-GGPo vs. GGR-SIPo	$p = 0,396$		
	Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 8,269, p = 0,011$			SIR-GGPo vs. SIR-SIPo	$p = 0,108$		
	Faktor: <i>okruženje</i> F ₀ x <i>okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 0,342, p = 0,567$			GGR-GGPo vs. SIR-GGPo	$p = 0,970$		
				GGR-SIPo vs. SIR-SIPo	$p = 0,593$		
Slika 4.22I Vertikalna aktivnost P43	Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₀ $F_{(1,16)} = 0,279, p = 0,604$			bez značajnosti između grupa			
Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 4,270, p = 0,055$							
Faktor: <i>okruženje</i> F ₀ x <i>okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 0,645, p = 0,434$							
Slika 4.23	Odabrani parametri testa otvorenog polja korišćeni za procenu anksioznosti na inicijalnom testiranju P29, kao i P36 i P43 nakon GG ili SI muških potomaka GG ili SI roditelja						
Slika 4.23A	U	Z	<i>p</i>	Slika 4.23B	U	Z	<i>p</i>
Broj ulaza u CP P29	43	-0,529	0,597	Vreme provedeno u CP P29	46	0,302	0,762
dvofaktorska ANOVA				Post hoc test			
Slika 4.23C Broj ulaza u CP P36	Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₀ $F_{(1,16)} = 0,202, p = 0,659$			bez značajnosti između grupa			
Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 5,996, p = 0,026$							
Faktor: <i>okruženje</i> F ₀ x <i>okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 0,546, p = 0,471$							
Slika 4.23D Vreme provedeno u CP P36	Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₀ $F_{(1,16)} = 0,009, p = 0,925$			bez značajnosti između grupa			
Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 2,709, p = 0,119$							
Faktor: <i>okruženje</i> F ₀ x <i>okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 1,345, p = 0,263$							
Slika 4.23E	U		Z		p		
Broj ulaza u CP P43	SIR-GGPo vs. SIR-SIPo		6		1,358		0,175
	SIR-GGPo vs. GGR-GGPo		11		0,313		0,754
	SIR-GGPo vs. GGR-SIPo		9		0,731		0,465
	SIR-SIPo vs. GGR-GGPo		7		-1,149		0,251
	SIR-SIPo vs. GGR-SIPo		7,5		-1,044		0,296
	GGR-GGPo vs. GGR-SIPo		11		0,313		0,754
Slika 4.23F	U		Z		p		
Vreme provedeno u CP P43	SIR-GGPo vs. SIR-SIPo		7		1,149		0,251
	SIR-GGPo vs. GGR-GGPo		10		0,522		0,602
	SIR-GGPo vs. GGR-SIPo		8		0,940		0,347
	SIR-SIPo vs. GGR-GGPo		8		-0,940		0,347
	SIR-SIPo vs. GGR-SIPo		9		-0,731		0,465
	GGR-GGPo vs. GGR-SIPo		11		0,313		0,754
Slika 4.24	Preferenca za saharozni rastvor i konzumiranje hrane i vode potomstva muškog pola GG i SI roditelja, koji su gajeni u grupi ili izolaciji dve nedelje, tokom rane i srednje adolescencije						
n = 5 životinja po grupi	prvi dan vs. drugi dan Wilcoxon test			dvofaktorska ANOVA			
		t	Z	p			
Slika 4.24A Konzumiranje hrane	GGR-GGPo		6		0,405		0,686
	GGR-SIPo		4		0,944		0,345
	SIR-SIPo		6		0,405		0,686
	SIR-GGPo		3		1,214		0,225
Slika 4.24B Ukupno popijene tečnosti	GGR-GGPo		0		2,023		0,043
	GGR-SIPo		7		0,135		0,893
	SIR-SIPo		6		0,405		0,686
	SIR-GGPo		4		0,944		0,345
Slika 4.24C	dvofaktorska ANOVA			Tukey HSD test			
Preferenca za 1% rastvor saharoze (prosečna vrednost)	Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₀ $F_{(1,16)} = 0,510, p = 0,485$			GGR-GGPo vs. GGR-SIPo		$p = 0,175$	
	Faktor: <i>društveno okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 10,773, p = 0,005$			SIR-GGPo vs. SIR-SIPo		$p = 0,102$	
	Faktor: <i>okruženje</i> F ₀ x <i>okruženje</i> F ₁ $F_{(1,16)} = 0,048, p = 0,828$			GGR-GGPo vs. SIR-GGPo		$p = 0,985$	
				GGR-SIPo vs. SIR-SIPo		$p = 0,302$	
				GGR-GGPo vs. SIR-SIPo		$p = 0,054$	

5. DISKUSIJA

Socijalno iskustvo u kritičnim razvojnim fazama jedan je od značajnih sredinskih faktora koji utiče na centralni nervni sistem i oblikuje ponašanje socijalnih sisara, uključujući glodare u razvoju (Rosenzweig, Bennett, 1976). Eksperimenti na glodarima su značajno doprineli razumevanju socijalnih potreba sa bazičnog biološkog aspekta i pokazali su se pouzdanom paradigmom za izučavanje uloge socijalnog iskustva u nastanku depresije i emotivnih oboljenja tokom života (Harlow i sar., 1971). Istraživanje sprovedeno u okviru ove doktorske teze daje doprinos proučavanju biološkog značaja pripadnosti vršnjačkoj grupi tokom adolescencije, primenom modela socijalne izolacije i proučavanjem ponašajnog, fiziološkog i biohemijskog odgovora mužjaka pacova *Wistar* soja na odsustvo direktnih socijalnih kontakata sa jedinkama istog pola i starosti tokom peripuberteta.

Ova studija je pokazala da kod jedinki gajenih u izolaciji tokom rane faze adolescencije, odsustvo direktnog društvenog kontakta sa vršnjacima dovodi do ispoljavanja hiper-reaktivnosti i agitiranosti u odgovoru na novu sredinu, ponašanja nalik anksioznom, povećane sklonosti ka novinama, kao i tendenciju ka traženju senzacija u poređenju sa kontrolnim, grupno gajenim jedinkama. Osim toga, socijalna izolacija u ovom animalnom modelu dovela je i do ispoljavanja hipohedonije ali očuvanog apetita, povećane preference socijalnog prostora i povećane socijalnosti, ali i smanjenja broja PV⁺ interneurona i gustine mikrogljijskih ćelija u dentatnom girusu. Socijalno izolovane rano adolescentne jedinke drugačije odgovaraju na dodatni stres gladovanja u poređenju sa kontrolama, sudeći po neregulisanoj glikemiji i smanjenoj koncentraciji hormona stresa, a takođe je promenjena i aktivnost enzima antioksidativne zaštite u perifernim organima.

Jedinke gajene u izolaciji tokom rane i srednje faze adolescencije u poređenju sa grupno gajenim vršnjacima ispoljavaju hipohedoniju, očuvanu motivaciju za hranom, ali narušen hedonistički aspekt ishrane, oslabljen ponašajni i izmenjen neuronski odgovor na psihostimulativnu drogu D-amfetamin, indukovanu socijalnost, ali anulirano preferiranje socijalne novine koje se prirodno javlja upravo u periodu krajem srednje adolescentne faze, odsustvo promena u broju PV⁺ interneurona, kao i broja i morfoloških karakteristika mikrogljijskih ćelija u dentatnom girusu. Socijalno izolovane srednje adolescentne jedinke u poređenju sa grupno gajenim vršnjacima imaju neizmenjen bazalni nivo hormona stresa i ne reaguju drugačije na dodatni stres gladovanja, ali se razlike uočavaju u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u perifernim organima. Značajno povećanje aktivnosti SOD1 u eritrocitima socijalno izolovanih u odnosu na grupno gajene jedinke izdvaja se kao jedina konzistentna razlika u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, jer se uočava bez obzira na to da li su jedinke koje se porede gladovale ili ne.

Ova studija je takođe ukazala da socijalno okruženje u kome je gajena roditeljska generacija pacova nema dugoročan uticaj na ponašanje potomstva.

Detaljna diskusija rezultata dobijenih u ovom radu je data u okviru tematskih celina, shodno ciljevima teze.

5.1. Uticaj socijalne izolacije na emocionalnu reaktivnost jedinki u odgovoru na novu sredinu sa različitim anksiozenim potencijalom

Povećana motorna aktivnost, odnosno hiperaktivnost se smatra jednim od najkonzistentnijih rezultata, kada je reč o merenju parametara ponašanja u animalnim modelima socijalne izolacije. Regstruje se veoma rano, u prvim danima izolacije, i javlja neposredno nakon što se životinja nađe u nepoznatoj sredini (Robbins i sar., 1996; Del Arco i sar., 2004), ali nema dovoljno podataka u literaturi o tome kako se ova aktivnost menja kroz vreme u uslovima gajenja jedinki u izolaciji. Rezultati merenja parametara ponašanja životinja u testu otvorenog polja pokazali su povećanje motorne aktivnosti u novoj sredini kod pacova gajenih u uslovima socijalne izolacije tokom perioda rane adolescencije, ali ne i tokom perioda rane i srednje adolescencije. Detaljnom analizom motorne aktivnosti tokom dvadesetominutnog perioda uočeno je da hiperaktivnost izolovanih jedinki, koja se zasniva na povećanju lokomotorne, stereotipne i vertikalne aktivnosti tokom prvih 10 minuta testiranja, odražava *hiper-reaktivnost*, jer nije karakteristična za celokupni period merenja. Povećana

aktivnost nije uticala na habituaciju životinja na prostor u kome su testirane odnosno na sposobnost njihovog prilagođavanja na novu sredinu. Generalizovanu hiperaktivnost ne treba izjednačavati sa hiper-reaktivnošću i u tom kontekstu je analiza vremenskog profila motornog odgovora od velikog značaja. Uočena hiper-reaktivnost ukazuje da socijalno izolovane životinje imaju narušenu reakciju na novu sredinu, a ne generalizovanu hiperaktivnost koja negativno utiče na sposobnost prilagođavanja testirane životinje na novi prostor. Neka od prethodnih istraživanja takođe ukazuju da hiper-reaktivnost na novu sredinu kod izolovanih životinja ne mora nužno biti povezana sa povećanom spontanom aktivnošću i nemogućnošću prilagođavanja na nov prostor (Gentsch i sar., 1982).

Takođe, životinje gajene u uslovima socijalne izolacije tokom rane adolescencije su, u poređenju sa grupno gajenim jedinkama, u testu otvorenog polja veći broj puta ulazile u centralnu zonu arene i učestalije ispoljavale stereotipne oblike ponašanja, u formi ponavljajućih neistraživačkih pokreta koji u animalnim modelima odražavaju uznemirenost, to jest ekscitirano ponašanje koje nije istraživačko (Mason, 1991). Iako još ne postoji objašnjenje za ovakav etološki fenomen, nekoliko ranijih studija ukazalo je da limitirano socijalno iskustvo životinja gajenih u izolaciji za posledicu može imati povećanu istraživačku aktivnost (Einon, Morgan, 1977), povišeno stanje uzbuđenja (Konrad, Melzack, 1975) ili visoko emotivnih oblika ponašanja (Gentsch i sar., 1981).

Rano adolescentne socijalno izolovane životinje nisu pokazale značajne razlike u ponašanju u poređenju sa grupno gajenim jedinkama u testu istraživanja novog objekta u već poznatom prostoru. U biologiji ponašanja reakcija životinja u testu novog objekta ima posebno značenje, jer se suštinski razlikuje od testova koji se baziraju na istraživanju potpuno novog prostora. Smatra se da narušena istraživačka aktivnost životinje ka novom objektu u poznatom prostoru, koji je zapamćen kao bezbedan, ukazuje na *anksioznost kao osobinu*, a ne *stanje* (van Gaalen, Steckler, 2000). Anksioznost kao osobina predstavlja spremnost jedinki da odgovori povlačenjem i udaljavanjem od novog stimulusa koji suštinski nije opasan, ali ga ona doživljava kao takav. To bi u testu novog objekta značilo da testirana jedinka, ako ima anksioznu osobinu, manji broj puta prilazi novom objektu i kraće se zadržava u njegovoj neposrednoj blizini tokom merenja. Sa druge strane, anksioznost kao stanje varira po intenzitetu i fluktuiru tokom vremena u zavisnosti od sredinskog konteksta i pojačava se u prisustvu objektivno anksiozenih stimulusa, kao što je otvoreni krak uzdignutog krstastog lavirinta. Poznato je da je anksioznost kao stanje rezultat interakcija genetskih i sredinskih faktora tokom razvoja, ali može da bude i posledica nekog životnog iskustva tokom specifičnog razvojnog perioda (Steimer, 2011).

Rezultati ove studije ukazuju da socijalna izolacija tokom perioda rane adolescencije kod peripubertetskih mužjaka pacova ne doprinosi ispoljavanju osobina nalik anksioznim, jer se parametri ponašanja socijalno izolovanih životinja i njihovih grupno gajenih vršnjaka nisu značajno razlikovali u testu novog objekta.

U testu uzdignutog krstastog lavirinta, koji je baziran na prirodnoj averziji glodara ka visini i otvorenom prostoru (van Gaalen, Steckler, 2000), pacovi gajeni u uslovima socijalne izolacije tokom perioda rane adolescencije su pokazali znake hiperaktivnosti, tj. češće su ulazili u zatvorene krake lavirinta tokom testiranja, što je indikator opšte lokomotorne aktivnosti (Rodgers i sar., 1999). Dodatno, socijalno izolovani pacovi su učestalije *izvirivali* iz zatvorenih kraka, procenjivajući time rizik i provodili više vremena u najdistalnijem delu otvorenog kraka. To ukazuje da rano adolescentni izolovani pacovi, u poređenju sa kontrolnim, imaju veću sklonost ka *proceni rizika i rizičnom ponašanju*. Izvirivanje predstavlja ambivalentno ponašanje koje reflektuje konflikt između prilaznja i izbegavanja, a pokazano je u prethodnim studijama da predstavlja jedini parametar ovog testa koji je u pozitivnoj korelaciji sa nivoom kortikosterona u cirkulaciji (Rodgers i sar., 1999). Izvirivanje je vezano za *procenu rizika*, odnosno prikupljanje informacija u potencijalno nebezbednim situacijama i jeste funkcionalna optimizacija najadaptivnije ponašajne strategije (Rodgers i sar., 1999). Kao takav, ovaj parametar jedini pokazuje u kojoj meri se u uslovima stresa stimuliše apetitivno/pristupno ponašanje i nagoveštava sklonost jedinke da pribegava stresnim/rizičnim situacijama umesto da ih izbegava (Piazza i sar., 1993). Takođe, socijalno izolovani rano adolescentni mužjaci pacova su u

testu uzdignutog krstastog lavirinta ispoljili ponašanje nalik anksioznom, jer su provodili manje vremena u prve dve trećine otvorenih kraka u poređenju sa grupno gajenim životinjama.

Brojna istraživanja ukazuju da je povećana zainteresovanost socijalno izolovanih jedinki za novinu posledica specifičnog neurohemijskog disbalansa monoaminskih neurotransmitera - dopamina i serotonina unutar različitih moždanih regiona (Broderick, Phelix, 1997; Fulford, Marsden, 1998; Weiss i sar., 2004). U animalnim studijama kojima se ispituju ponašanja nalik depresivnom povećan lokomotorni odgovor se povezuje sa promenama u funkciji dopaminskog mezolimbickog sistema (Robbins i sar., 1996; Del Arco i sar., 2004), odnosno povećanim oslobađanjem dopamina u ventralnom strijatumu. Hiperdopaminsko stanje se vezuje za nehabituirajuću hiperaktivnost, koju, međutim, nisu ispoljili mladi pacovi socijalno izolovani tokom perioda adolescencije u ovoj studiji. Budući da su se rano adolescentni socijalno izolovani pacovi prilagodili na novu sredinu tokom prvog dela testiranja, čini se verovatnijom hipoteza da je u osnovi ovakvog ponašanja, osim promene u dopaminskom sistemu strijatuma, interakcija većeg broja neurotransmiterskih sistema u različitim moždanim regionima (Robbins i sar., 1996; Heidbreder i sar., 2000).

Tačnu neurohemijsku osnovu motorne hiper-reaktivnosti socijalno izolovanih rano adolescentnih mužjaka pacova u odgovoru na novu sredinu nije uputno dati bez dodatnih analiza, mada se nekoliko pretpostavki može dati imajući u vidu poznate činjenice. Prva pretpostavka bazira se na činjenicama da anticipacija novine aktivira dopaminske neurone u *substantia nigra* i ventralnoj tegmentnoj oblasti (SN/VTA) i stimuliše istraživačku aktivnost kroz angažovanje neuronskih sistema za nagrađivanje, sa akcentom na ventralni strijatum tj. *nucleus accumbens* (Legault, Wise, 2001; Wittmann i sar., 2007). Dakle, jedna od mogućnosti je da je kod rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova izmenjena anticipacija novine kao i dopamin-zavisni odgovor sistema za nagrađivanje na prostornu novinu. Druga pretpostavka je da je detekcija novog prostora i posledična hiper-reaktivnost, tj. uočena hiperaktivnost socijalno izolovanih rano adolescentnih pacova u prvim minutima odgovora na novinu, povezana sa neadekvatnom aktivnošću prefrontalnog dela kore velikog mozga, koji ima važnu ulogu u prezentaciji novine. Prefrontalna kora kontroliše aktivnost subkortikalnih regiona mozga (engl. *top-down control*, Malik i sar., 2022), pod jakom je kontrolom hipokampusu u aktivnostima koje obuhvataju prostornu orijentaciju i odgovor na sredinske novine (Spellman i sar., 2015) i ima ključnu ulogu u donošenju odluka o ispoljavanju ponašanja na osnovu opaženog (engl. *perceptual decision making*, Rahnev, 2017). Detalji ove "top-down" kontrole još nisu u potpunosti razjašnjeni. Nova istraživanja ukazuju da monosinaptičke veze GABA neurona dugog dometa (engl. *monosynaptic long-range GABAergic projections*) koji se iz mPFC projektuju ka hipokampusu utiču na aktivnost inhibitornih interneurona hipokampusu, dovodeći do intenziviranja istraživačkog ponašanja (Malik i sar., 2022). Imajući u vidu ove podatke, može se pretpostaviti da je pojačano istraživanje nove sredine od strane socijalno izolovanih životinja neposredno nakon izlaganja istoj makar delom posledica pojačane aktivnosti navedenih GABA neurona dugog dometa, koji se projektuju iz mPFC ka hipokampusu. Ipak, neophodna je dodatna analiza različitih moždanih regiona da bi se dublje tumačili rezultati koji se tiču odgovora socijalno izolovanih peripubertetskih pacova na novu sredinu.

Prefrontalna kora sisara je region mozga koji najkasnije sazreva, kod ljudi sa oko 24 godine života (Arain i sar., 2013) i iskustvo kontakta sa različitim sredinskim stimulusima je od presudnog značaja za ovaj proces. Ovaj region mozga je izuzetno osetljiv na stres, a smatra se da je osetljivost tokom perioda adolescencije potpomognuta pojačanom dopaminskom signalizacijom u mPFC, dok je dominantni razlog osetljivosti adultnog mPFC na stres smanjena ekspresija molekula koji služe kao „molekulske kočnice” u signalnoj transdukciji sa receptora medijatora stresa (Datta, Arnsten, 2019).

Naizgled neobičan spoj stanja nalik anksioznom i sklonosti ka rizičnom ponašanju, uočen kod socijalno izolovanih jedinki, dosta otkriva o biološkoj osnovi psihijatrijskih poremećaja i u skladu je sa činjenicama primećenim kod ljudi. Naime, rani atipični simptom depresivnih poremećaja kod mladih podrazumeva *uznemireno ponašanje* (agitaciju), tj. hroničnu razdražljivost praćenu simptomom hiperpobuđenosti (engl. *irritability accompanied by hyperarousal symptoms*, Brotman i

sar., 2006; Thapar i sar., 2012). Poremećaj pažnje i hiperaktivnost u adolescenciji povećavaju rizik razvoja depresije (Meinzer i sar., 2012). Osobe koje su anksiozne u svakodnevnim, rutinskim situacijama takođe su sklone i ponašanju usmerenom ka traženju senzacija (Burkhart i sar., 1978), a ovakvi oblici ponašanja, zajedno sa rizičnim oblicima ponašanja povećavaju šanse za nastanak depresivnih simptoma kod adolescenata (Testa, Steinberg, 2010). Hiperaktivnost usled socijalne deprivacije se javlja i kod dece (Kreppner i sar., 2001), što ukazuje da prisustvo ovakvih socijalnih uslova u ranom periodu razvoja dovodi do promena u funkcijskom razvoju centralnog nervnog sistema, koji za posledicu ima izmenjeno ponašanje u kasnijim periodima života i potencijalnu opasnost za nastanak nestabilnih emotivnih stanja (Kennedy i sar., 2016).

5.2. Uticaj socijalne izolacije na deksamfetaminom-indukovani psihomotorni odgovor i aktivaciju neurona strijatuma i prefrontalne zone kore velikog mozga

Psihostimulans D-AMPH je korišćen u kliničkoj praksi za potvrđivanje dijagnoze atipične depresije (Fawcett, Siomopoulos, 1971; Tremblay i sar., 2002). Naime, kod depresivnih pacijenata postoji pozitivna korelacija između stepena depresije i nagrađujućih efekata D-AMPH koji se kod ispitanika ispoljavaju u vidu intenzivnog euforičnog raspoloženja (Tremblay i sar., 2002), dok je kod obolelih od atipične depresije odgovor na D-AMPH, kao i na terapiju tricikličnim antidepressivima slab (Fawcett, Siomopoulos, 1971), a to je prva klinički prepoznata i najjača determinanta atipične depresije (Łojko, Rybakowski, 2017). Smatra se da je povećani intenzitet euforije u odgovoru na D-AMPH kod pacijenata sa dijagnozom depresije posledica hipodopaminskog stanja u sistemu mozga koji reguliše ponašanje vezano za nagradu i posledičnog povećanja ekspresije i/ili aktivacije dopaminskih receptora u bolesti (Tremblay i sar., 2002). Kod glodara, intenzivirana lokomotorna aktivnost, izazvana primenom D-AMPH, odražava bezuslovni odgovor na nagrađujući efekat droge (Wise, Bozarth, 1987) i praćen je sintezom proteina ranog ćelijskog odgovora, biohemijskih indikatora neuronske aktivnosti u aktiviranim delovima mozga (Sheng, Greenberg, 1990; Morgan, Curran, 1991), te se koristi za proučavanje promena u sistemu mozga koji reguliše ponašanje motivisano nagradom (engl. *brain reward system*, Wise, Bozarth, 1987).

Rezultati ove studije su pokazali da jedinke gajene u uslovima socijalne izolacije tokom rane i srednje adolescencije u poređenju sa grupno gajenim vršnjacima pokazuju značajno slabiji lokomotorni (manje pređeni put u cm u testu otvorenog polja) i stereotipni odgovor (ponavljajući/repetitivni pokreti) na D-AMPH, što ukazuje da ovaj psihostimulans ispoljava znatno slabiji efekat kod socijalno izolovanih jedinki. Takođe, redukovani psihomotorni odgovor na D-AMPH životinja gajenih u uslovima socijalne izolacije bio je praćen povećanom ekspresijom biohemijskih indikatora neuronske aktivnosti, proteinima c-FOS i EGR1, u prefrontalnoj zoni kore velikog mozga, ali ne i u strijatumu (Harlan, Garcia, 1998). Uočena negativna korelacija između intenziteta lokomotornog odgovora na psihostimulativnu drogu i neuronske aktivnosti mPFC u skladu je sa podacima iz literature, po kojima niske doze D-AMPH, slične onima korišćenim u ovoj studiji, smanjuju aktivnost neurona mPFC, a povećavaju aktivnost neurona strijatuma podstičući time efekat nagrađujućeg iskustva kod zdravih glodara (Mora i sar., 1976; Homayoun, Moghaddam, 2006; Gulley, Stanis, 2010). Novija istraživanja na glodarima potvrđuju da povećana aktivnost mPFC suprimira ispoljavanje ponašanja motivisanog nagradom (Ferenczi i sar., 2016) i ukazuju na pozitivnu korelaciju između stanja depresije i povećanog odgovora mPFC tokom anticipacije nagrade (Pizzagalli, 2014; Romens i sar., 2015). Uloga PFC je da kontroliše aktivnost subkortikalnih regiona mozga (Malik i sar., 2022). Tako se pojačana kontrola ventralnog strijatuma (uključujući *nucleus accumbens*) od strane mPFC dovodi u vezu sa povećanjem anhedonije kod individua koje su bile izložene traumi (Olson i sar., 2018; Ironside i sar., 2018).

Rezultati ovih istraživanja ukazuju da socijalna izolacija u adolescenciji smanjuje odgovor na farmakološki stimulus sa nagrađujućim efektom, što je praćeno pojačanom neuronskom aktivnošću mPFC.

5.3. Konzumatorna hipohedonija i motivisani unos hrane u testu preference saharoznog rastvora

Ključni elementi hedonističkog ponašanja, kao forme motivisanog ponašanja, čine apetitivna komponenta (želja), konzumatorna komponenta (sviđanje) i komponenta učenja iz iskustva. Mezolimbčki projekcioni dopaminski neuroni su odgovorni za apetitivni pristup, dok endogeni opijatni sistem reguliše komponentu sviđanja (Treadway, Zald, 2011; Kringelbach, Berridge, 2016). Ova dva sistema su u balansiranoj komunikaciji zahvaljujući *interakciji opijatnog i dopaminskog sistema* u nekoliko moždanih regiona, sa akcentom na ventralni strijatum (*nucleus accumbens*) i ventralni palidum (Treadway, Zald, 2011). Zbog postojanja *opijatno-dopaminskog* funkcijskog kontinuuma, izrazit konzumatorni hedonizam doprinosi apetitivnom pristupu ka izvoru osećaja zadovoljstva, tj. ono što nam se sviđa i želimo.

Preferenca rastvora saharoze (1-2%) u odnosu na vodu predstavlja test za ispitivanje konzumatornog hedonizma kod glodara (Willner, 2017). Za konzumaciju i preferencu saharoze u odnosu na vodu životinja ne mora da ulaže dodatni napor (motivaciju) kako bi pristupila slatkom rastvoru, jer joj je on lako dostupan u flašici oslonjenoj na hranilicu kaveza u kome živi (Hoffman, 2016). Rezultati ove studije su pokazali da gajenje peripubertetskih pacova u uslovima socijalne izolacije tokom perioda rane adolescencije izaziva konzumatornu hipohedoniju, tj. smanjenu preferencu 1% rastvora saharoze, koja se vremenom produbljuje, tj. izraženija je kod jedinki gajenih u uslovima socijalne izolacije tokom perioda rane i srednje adolescencije. Značajne razlike u količini unete hrane tokom konzumacije 1% rastvora saharoze nisu uočene kod socijalno izolovanih u odnosu na grupno gajene životinje. Ovi rezultati ukazuju da smanjena preferenca 1% rastvora saharoze kod peripubertetskih pacova predstavlja konzistentan nalaz narušenog emotivnog zdravlja u uslovima socijalne izolacije i ističu potencijal ovog eksperimentalnog modela u proučavanju anhedonije u periodu adolescencije. Naime, novija klinička istraživanja ukazuju da je anhedonija bez promena u unosu hrane i telesnoj masi glavno obeležje adolescentne depresije (Gabbay i sar., 2015).

Poznato je da konzumiranje visoko-procentnog rastvora saharoze (20%) povećava nivo dopamina u ventralnom strijatumu eksperimentalnih glodara (Hajnal i sar., 2004) i tako stimuliše aktivnosti zavisne od dopamina uključujući motivisano ponašanje usmereno ka cilju. Konzumiranje hrane predstavlja oblik ponašanja usmerenog ka cilju, jer ga osim osećaja gladi pokreće i motivacija. Hedonističko „dopadanje” saharoze i motivisani unos hrane su neurohemijski i neuroanatomski mapirani u ventralnom palidumu (Smith, Berridge, 2005), delu ventralnog strijato-palidnog kompleksa značajnog za kontrolu motivisane motorne aktivnosti, to jest limbičko-motornu integraciju, jer je inervisan od strane *nucleus accumbens* ventralnog strijatuma (Mogenson i sar., 1980; Mogenson, Yang, 1991). Kasnija istraživanja su pokazala da ventralni palidum ima specifičnu ulogu u motivisanom konzumiranju hrane, jer lezije ovog regiona izazivaju afagiju, na osnovu čega je ventralni palidum identifikovan kao značajna komponenta sistema koji reguliše želju za hranom (Berridge, 1996). Međutim, istraživanja na miševima sa sniženim nivoom dopamina u dorzalnom strijatumu, usled nedostatka enzima tirozin hidrosilaze, ukazala su da ovakve životinje umiru od gladi i u prisustvu hrane. Ipak, one i dalje ispoljavaju preferencu za saharozom i lokacijama koje im nude nagrade/stimuluse koji doprinose razvoju zavisničkog ponašanja. Davanje L-DOPE i sledstveno povećanje sadržaja dopamina u dorzalnom strijatumu ovim miševima „vraća” motivaciju za ishranom, povećava im pokretljivost i podstiče ispoljavanje ponašanja vezanog za nagradu (Palmiter, 2008). Ovi rezultati su ukazali da i dorzalni i ventralni strijatum imaju značajnu ulogu u motivisanom konzumiranju hrane, tako što oba regulišu motivisano ponašanje, dok je ventralni strijatum značajan i za obradu stimulusa sa nagrađujućim efektom (Palmiter, 2008).

Da bi se ustanovilo da li gajenje u uslovima socijalne izolacije utiče na konzumatorni hedonizam i njegov doprinos intenziviranju unosa hrane, kao dopamin-zavisnog motivisanog ponašanja usmerenog ka cilju (Hajnal i sar., 2004; Palmiter, 2008), ispitivan je unos hrane grupno gajenih i socijalno izolovanih peripubertetskih mužjaka pacova tokom konzumiranja 20% rastvora saharoze. Dobijeni rezultati su pokazali da pacovi gajeni u grupi tokom rane i srednje adolescencije konzumiraju 20% rastvor saharoze uz povećan unos hrane, što ukazuje da kod ovih jedinki konzumatorni hedonizam doprinosi intenziviranju unosa hrane i da je interakcija *opijatnog i*

dopaminskog sistema u ventralnom strijatumu ovih životinja očuvana. Međutim, pacovi koji su socijalno izolovani tokom rane i srednje adolescencije nisu pokazali povećali unos hrane uprkos intenzivnoj konzumaciji 20% rastvora saharoze (indeks preference 0,9 od maksimalnog 1). Ovaj rezultat jasno ukazuje da nedostatak društvenog okruženja u ranoj i srednjoj adolescenciji narušava doprinos konzumatornog hedonizma intenziviranju unosa hrane i implicira da je interakcija *opijatnog i dopaminskog* sistema u ventralnom strijatumu izolovanih životinja narušena. Analiza preference 1% i 20% rastvora saharoze tokom vremena je ukazala da je bez obzira na procentnost rastvora preferenca grupno gajenih životinja stabilna tokom oba dana testiranja, dok se kod socijalno izolovanih životinja tokom vremena povećava samo preferenca 20% rastvora saharoze. Ovaj rezultat ukazuje da konzumatorna hipohedonija koja se uočava kod životinja gajenih u izolaciji tokom rane i srednje adolescencije ima tendenciju da se smanji u prisustvu jakih konzumatornih stimulusa. Postoji velika sličnost između ovog zapažanja i činjenice da samo kod osoba sa atipičnom (ali ne i melanholičnom) depresijom dolazi do prolaznog popravljivanja raspoloženja u prisustvu prijatnih događaja i stimulusa iz okruženja (engl. *mood reactivity*; Łojko, Rybakowski, 2017).

Kliničke studije koje procenjuju konzumatornu anhedoniju/hipohedoniju korišćenjem saharoznog rastvora su malobrojne (Berlin i sar., 1998; McCabe i sar., 2009; Dichter i sar., 2010), ali je u jednoj od studija pokazano da konzumacija slatkog rezultuje smanjenom aktivacijom ventralnog strijatuma depresivnih pacijenata u poređenju sa zdravim subjektima (McCabe i sar., 2009). Anhedonija kod adolescenata se pokazala kao pouzdan prediktor depresije (Pine i sar., 1999; Wilcox, Anthony, 2004), a povezuje se i sa težim oblikom depresije, kao i lošijim odgovorom na tretman antidepressivima (McMakin i sar., 2012). Anhedonija se kod depresivnih adultnih pacijenata često povezuje sa atipičnim podtipom depresije, koju karakteriše povećan apetit. Međutim, istraživanja na adolescentima ukazuju da se anhedonija može javiti bez promene u indeksu telesne mase, odnosno bez promena apetita (Gabbay i sar., 2015), što ukazuje da depresivni adolescenti imaju specifičnu kliničku sliku kada je reč o apetitu, u odnosu na depresivne adulte (Gabbay i sar., 2015). Međutim, ove činjenice se ne naglašavaju dovoljno u eksperimentalnim istraživanjima, te je isticanje specifičnosti dobijenih rezultata u kontekstu starosti eksperimentalnih jedinki od velikog značaja za produbljivanje značaja animalnih modela za biološku psihijatriju.

Imajući u vidu da je intenziviranje unosa visokoprocenatnog rastvora saharoze uočeno kao specifičnost konzumatornog odgovora srednje adolescentnih socijalno izolovanih pacova na ponuđeni stimulus, kao i da su lokomotorna hiper-reaktivnost u testu otvorenog polja i provođenje vremena u najdistalnijem delu otvorenog kraka uzdignutog krstastog lavirinta uočeni kao specifičnost odgovora na novinu rano adolescentnih socijalno izolovanih pacova (što se tumači kao sklonost ka rizičnom ponašanju) čini se da je sklonost ka intenzivnoj senzornoj stimulaciji konzistentna posledica socijalne izolacije kod peripubertetskih pacova. Traženje novih, kompleksnih i intenzivnih senzacija iz okoline uz prihvatanje određenog nivoa rizika definiše se kao traženje senzacija (Zuckerman, 1994). Zna se da je pojačano traženje senzacija povezano sa većom sklonošću ka upotrebi droga, što nosi rizik od zavisnosti, pa se značajni naporu ulažu u proučavanje ovog fenomena kod laboratorijskih glodara (Dellu i sar., 1996; Belin i sar., 2011). U tom smislu, animalni model okarakterisan u ovoj doktorskoj tezi ima potencijal za ispitivanje u oblasti neurobiologije adicije, posebno imajući u vidu da je anhedonija prepoznata kao značajan faktor koji doprinosi razvoju različitih vrsta zavisnosti (Hatzigiakoumis i sar., 2011).

5.4. Uticaj socijalne izolacije na socijalno ponašanje: odgovor na prisustvo živih jedinki i socijalnih mirisa

Uprkos postojanju brojnih studija na glodarima kao životinjama koje žive u grupama i ispoljavaju socijalno ponašanje, malo je podataka o motivisanom socijalnom ponašanju ovih životinja u ključnim razvojnim periodima, kao što je adolescencija. Socijalno ponašanje, kao i ostala motivisana ponašanja obuhvata *apetitivnu i konzumatornu* komponentu koje imaju merljive indikatore: apetitivna komponenta se meri brojem direktnih prilaza izvoru socijalnog stimulusa, a konzumatorna komponenta se meri vremenom provedenim u istraživanju izvora socijalnog stimulusa.

Rezultati ove doktorske teze, dobijeni analizom ponašanja peripubertetskih pacova u trokomornom testu i u odgovoru na socijalne mirise, su po prvi put ukazali na specifičnosti u razvoju apetitivnih i konzumatornih komponenti socijalnog ponašanja tokom adolescencije, kao i na kompleksnost ponašajnih posledica izazvanih nedostatkom direktnih socijalnih kontakata sa vršnjacima u ovom razvojnem periodu.

U trokomornom testu jedinki se prvo testira *socijabilnost*, koja se procenjuje kroz broj prilaza, kao apetitivne, i vreme interakcije, kao konzumatorne komponente interesovanja za nepoznatu jedinku iste starosti i pola, smeštene u jednom od odeljaka trokomornog kaveza, a zatim i *preferenca socijalne novine*, koja se procenjuje kroz broj prilaza i vreme interakcije za novu jedinku iste starosti i pola u poređenju sa jedinkom, koju je prethodno, tokom faze socijabilnosti upoznala. Jedan od zadataka ovog istraživanja je bio da se kvantitativno okarakterise motivisano ponašanje grupno gajenih i socijalno izolovanih peripubertetskih pacova ka socijalnom prostoru (*socijalna orijentacija*) u obe faze testiranja (faza socijabilnosti, faza preference socijalne novine). Ovaj zadatak je postavljen imajući u vidu da ulazak testirane jedinke u odeljak trokomornog kaveza koji sadrži nepoznatu jedinku (apetitivna komponenta socijalne orijentacije) i boravak u njemu (konzumatorna komponenta socijalne orijentacije) u obe faze testiranja ne mora obligatno da rezultuje direktnim socijalnim kontaktima (to jest socijabilnošću i preferencom socijalne novine) i da ponašanje koje testirana jedinka iskazuje ka samom socijalnom prostoru ima elemente motivisanog prostornog učenja u kome socijalni izvor (nepoznata jedinka) u jednom od odeljaka trokomornog kaveza predstavlja orijentir na osnovu koga se vrši mapiranje socijalnog u fizičkom prostoru. Dobijeni rezultati su opravdali značaj ovakvog metodološkog pristupa, jer su ukazali da *socijalna orijentacija*, odnosno motivisanost da se poseti socijalni prostor i boravi u njemu, nije surogat mera *socijabilnosti i preference socijalne novine*, tj. direktnog interesovanja za socijalni izvor, odnosno novu jedinku koja se u ovom prostoru nalazi. Dobijeni rezultati su takođe ukazali da socijalna izolacija specifično tokom rane adolescencije kao jednu od ponašajnih posledica ima preferiranje i motivisano učenje socijalnog prostora, što nije razvojno-specifični fenomen, jer ga grupno gajene jedinke iste starosti ne iskazuju. Detaljna diskusija dobijenih rezultata, po fazama testiranja u trokomornom testu, data je tekstu koji sledi.

Rezultati dobijeni u testu odgovora na socijalne mirise, poreklom od podloge na kojoj su živele jedinke iste vrste, starosti i pola, pokazali su da su apetitivna i konzumatorna komponenta motivisanog ponašanja testiranih jedinki u ovom testu drugačije od odgovora u trokomornom testu, implicirajući da indikatori odgovora na socijalne mirise nisu zamena za indikatore odgovora u testu koji podrazumeva korišćenje živih životinja kao socijalnog izvora.

5.4.1. Socijalni odgovor na prisustvo živih jedinki - socijalna orijentacija i socijabilnost

Ova studija je pokazala da u ranoj i srednjoj adolescentnoj fazi kod kontrolnih jedinki, gajenih u grupi, ne postoji preferenca za socijalnim prostorom (*socijalna orijentacija*), dok se preferenca socijalne u odnosu na nesocijalnu novinu (*socijabilnost*) javlja krajem srednje faze adolescencije i to isključivo kroz konzumatornu komponentu socijalne motivacije, odnosno vreme provedeno u direktnom istraživanju nepoznate životinje.

Takođe, studija je pokazala da je konzumatorna komponenta socijabilnosti kod pacova u srednjoj adolescentnoj fazi dovoljna za formiranje memorije o prvoprezentovanoj jedinki i usmeravanju pažnje (engl. *attention allocation*) na socijalnu novinu (tj. drugu, novu jedinku). To je rezultovalo ispoljavanjem preference za novu jedinku i to kroz obe komponente motivacionog odgovora, tj. i apetitivnu (broj prilaza) i konzumatornu (vreme istraživanja) komponentu. Dakle, ova studija je pokazala da se kod grupno gajenih pacova preferenca socijalne novine javlja u srednjoj adolescentnoj fazi, bez preference socijalnog prostora.

Ovi rezultati ukazuju i da *socijalna orijentacija* i *apetitivna* komponenta socijalne motivacije u fazi socijabilnosti nisu karakteristike motivisanog socijalnog ponašanja peripubertetskih pacova gajenih u stabilnom društvenom okruženju. Treba naglasiti da o razvojnim putanjama socijabilnosti kod glodara ima nedovoljno podataka, te je ova studija po prvi put pokazala da kod mladih jedinki gajenih u grupi socijabilnost nije očigledna u periodu rane adolescencije. Ovo je važan podatak, jer

se u literaturi koja analizira socijalno ponašanje glodara, odsustvo indikatora socijabilnosti smatra naznakom autizmu-sličnog ponašanja (Moy i sar., 2004; Dai i sar., 2018). Dakle, *konzumatorni* aspekt socijabilnosti je razvojno regulisana osobina pacova, te nije uvek očekivani ishod studije, jer je u pozitivnoj korelaciji sa stepenom maturacije, makar kod *Wistar* pacova.

Za razliku od pacova gajenih u grupi, njihovi vršnjaci gajeni u uslovima socijalne izolacije pokazivali su preferencu socijalnog prostora i to kroz *konzumatornu* komponentu socijalne motivacije, dok je *apetitivna* komponenta socijalne motivacije bila prisutna samo kod pacova gajenih u uslovima socijalne izolacije tokom rane adolescencije. Dodatno, izolovane jedinke su pokazale prisustvo i *apetitivne* i *konzumatorne* komponente socijabilnosti, bez obzira na uzrast. Ovi rezultati ukazuju da *apetitivna* komponenta preferiranja socijalnog prostora nije nužno odrednica ponašanja životinje unutar ovog prostora, te stoga parametre prilaska praznoj komori i životinji unutar iste komore ne treba poistovetiti. Razdvajanje ove dve aktivnosti bi dalo potpuniju sliku o ulozi socijalne orijentacije u razumevanju socijalnog prilagođavanja (Jorgensen, Nelson, 2018) ako se uzme u obzir da ispitivana životinja mora prvo da pristupi socijalnom prostoru i tek onda da, shodno motivisanosti, priđe ili izbegne direktan socijalan kontakt sa jedinkom unutar tog prostora.

Povećana *apetitivna* motivacija ka socijalnom prostoru kod socijalno izolovanih pacova tokom rane adolescencije može se posmatrati kao deo aktivnog učenja o poziciji socijalnog prostora u ukupnom prostoru za istraživanje, a koji poseduje nagrađujući sadržaj za ove životinje - poznatu jedinku „*prijatelja*”. Ovaj parametar nije rezultat opšte povećane lokomotorne aktivnosti ispitivanih jedinki, jer je broj prilaza socijalnoj u odnosu na nesocijalnu komoru bio približno ujednačen kod svih testiranih životinja. Činjenicu da pacovi gajeni u uslovima socijalne izolacije tokom perioda rane adolescencije *apetitivno* uče o poziciji socijalnog unutar fizičkog prostora potvrđuje i njihovo ponašanje tokom test-faze preferiranja socijalne novine, kada im se ponudi nova životinja istog pola i starosti, tokom koje one i dalje pokazuju preferencu socijalnog prostora sa prvoponudenom, poznatom životinjom, ali ne pokazuju preferencu prema samoj životinji. Dakle, može se pretpostaviti da pacovima socijalno izolovanim tokom rane adolescencije prva prezentovana, nova jedinka predstavlja nagrađujući stimulus tj. stimulus koji izaziva odgovor „svidanja”, kao i posledične „želje” te dolazi do intenzivnog usmeravanja pažnje ka tom stimulusu (Madan, 2017; Tibboel, Liefooghe, 2020), jer nagrade koje se „sviđaju” se obično i „žele” (Berridge i sar., 2009). Na taj način se favorizuje memorisanje socijalnog u fizičkom prostoru.

Važno je napomenuti da se životinje koje se prezentuju eksperimentalnim jedinkama u Trokomornom testu nalaze u žičanim kavezima, te je socijalni kontakt ograničen i odvija se samo njuškom i šapicama. Imajući ovo u vidu, kao i činjenicu da se tokom maturacije od 28. do 40. postnatalnog dana (Vanderschuren i sar., 2016) razvija specifična forma socijalnog kontakta, socijalno igranje kroz imitiranje borbe (engl. *play fighting*) naročito kod mužjaka pacova, odsustvo *apetitivne* komponente preferiranja socijalnog prostora kod jedinki u periodu srednje adolescencije može biti posledica tehničkog koncepta testa, koji ne nudi aktivnu igru kao nagrađujući stimulus. Ne treba zanemariti činjenicu da različiti aspekti socijalne interakcije imaju drugačiji nagrađujući efekat tokom maturacije, stoga socijalna deprivacija u srednjoj adolescentnoj fazi i odsustvo zadovoljstva uzrokovanog socijalnim interakcijama dovode do toga da se jedinka i ne trudi da memoriše lokaciju socijalnog prostora.

5.4.2. Socijalni odgovor na prisustvo živih jedinki - preferenca socijalne novine kao indikator socijalne memorije

Preferenca socijalne novine je prirodna tendencija glodara (Schweinfurth, 2020), dok se njeno odsustvo interpretira kao narušena kognicija (Moy i sar., 2004). Pojedini autori dovode u pitanje ovakvu interpretaciju rezultata ukazujući na važnost naklonosti životinje ka poznatim jedinkama i na činjenicu da odsustvo preference socijalne novine u socijalnim testovima može predstavljati promišljen izbor zarad zadovoljavanja osnovnih potreba za pripadnošću (Ennaceur, 2010). Ovakav izbor postoji kod individua sa atipičnim socijalnim razvojem (Chen i sar., 2015). Prema teoriji afektivne vezanosti preferenca poznatog se može smatrati značajnim motivacionim mehanizmom koji

je u osnovi formiranja memorije i sklonosti ka pripadnicima svoje, odnosno poznate grupe (Van Bavel i sar., 2012). Treba naglasiti da uticaj motivacije na kogniciju još nije dovoljno istražen (Madan, 2017).

Ova studija je doprinela razumevanju značaja pripadnosti vršnjačkoj grupi tokom peripuberteta/adolescencije za socijalno ponašanje jedinke. Činjenica da životinje u periodu rane adolescencije nisu pokazivale preferencu ka socijalnoj novini, bez obzira na to da li su gajene izolovano ili grupno, ukazuje da socijalna memorija u ovom periodu još nije u potpunosti formirana. Ovaj rezultat je u skladu sa novim istraživanjima koja ukazuju da socijalna memorija glodara sazreva tokom srednje ka kasnoj adolescentnoj fazi i omogućava adekvatno socijalno učenje (Domínguez i sar., 2019). Interesantno je napomenuti da je nedostatak socijalne memorije pacova u periodu rane adolescencije specifičan i da životinje u ovom periodu imaju sposobnost da nauče druge paradigme, kao što je habituacija na novu sredinu i prepoznavanje novog objekta (Pavkovic i sar., 2018; Potřebić i sar., 2021), funkcije zavisne od aktivnosti hipokampusa, ali ne i CA2 subregiona (Domínguez i sar., 2019). Ova studija je pokazala da je mlada jedinka gajena u uslovima koji zadovoljavaju njene socijalne potrebe za kontaktima i igrom, u periodu rane adolescencije, znatiželjna i podjednako zainteresovana i za socijalnu i nesocijalnu novinu, te ne pokazuje izrazitu preferencu za novi socijalni kontakt u odnosu na poznati. Apetitivna komponenta socijabilnosti javlja se zajedno sa socijalnom memorijom, u periodu srednje adolescencije, ukazujući da u ovoj fazi maturacije individualni odnos prema socijalnom okruženju počinje da se menja. Preferenca socijalnog kontakta u odnosu na nesocijalni javlja se jedino kod rano adolescentnih socijalno izolovanih mužjaka pacova, kojima osnovne potrebe za pripadnošću vršnjačkoj grupi nisu zadovoljene. Takođe, nezadovoljene socijalne potrebe kod jedinki gajenih u uslovima socijalne izolacije u fazi srednje adolescencije rezultuju neadekvatnim odgovorom na socijalnu novinu tj. suprimiranjem motivisanog ponašanja ka socijalnoj novini kao razvojno regulisanom obliku ponašanja.

Korišćenjem animalnog modela pogodnog za ispitivanje socijalnog ponašanja ova studija je ukazala na prioritet društvenih potreba u adolescenciji, odnosno da je za postojanje motivisanog ponašanja ka socijalnoj novini neophodno da su prethodno zadovoljene potrebe pripadnosti vršnjačkoj grupi, što je od izuzetne važnosti za bolje razumevanje osnovnih bioloških principa socijalne kognicije kod socijalnih sisara (Potřebić i sar., 2022a).

Rezultati ove studije su u skladu sa retkim kliničkim studijama koje ukazuju da se socijalno prepoznavanje, percepcija identiteta i socijalna kognicija formiraju tek tokom srednje adolescentne faze, tj. između 14. i 17. godine života (Fuhrmann i sar., 2016). Takođe, ljudi postaju ekstravertniji i emotivno stabilniji tokom maturacije od detinjstva ka adultnom dobu, što ih čini spremnijim za socijalno angažovanje i investiranje u socijalne veze (Klimstra i sar., 2009; Gunther Moor i sar., 2010). Rezultati ove studije su i u skladu sa istraživanjem koje ukazuje da tokom adolescencije socijabilnost ima oblik U-krive i najniža je u periodu rane adolescencije, što autori studije tumače specifičnom društvenom sklonošću adolescenata prema vršnjacima, a ne uopšteno prema socijalnom kontekstu i drugim uzrasnim kategorijama (Dubey i sar., 2017). Pitanje uticaja prethodnog socijalnog iskustva na različite aspekte socijalnog ponašanja u periodu adolescencije veoma je aktuelno u kliničkim istraživanjima, koja pokušavaju da daju odgovor na izražajno senzacionalističko i rizično ponašanje u ovom razvojnom periodu. Kao faktori od značaja prepoznati su rana adolescencija (Crone, Dahl, 2012) i muški pol (Defoe i sar., 2020). Smatra se da je motivaciono „uzbuđenje” usled prisustva vršnjaka intenzivnije kod osoba koje su rasle u sredini koja nije zadovoljila njihove socijalne potrebe, posebno tokom rane adolescencije. U prilog ovakvoj pretpostavci idu i podaci da socijalna izolacija povećava želju za socijalnom interakcijom i da se u prisustvu socijalnih stimulusa intenzivira aktivnost delova mozga koji regulišu ponašanje motivisano nagradom, a umanjuje sposobnost samokontrole u prisustvu vršnjaka (Albert i sar., 2013; Tomova i sar., 2020). Nezadovoljene potrebe za pripadnošću i osećajem vrednosti u socijalnoj zajednici smatraju se glavnim uzročnikom devijantnog ponašanja adolescenata i okretanja ka društveno-neprihvatljivim grupama, koje im nude zadovoljenje tih potreba (Woo i sar., 2015).

5.4.3. Socijalni odgovor na prisustvo socijalnih mirisa

Socijalni mirisi kod glodara, kao vid i kontakt očima kod ljudi (Kampe i sar., 2001), predstavljaju socijalno relevantni stimulus od velike važnosti za procesuiranje informacija iz okruženja i prilaženje stimulusima koje životinja proceni kao relevantne (Contestabile i sar., 2021). Socijalno prepoznavanje se zasniva na integraciji informacija koje detektuju i druge čulne ćelije, osim olfaktornih, kao što su fotoreceptorske i fonoreceptorske, a nova istraživanja ukazuju i na značaj aktivnosti socijalnog stimulusa, odnosno žive jedinke u testu prepoznavanja, jer eksperimentalne životinje ne pokazuju preveliko interesovanje za anestetizirane životinje (de la Zerda i sar., 2022). Međutim, dosadašnja istraživanja na glodarima se nisu bavila pitanjem značaja socijalnih mirisa za socijalno ponašanje mladih jedinki tokom sazrevanja u animalnim modelima. Ove informacije bile bi od značaja za razumevanje patologije psihijatrijskih poremećaja vezanih za aberantno socijalno ponašanje, kao što je autistični spektar poremećaja, gde je narušeno procesuiranje senzornih stimulusa jedan od ključnih aspekata bolesti (Crane i sar., 2009).

Rezultati ove doktorske teze daju značajan doprinos razumevanju uloge socijalnih mirisa u motivisanom socijalnom ponašanju glodara tokom peripuberteta.

Detekcija socijalnih mirisa, kao i konzumatorni aspekt preference socijalnog mirisa je uočen kod obe starosne grupe pacova gajenih u grupi. Ovaj rezultat može ukazati da je odsustvo socijalnosti rano adolescentnih grupno gajenih životinja u Trokomornom testu posledica nedostatka zainteresovanosti za socijalni stimulus, a ne nemogućnosti detekcije socijalnog mirisa testiranih životinja. Pored toga, ove životinje su imale i potpunu preferencu (i *apetitivnu* i *konzumatornu* komponentu) ka novom socijalnom mirisu, dok je u Trokomornom testu ova preferenca odsustvovala. Sa druge strane, srednje adolescentne grupno gajene životinje nisu preferirale novi socijalni miris, ali su preferirale novu jedinku u Trokomornom testu. Ovi rezultati mogu ukazati da tokom razvoja glodara formiranje socijalne kognicije nije samo zasnovano na sposobnosti detekcije i diskriminacije socijalnih mirisa, kao i da je za socijalno raspoznavanje neophodna integracija više čula.

Reakcija na prvoprezentovani socijalni miris kod jedinki gajenih u uslovima socijalne izolacije ogledala se i kroz *apetitivnu* i *konzumatornu* komponentu, dok su u prisustvu novog socijalnog mirisa jedinke pokazale nedostatak *apetitivne komponente odgovora*. U skladu sa prethodno pomenutim rezultatima i ovi eksperimenti su pokazali da narušeno društveno okruženje utiče na *apetitivnu* komponentu ponašanja.

Poređenje rezultata dobijenih u odgovoru peripubertetskih pacova na socijalne mirise i žive životinje ukazalo je na veoma važnu činjenicu u metodološkom smislu, a to je da odgovor na socijalne mirise ne treba da bude korišćen kao indikator socijalnosti i socijalne memorije, kao što je slučaj u nekim studijama (Jones i sar., 2019), jer se na osnovu dobijenih rezultata može doći do pogrešnih zaključaka.

5.5. Uticaj socijalne izolacije na broj parvalbumin-pozitivnih interneurona i aktivacioni fenotip mikroglijskih ćelija hipokampusa

Poznato je da je adolescencija period koga karakteriše izuzetna plastičnost centralnog nervnog sistema i velika osetljivost na stimuluse iz spoljašnje sredine koji su istovremeno i neophodni za pravilnu maturaciju nervnog sistema (Fuhrmann i sar., 2015). Stoga je neuralna plastičnost tokom adolescencije izrazito zavisna od iskustva koje organizam očekuje kao neophodnu komponentu razvojnog procesa (engl. *experience-expectant maturation*, Fuhrmann i sar., 2015). Međutim, tačna regulatorna uloga sredinskih stimulusa, uključujući socijalni, nije do kraja razjašnjena. Studije koje donose odgovor na pitanja iz ove oblasti uglavnom se, kao i ova studija, baziraju na uskraćivanju određenog sredinskog faktora mladoj jedinki i praćenju posledica na različitim funkcionalnim nivoima.

Nova istraživanja ukazuju da PVI, koji predstavljaju glavni tip inhibitornih neurona u mozgu, „zahtevaju” postojanje socijalnog iskustva tokom juvenilnog perioda da bi se uspostavilo normalno/pravilno socijalno ponašanje u adultnom periodu i pravilna funkcija PVI u kori velikog mozga (Bicks i sar., 2020). Takođe, pokazano je da je GABA sistem hipokampusa veoma osetljiv na

hronični stres, kao i da je narušeno funkcionisanje PVI povezano sa različitim poremećajima raspoloženja (Brambilla i sar., 2003; Grønli i sar., 2007; Filipović i sar., 2013; Zaletel, 2016). Hronični stres takođe pospešuje i inflamaciju, a za mnoga psihijatrijska oboljenja se smatra da je neuroinflamacija značajan faktor u etiologiji bolesti (Weber i sar., 2017), kao što je depresija (Hassamal, 2023).

5.5.1. Uticaj socijalne izolacije na broj parvalbumin-pozitivnih interneurona u hipokampusu

Studije na adultnim životinjama ukazuju da socijalna izolacija smanjuje broj parvalbumin pozitivnih (PV⁺) interneurona u subregionima hipokampusa (Filipović i sar., 2013; Filipović i sar., 2017), koji je od velike važnosti za mapiranje socijalnog prostora (fizički prostor koji sarži socijalni stimulus, Schafer, Schiller, 2018; Leblanc, Ramirez, 2020). Međutim, ni u jednoj studiji nije ispitivano kako se PV interneuroni unutar hipokampusa menjaju tokom adolescencije, kako reaguju na uslove socijalne izolacije i da li te promene mogu uticati na različite aspekte motivisanog socijalnog ponašanja kod adolescentnih glodara.

U ovoj studiji pokazano je da socijalna izolacija u toku rane adolescencije smanjuje broj PV⁺ interneurona jedino u dentatnom girusu. Iako se zna da su PVI izuzetno osetljivi na stres (Filipović i sar., 2013, Czéh i sar., 2015) treba napomenuti da je bazalni nivo kortikosterona kod socijalno izolovanih jedinki bio sličan vrednostima izmerenim u krvi kontrolnih životinja (Potrebić i sar., 2021). Studije na adultnim jedinkama su takođe pokazale da socijalna izolacija dovodi do smanjenja broja PV⁺ interneurona u hipokampusu u uslovima niskog nivoa serumskog kortikosterona, ukazujući da je socijalna izolacija po sebi dovoljna da izazove pad u broju PV⁺ interneurona (Filipović i sar., 2013; Filipović i sar., 2017).

Dentatni girus ima važnu ulogu u memorijskim procesima značajnim za uočavanje novog i stvaranje memorije vezanog za novo sa minimalnim preklapanjem sa već postojećim memorijskim tragovima/engramima (eng. *pattern separation, completion*), te je u nekim studijama označen i kao detektor različitosti (Gómez-Ocádiz i sar., 2022). Takođe, dentatni girus je od velikog značaja za radnu memoriju (Hainmueller, Bartos, 2020) i povezivanje senzornih informacija sa prostornim kontekstom (Lee, Jung, 2017). Imajući u vidu da su samo jedinke gajene u uslovima socijalne izolacije tokom rane adolescencije u Trokomornom testu pokazale *apetitivno* učenje socijalnog prostora imale i smanjen broj PV⁺ interneurona u dentatnom girusu, može se pretpostaviti da je smanjenje broja PV⁺ interneurona u dentatnom girusu deo neuromodulatornog mehanizma koji leži u osnovi pristrasnog pamćenja socijalnog prostora, tj. neurotransmisije koja omogućava motivaciji da upravlja kognicijom (engl. *motivated cognition*, Kennedy, Shapiro, 2009; Madan, 2017; Kassab, Alexandre, 2018). Parvalbumin pripada unutarćelijskim proteinima koji su važni u procesu vezivanja unutarćelijskih jona kalcijuma i učestvuje u procesu regulacije unutrašnje ekscitabilnosti neurona koji ga eksprimiraju (Filice i sar., 2020). Sa funkcijskog aspekta, smanjena ekspresija parvalbumina u interneuronima (koja se ogleda u smanjenom broju PV⁺ interneurona) bi posledično dovodila do povećane aktivnosti samih PV interneurona, a s obzirom da su oni inhibitorni i do smanjene aktivnosti dentatnog girusa (Schwaller, 2012; Filice i sar., 2016; Filice i sar., 2020). Druge studije su pokazale da je smanjena aktivnost dentatnog girusa povezana sa motivisanom kognicijom: u uslovima kada su aktivirani projekcioni dopaminski neuroni srednjeg mozga (aktiviraju se u odgovoru na nagrađujuće stimulse) dolazi do dugotrajne depresije ekscitatornih stimulusa koji u dentatni girus dolaze iz korteksa, usled čega slabi kontekstualno učenje, a favorizuje se memorija na nagrađujući stimulus i prostor vezan za njega (Du i sar., 2016). Da socijalna izolacija doprinosi redukovanoj ekscitabilnosti granularnih ćelija dentatnog girusa pokazano je u studiji na adolescentnim C57BL/6J miševima koji su nakon odvajanja od majke (21. postnatalni dan) 6 nedelja živeli socijalno izolovani (Talani i sar., 2016), ali nije rađena ponašajna karakterizacija modela.

Iako ovaj deo studije zahteva dodatna istraživanja, rezultati idu u prilog važnosti socijalnog iskustva za funkcionisanje PVI u mozgu pacova u razvoju, ukazujući da je rana adolescencija posebno osetljiv period i dodatno naglašavajući da dentatni girus predstavlja deo moždanih regiona osetljivih na socijalno iskustvo. Dodatno, ova studija je pokazala po prvi put da se broj PV⁺ povećava u CA3

subregionu dorzalnog hipokampusa od rane ka srednjoj adolescenciji, nezavisno od društvenog okruženja. Ovaj rezultat je u skladu sa drugim studijama koje ukazuju da je hipokampus region koga odlikuje produžena maturacija (Keresztes i sar., 2018).

5.5.2. Uticaj socijalne izolacije na aktivacioni fenotip mikroglijskih ćelija dentatnog girusa

Studije na životinjama i ljudima ukazuju da određeni imunomodulatori mogu uticati na način na koji mozak obrađuje informaciju i na koju odgovora (Dantzer i sar., 2008). Izlaganje stresu dovodi do aktivacije mikroglijskih ćelija, imunskih ćelija CNS-a, koje dalje dovode do regrutovanja perifernih inflamatornih modulatora do mozga, doprinoseći formiranju anksioznih i depresivnih oblika ponašanja (Wohleb, Delpach, 2017). Poznato je da izlaganje stresoru dovodi do značajnog strukturnog i funkcijskog remodelovanja mikroglijskih ćelija, što je povezano sa njihovom aktivacijom i oslobađanjem proinflamatornih citokina (Walker i sar., 2013). Od različitih metoda koji se koriste za određivanje aktivacionog statusa mikroglije, detaljna analiza njene morfologije se smatra najsenzitivnijom (Wittekindt, Kaddatz, 2022).

Detaljna morfološka analiza mikroglijskih ćelija, rađena je metodom Young i Morrison (2018) primenom parametara fraktalne analize koja obuhvata površinu, obim, cirkularnost, fraktalnu dimenziju, lakunarnost, opseg rasprostranjenja i gustinu, kao i skeletonizacije koja podrazumeva analizu ukupanog broja mikroglijskih nastavaka (grana), prosečnu i maksimalnu dužinu grane, broj mesta grananja, veličinu mesta grananja, dužinu grane između 2 tačke grananja, broj završetaka grana, kao i broj trostrukih i četvorostrukih grananja. Jedini parametar koji se značajno menjao je smanjenje gustine mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu dorzalnog hipokampusa životinja gajenih u izolaciji tokom rane adolescencije u poređenju sa grupno gajenim jedinkama iste starosti. S obzirom da se ovaj parametar dobija deljenjem površine ćelije sa njenim opsegom rasprostranjenja, smanjena vrednost ovog parametra može ukazati na manju kompaktnost ćelija, koja se može smatrati indikatorom tranzicije mikroglije iz mirujućeg u aktivno stanje.

Mikroglija je prisutna u svim delovima mozga, ali nije potpuno jasno da li možda ima različitu ulogu u različitim regionima (Lawson i sar., 1990). Naime, nova studija je ukazala da ćelije mikroglije izolovane iz kore velikog mozga, strijatuma, hipokampusa i malog mozga imaju različite obrasce ekspresije gena (Grabert, Michoel, 2016). Takođe, odgovor ovih ćelija na stresore je region-specifičan, kao i same promene unutar regiona, pa se u nekim regionima može menjati broj, dok se u drugim regionima može menjati veličina i oblik mikroglijskih ćelija (Tynan i sar., 2010). Da li ovakve promene nastaju kao rezultat različite osetljivosti mikroglijskih ćelija u različitim regionima mozga na isti sistemski stimulus ili ove ćelije imaju specifičan vremenski okvir unutar koga se morfološki menjaju još nije poznato.

Mnoge studije ukazuju da narušeno funkcionisanje HPA osovine i balansa između proinflamatornog i antiinflamatornog odgovora predstavljaju dva glavna patofiziološka mehanizma odgovorna za etiologiju depresije (Lamers i sar., 2013). U ovoj studiji dektovano je smanjenje gustine mikroglijskih ćelija u grupi rano adolescentnih socijalno izolovanih životinja, bez značajnih promena u koncentraciji kortikosterona u plazmi. Smanjenje gustine mikroglijskih ćelija se može smatrati indikatorom njihove aktivacije i indirektno ukazivati na povećanu aktivnost proinflamatornog odgovora. Kliničke studije ukazuju da je povećani nivo inflamatornih markera u krvi karakterističan za osobe sa atipičnom depresijom u odnosu na pacijente sa melanholičnim podtipom depresije i zdravim ispitanicima (Lamers i sar., 2013). Međutim, imajući u vidu da su parametri dobijeni iz periferne krvi pacijenata, ne mogu se sa sigurnošću povezivati sa aktivacionim statusom mikroglije u mozgu, jer mogu obuhvatati i periferni inflamatorni odgovor.

Aktivirana mikroglija ne mora nužno imati neurotoksično, već može imati i neuroprotektivno dejstvo, te je pitanje da li njenu aktivnost treba tumačiti kao pravu inflamaciju ili hemostatsku adaptivnu funkciju. Naime, mikroglijske ćelije su odgovorne za sintezu kako proinflamatornih, tako i antiinflamatornih citokina, faktora rasta, medijatora tkivne homeostaze, reparacije i remodelovanja (Shao i sar., 2022). U tom smislu, smanjene gustine mikroglijskih ćelija bi kod životinja gajenih u izolaciji tokom rane adolescencije moglo predstavljati adaptivnu strategiju odbrane organizma od

stresa. Imajući u vidu da je status ćelija mikroglije *in vivo* veoma komplikovan i može uključivati spektar različitih, ali funkcionalno preklapajućih fenotipova, može se očekivati da održanje ravnoteže između fenotipski različitih mikroglijskih ćelija, a ne generalna supresija mikroglijske aktivnosti bude u fokusu novih imunomodulatornih terapija (Shao i sar., 2022).

Smanjena gustina mikroglijskih ćelija kod životinja gajenih u izolaciji tokom rane adolescencije je pokazala prolazni karakter, jer nije primećena kod srednje adolescentnih socijalno izolovanih životinja. To se može objasniti habituacijom, odnosno prilagođavanjem na hronično izlaganje stresu izolacije kod ovih životinja, što je fenomenološki već opisano u literaturi tj. smanjenim odgovorom organizma na dati stresor (Rankin i sar., 2009). S obzirom da drugi moždani regioni nisu analizirani ovakva pretpostavka se ne može generalizovati jer, kao što je prethodno napomenuto, treba imati u vidu regionalno-specifične karakteristike odgovora mikroglijskih ćelija na stresor.

5.6. Uticaj društvenog okruženja i prekonocnog gladovanja na antioksidativni status perifernih organa, biohemijskih parametara krvi i telesnu masu peripubertetskih mužjaka pacova

5.6.1. *Uticaj društvenog okruženja na antioksidativni status perifernih organa peripubertetskih pacova*

Oksidativni stres povećava rizik za nastanak različitih poremećaja raspoloženja što se objašnjava posebnom osetljivošću nervnog sistema na oksidativna oštećenja izazvana narušenom ravnotežom između formiranja slobodnih vrsta kiseonika i njihovog uklanjanja (Halliwell, 2006; Ng i sar., 2008; Scapagnini i sar., 2012; Siwek i sar., 2013).

Pokazano je da socijalna izolacija izaziva oštećenja CNS-a snižavajući aktivnost antioksidativnih enzima i indukujući oksidativni stres, za koji je utvrđeno da doprinosi patogenezi ponašanja sličnih depresiji (Zlatković i sar., 2014). Međutim, promene u aktivnosti antioksidativnih enzima u perifernim organima izazvane socijalnim stresom su još uvek neistražene. Dublje poznavanje promena u antioksidativnom odbrambenom sistemu različitih organa jednog organizma u nametnutim uslovima stresa predstavlja važan aspekt u sveobuhvatnoj proceni sistemskih efekata psihosocijalnog stresa. Ovakav pristup je od posebnog značaja imajući u vidu da je uticaj stresa na aktivnost antioksidativnih enzima različit u različitim organima (Oishi, Machida, 2002).

Ovom studijom je po prvi put skrenuta pažnja da socijalno okruženje u adolescenciji utiče na oksidativni status perifernih organa, kao i da socijalno okruženje ima ulogu u odgovoru enzima antioksidativne zaštite u perifernim organima na dodatni, akutni stresor. Dobijeni rezultati su ukazali da se uticaj društvenog okruženja iskazuje selektivno, kako u pogledu organa, tako i u pogledu ciljnog enzima i faze maturacije tokom koje se promene u socijalnom okruženju dešavaju.

Društveno okruženje nije značajno uticalo na promenu aktivnosti katalaza (KAT) i glutacion reduktaza (GR) u svim ispitivanim tkivima rano i srednje adolescentnih peripubertetskih pacova, bez obzira na trajanje socijalne izolacije. Odsustvo promena u aktivnosti KAT ukazuje da produkcija H₂O₂ u uslovima socijalne izolacije nije intenzivna, tj. nije u opsegu neophodnom za aktivaciju KAT (Rajendran i sar., 2014). Takođe, imajući u vidu da je GR jedan od ključnih enzima zaduženih za održavanje glutaciona u redukovanoj formi (GSH) koji reguliše aktivnost glutacion peroksidaze (GSH-Px) (Rajendran i sar., 2014), to indirektno ukazuje da promene u aktivnosti GSH-Px, koje će biti diskutovane u daljem tekstu, nisu *a priori* posledica promena u koncentraciji GSH.

5.6.1.1. Efekat socijalnog okruženja na aktivnosti enzima antioksidativne zaštite - eritrociti i srce

Dvonedeljna socijalna izolacija je dovela do povećanja aktivnosti ukupne SOD i SOD1 u srcu kao i SOD1 i GSH-Px u eritrocitima srednje adolescentnih peripubertetskih pacova. Socijalna izolacija, sama ili u kombinaciji sa gladovanjem kod rano adolescentnih pacova ne dovodi do promene pomenutih parametara. Ovakav rezultat postavlja pitanje da li je dužina izolacije u trajanju od dve nedelje ili specifičan razvojni period (peripubertet) doprineo efektu. U postojećem eksperimentalnom dizajnu to je nemoguće razlučiti, jer mladi pacovi maturiraju u zadatim socijalnim

uslovima, što doprinosi „2 u 1” efektu. Ipak, dobijeni rezultati po prvi put ukazuju da socijalna izolacija menja aktivnost/aktivaciju SOD1 u srcu i eritrocitima. Izraženija aktivacija SOD1 ukazuje na porast superoksida u sistemu, čijim uklanjanjem nastaje H₂O₂ (Baud i sar., 2004) te bi, shodno rezultatima ove studije, jedan od efekata trebao da bude i značajno povećanje aktivnosti enzima osetljivih na povećanu produkciju H₂O₂, na prvom mestu GSH-Px, što se i dešava u eritrocitima (dve nedelje gajenja u uslovima socijalne izolacije povećava aktivnost GSH-Px u eritrocitima peripubertetskih pacova koji nisu gladovali). GSH-Px predstavlja jedan od glavnih antioksidativnih enzima u organizmu (Vaváková, Ďuračková, 2015), a izmenjene aktivnosti ovog enzima u krvi su primećene kod osoba sa različitim poremećajima raspoloženja. Narušena aktivnost ovog enzima (povišena ili smanjena) može dovesti do akumulacije reaktivnih oblika kiseonika koje su u negativnoj korelaciji sa težinom kliničke slike depresije i njenih simptoma (Vaváková, Ďuračková, 2015). Prisustvo traume u ranom detinjstvu može dovesti do visokih koncentracija ovog enzima u krvi, koje se povezuju sa težom kliničkom slikom psihoza (Alameda i sar., 2018). Sa druge strane, odsustvo promene u aktivnosti GSH-Px u srcu može se objasniti izuzetno blagim povećanjem aktivnosti ukupne SOD i SOD1, te odsustvom značajnih razlika u aktivnosti ovog enzima između ispitivanih grupa (*post hoc* komparacije bez značajnosti). U prilog činjenici da se sistemski efekat socijalne izolacije može proceniti praćenjem promene aktivnosti SOD1 idu istraživanja koje ukazuju da malondialdehid, GSH, SOD, KAT, GSH-Px, vitamini C i E mereni u krvi adekvatno oslikavaju redoks status u tkivima (Margaritelis i sar., 2015; Veskokis i sar., 2009).

Rezultati ove studije su takođe pokazali da socijalna izolacija u peripubertetu ne utiče na promenu aktivnosti GSH-Px u eritrocitima u odgovoru na dodatni stresor prekonocnog gladovanja. Razlika u aktivnosti ovog enzima uočena između grupno gajenih i životinja gajenih u izolaciji se gubi kada se životinje podvrgnu dodatnom stresoru prekonocnog gladovanja. Ostaje da se ispita da li bi aktivnost GSH-Px u eritrocitima životinja gajenih grupno ili u izolaciji bila u istom opsegu i kada bi dodatni stresor bio drugog tipa npr. psihološki. Interesantno je napomenuti da se prekonocno gladovanje nije pokazalo kao značajni faktor u analizi ukupne SOD u eritrocitima, te je ukupna SOD u eritrocitima pokazivala znatno veću aktivnost kod izolovanih u poređenju sa grupno gajenim životinjama, bez obzira da li je dodatni fiziološki stresor bio prisutan ili ne. Jedini enzim kod koga nije primećena izmenjena aktivnost u odgovoru na prekonocno gladovanje jeste SOD1 eritrocita, usled čega promene u aktivnosti ovog enzima mogu predstavljati potencijalni biomarker hroničnog stresa socijalne izolacije. Novija istraživanja ukazuju da pogoršanje kliničke slike depresije kod dece i adolescenata prati značajno visoka aktivnost SOD u krvi (Miniksar, Göçmen, 2022), kao i da se parametar aktivnosti enzima SOD može smatrati jednim od potencijalnih biomarkera ovog patološkog stanja.

5.6.1.2. Efekat socijalnog okruženja na aktivnost enzima antioksidativne zaštite - metabolički organi i testisi

Jetra i bubrezi su organi koji imaju važne uloge u procesiranju i eliminaciji toksina, lekova i drugih metaboličkih proizvoda zbog čega su izloženi visokom nivou oksidativnog stresa. Enzimaska oksidativna zaštita posebno je važna kako bi se očuvala njihova funkcionalnost, pa je efekat socijalnog okruženja na aktivnost enzima antioksidativne zaštite bio procenjivan ispitivanjem ova dva organa.

Rezultati su pokazali da društveno okruženje kao faktor utiče značajno jedino na promenu aktivnosti MnSOD (SOD2) u jetri i to samo pacova rano adolescentne grupe, dok se ovaj efekat gubi u jetri srednje adolescentnih pacova. Rezultati su takođe ukazali da je gladovanje povećalo aktivnost samo kod grupno gajenih dok je kod socijalno izolovanih jedinki aktivnost ovog enzima bila smanjena što ukazuje da socijalna izolacija značajno smanjuje potencijal SOD2 u jetri ispitivanih jedinki da odgovore na dodatni, fiziološki stresor. Izostanak efekta u jetri srednje adolescentnih pacova ukazuje na starosnu zavisnost aktivnosti SOD2 u jetri u odgovoru na socijalni stres i takođe naglašava selektivnu osetljivost SOD2 u poređenju sa SOD1 na socijalni stres.

U bubregu socijalna izolacija nije uticala na aktivnost ni jednog ispitivanog enzima osim SOD2 čija se aktivnost smanjivala nakon izolacije. Aktivnost GSH-Px, ukupne SOD, SOD1 i SOD2 se povećala u bubregu izolovanih pacova nakon izlaganja prekonocnom gladovanju. U tkivu bubrega izoforme SOD enzima imaju različitu ulogu u pogoršanju ili ublaživanju različitih bolesti ovog organa. Iako se smatra da SOD1 izoforma ima najveću antioksidativnu aktivnost u bubregu, disfunkcija SOD2 izoforme se povezuje sa ozbiljnijim patološkim promenama, poput akutne bubrežne insuficijencije i hronične bolesti bubrega (Ratliff i sar., 2016; Kitada i sar., 2020). Smanjena aktivnost SOD2 može dovesti do povećane količine $O_2^{\cdot-}$ u mitohondrijama, koja za posledicu može imati nepravilno funkcionisanje ovih organela (Sharma, 2017; Forbes, Thorburn, 2018).

Smanjenje aktivnosti SOD2 u jetri i bubrezima izolovanih pacova može se smatrati efektom socijalnog stresa na mitohondrijsku ROS homeostazu. Obzirom da SOD2 katalizuje dismutaciju $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 uz produkciju O_2 u matriksu i međumembranskom prostoru mitohondrija i ima važnu ulogu u mitohondrijskoj ROS detoksikaciji (Kitada i sar., 2020), izmenjena ekspresija ili aktivnost SOD2 ima neizbežni efekat na funkciju mitohondrija i može biti uzrok razvoja raznih bolesti (Miao, St Clair, 2009). Uzevši u obzir da je pravilno funkcionisanje SOD2 enzima neophodno za preživaljavanje aerobnih organizama i da njegov nedostatak dovodi do smrti organizma usled dilatirane kardiomiopatije i pojave neurodegeneracije (Li i sar., 1995; Lebovitz i sar., 1996), narušeno funkcionisanje ovog enzima se dovodi u vezu sa pojavom kardiovaskularnih bolesti i različitih neurodegenerativnih oboljenja. Takođe, povećan oksidativni stres i relativno smanjena aktivnost SOD2 enzima dovode do oštećenja DNK i samih ćelija, što je primećeno u početnim stadijumima kancera (Miao, St Clair, 2009).

Ova studija je pokazala da se promena aktivnosti SOD2 usled socijalne izolacije prvo uočava u jetri, nakon jedne nedelje gajenja u izolaciji i da je značajno spregnuta sa gladovanjem, što ukazuje na specifične metaboličke zahteve rane adolescentne faze. Tome u prilog govori i podatak da je unos hrane po gramu telesne mase životinja bio najveći u periodu rane adolescencije nakon čega sledi smanjenje.

Prisustvo oksidativnog stresa može dovesti do povećane lipidne peroksidacije ćelijske membrane spermatozoida što za posledicu može imati i redukovanu fluidnost njegove membrane (Sikka, 2001; Parodi, 2014). Pored toga, mobilnost spermatozoida može zavisiti od lipidne peroksidacije i time kompromitovati kapacitet fertilizacije spermatozoida u uslovima oksidativnog stresa (Aitken, 1999), zbog čega antioksidativni defanzivni sistem predstavlja jedan od najvažnijih sistema u testisima, ako se uzme u obzir da se oštećenja koja nastaju usled prisustva oksidativnog stresa smatraju najvažnijim uzročnikom narušenog funkcionisanja testisa (Aitken, Roman, 2008). Međutim, fiziološki nivo reaktivnih oblika kiseonika je neophodan za funkcionisanje spermatozoida, akrozomalnu reakciju, kao i fuziju sa oocitom, usled čega je određeni nivo ovih jedinjenja neophodan za normalno funkcionisanje muškog reproduktivnog sistema (Guesmi i sar., 2016).

Socijalna izolacija je dovela do povećanja aktivnosti samo GSX-Px u testisima rano adolescentskih pacova. Povećana aktivnost GSX-Px u testisima rano adolescentnih pacova izloženih stresoru socijalne izolacije može ukazati na blago povećanu koncentraciju H_2O_2 , ako se uzme u obzir da se eliminacija ovog molekula u testisima predominantno vrši pomoću ovog enzima, a ne katalaze (Peltola i sar., 1992). Izlaganje prekonocnom gladovanju povećalo je aktivnosti GSX-Px i SOD2 u testisima rano adolescentnih izolovanih i grupno gajenih životinja. U testisima srednje adolescentnih pacova gladovanje je značajno smanjilo aktivnost GSH-Px. Prethodne studije su ukazale da povećana lipidna peroksidacija suprimira aktivnost glutation peroksidaze i drugih enzima antioksidativne zaštite (Aitken, Roman, 2008), te bi primećena smanjena aktivnost GSH-Px u testisima srednje adolescentnih pacova mogla da ukaže na prisustvo povećane lipidne peroksidacije u ovom organu, ali bi za ovu tvrdnju bilo neophodno izmeriti i nusprodukte lipidne peroksidacije.

Prethodne studije su pokazale da su promene u ekspresiji i aktivnosti antioksidativnih enzima u testisima regulisane nivoom testosterona u ovim organima (Ghosh i sar., 2002; Zini, Schlegel, 2003). Ako se uzme u obzir da testosteron obično dovodi do povećanja stope metabolizma, može se očekivati da visok nivo ovog hormona može biti uključen u nastanak disbalansa između produkcije ROS i antioksidativne odbrane, dovodeći do povećanog rizika za nastanak oksidativnog stresa.

Nekoliko studija ukazuje da testosteron može indukovati oksidativni stres u tkivu sisara (Buchanan i sar., 2001) mada je u drugim studijama primećeno da ovaj fenomen može biti tkivno-specifičan i da testosteron može imati i antioksidativni efekat, kao na primer unutar centralnog nervnog sistema pacova (Guzmán i sar., 2005).

Međutim, u ovoj studiji nisu uočene promene u nivou cirkulišućeg testosterona u svim ispitivanim grupama. Uočene promene u aktivnosti enzima antioksidativne zaštite nisu značajno narušile reproduktivni potencijal mužjaka, što je utvrđeno praćenjem reproduktivnog potencijala jedinki gajenih u uslovima socijalne izolacije, te u ovoj studiji nije primećena razlika u vremenu začeca ženki parenih sa mužjacima gajenim u različitim socijalnim uslovima. Takođe, mužjaci gajeni u različitim socijalnim uslovima su imali i sličan broja potomaka, a nisu primećene ni razlike u odnosu polova među potomstvom, kao ni njihovim težinama u prvim fazama razvoja.

5.6.1.3. Modulatorni uticaj socijalne sredine na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u uslovima izlaganja dodatnom stresoru

Ova studija je pokazala da socijalni uslovi u kojima jedinka sazreva mogu značajno da utiču na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u uslovima dodatnog stresora, tj. da odsustvo značajnog uticaja faktora „socijalno okruženje” na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u perifernim organima ne znači da on u potpunosti ne postoji, već da je potreban dodatni životni izazov da bi se njegov efekat iskazao. Ova činjenica je veoma važna, jer je u realnim uslovima život jedinke pun nepredvidivih i često stresnih okolnosti.

Negativni modulatorni uticaj socijalnog okruženja na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u perifernim organima ispoljio se kroz aktivnost GSH-Px u testisima jedinki izloženih jednokratnom prekonocnom gladovanju, narušavajući kapacitet enzima GSH-Px da odgovori na dodatne sredinske uslove. Dodatni primeri koje ova studija detektuje odnose se na aktivnost SOD2 u jetri rano adolescentne grupe pacova, pri čemu izolacija takođe prouzrokuje slabiji odgovor enzima na stresor izazvan prekonocnim gladovanjem.

Pozitivni modulatorni uticaj socijalnog okruženja uočen je pri proceni aktivnosti GSH-Px u bubregu rano adolescentne grupe pacova gde je izolacija doprinela povećanom odgovoru ovog enzima na prekonocno gladovanje.

Studija ne ukazuje na aditivne i/ili sinergističke efekte dve ispitivane sredinske okolnosti (hronična socijalna izolacija i akutno gladovanje), jer ni u jednoj od komparacija nije uočeno sumiranje i/ili pojačavanje efekata pojedinačnih stimulusa. Međutim, dva primera koja ukazuju da socijalna izolacija kondicionira aktivnost enzima antioksidativne zaštite u perifernim organima jesu aktivnost SOD2 u bubregu rano adolescentnih jedinki i GSH-Px u eritrocitima srednje adolescentnih jedinki, gde je pokazano da dodatni stresor eliminiše pokazane razlike u aktivnosti ovih enzima uočene između izolovano i grupno gajenih jedinki.

U kontekstu traženja potencijalnog biomarkera socijalnog stresa treba izdvojiti SOD1 u eritrocitima srednje adolescentne grupe pacova - jedini enzim čija je aktivnost bila promenjena/povećana kod izolovanih jedinki u odnosu na grupno gajene jedinke bez obzira da li tretman prekonocnog gladovanja postoji ili ne. Ostaje da se razjasni da li je dužina perioda izolacije ili specifična maturaciona faza značajan faktor za ispoljavanje ovog efekta, što se može razjasniti ispitivanjem grupe koja bi bila gajena u uslovima socijalne izolacije samo tokom perioda srednje adolescencije. Činjenica da su eritrociti lako dostupni iz uzorka krvi daje dodatnu stimulaciju da se aktivnost SOD1 u eritrocitima dodatno ispita, jer je ovakvo uzorkovanje, koje ne šteti zdravlju pacijenta, klinički najpoželjnije.

5.6.2. Biohemijski parametri iz krvi i promene u telesnoj masi

Poznato je da tokom odgovora na stresor dolazi do aktivacije HPA osovine i oslobađanja glukokortikoida iz kore nadbubrežne žlezde. Aktiviranje ove osovine tokom osetljivih faza razvoja može prouzrokovati nastanak različitih poremećaja, u vidu njene trajne nestabilnosti ili disfunkcionalnosti (Tofoli i sar., 2011). Iako je hiperaktivnost HPA osovine u depresiji jedan od

najkonzistentnijih nalaza u psihijatriji, danas se smatra da se hiperkortizolemija može povezati sa specifičnim podtipom depresije - melanholičnom depresijom (povećana senzitivnost HPA osovine i produžen odgovor u prisustvu stresora), dok se hipokortizolemija može povezati sa atipičnom depresijom (neizmenjena ili redukovana aktivnost HPA osovine u bazalnim uslovima, sa nemogućnošću potpune aktivacije u prisustvu stresora, Antonijević, 2006; Gold, Chrousos, 2013; Herane-Vives i sar., 2018; Herane-Vives i sar., 2020).

U rezultatima pretkliničkih studija koje se bave ispitivanjem uticaja socijalnog stresora na bazalni nivo hormona stresa postoji vrlo malo konzistentnosti, pa je tako pokazano da socijalno izolovane životinje mogu imati niži (Serra i sar., 2005; Hermes i sar., 2006; Djordjevic i sar., 2010; Weintraub i sar., 2010; Hawkey i sar., 2012; Raz, 2013), viši (Serra i sar., 2005; Perelló i sar., 2006; Weintraub i sar., 2010; Ferland, Schrader, 2011; Butler i sar., 2014) ili neizmenjen (Weiss i sar., 2004; Scaccianoce i sar., 2006; Toth i sar., 2011; Colaianna i sar., 2013) nivo hormona stresa u odnosu na grupno gajene, kontrolne životinje. Razlog ovakve varijabilnosti je verovatno različitost metodoloških faktora koji se moraju uzeti u obzir prilikom tumačenja dobijenih rezultata, poput razvojnog perioda kada je socijalna izolacija primenjena, dužine trajanja izolacije, ali i pola i vrste/soja životinja koje se u eksperimentima koriste.

Dobijeni rezultati su pokazali da gajenje peripubertetskih jedinki pacova *Wistar Han* soja u uslovima socijalne izolacije ne utiče na bazalni nivo kortikosterona, te da je on, bez obzira na dužinu gajenja (jedna ili dve nedelje) isti kod izolovanih i grupno gajenih jedinki iste starosti. Kao što je već pomenuto, neizmenjen ili redukovano bazalni nivo hormona stresa (kortikosteron kod glodara, kortizol kod ljudi) opisan je kod pacijenata sa atipičnom depresijom (Butler i sar., 2014).

Jedan od načina da se proceni funkcionalnost HPA osovine je da se životinje izlagane hroničnim stresorima dodatno izlože akutnom stresoru. I povišen i oslabljen odgovor na dodatni stresor ukazuje na problem u funkcionalnosti osovine i sa sobom nosi negativne zdravstvene implikacije (Carroll i sar., 2009; Lovallo, 2013). Ovakve negativne posledice možda ne mogu biti i klinički identifikovane, ali mogu predstavljati potencijalne *endofenotipske markere* podložnosti organizma određenom psihopatološkom stanju (Mello i sar., 2007).

Nekoliko studija na glodarima je ukazalo da hronično izlaganje psihosocijalnom stresoru u ranom periodu života može trajno kompromitovati sposobnost organizma da odgovori na dodatni stresor (Viveros i sar., 1988; Sánchez i sar., 1998; Djordjevic i sar., 2010). Rezultati ove studije su ukazali da socijalna izolacija *per se* nije menjala koncentraciju kortikosterona, kortizola i glukoze u krvi kod ranih i srednje adolescentnih životinja. Međutim, jedinke gajene u uslovima socijalne izolacije tokom perioda rane adolescencije su imale slabiji odgovor na dodatni, akutni stresor prekonocnog gladovanja u odnosu na grupno gajene životinje iste starosti. Takođe, jedinke ove eksperimentalne grupe su pokazivale hiperaktivnost/hiper-reaktivnost na novu sredinu, ispoljavale su ponašanje slično anksioznom i tendenciju ka traženjem senzacija. Dakle, ekstremnije ponašajne promene u odgovoru na novinu (svaki susret sa novinom je sam po sebi stres) su uočene kod životinja koje imaju oslabljeni odgovor HPA osovine na akutni stresor nego kod kontrolnih životinja koje imaju normalno funkcionisanje i odgovor ove osovine (Potrebić i sar., 2021). Klinička istraživanja takođe ukazuju da izlaganje stresoru u ranom periodu života redukuje reaktivnost na dodatne stresore (Lovallo, 2013; Butler i sar., 2014), kao i da je slabiji odgovor pojedinca na stresor povezan sa impulsivnim, senzacionalističkim i rizičnim ponašanjem (Cohen i sar., 2006; Lovallo, 2013). Sličnosti u zapažanjima govore u prilog translacione vrednosti animalnog modela primenjenog u ovoj studiji.

Treba napomenuti da je koncentracija kortikosterona u plazmi srednje adolescentnih grupno gajenih i socijalno izolovanih pacova nakon izlaganja prekonocnom gladovanju bila bez značajnih razlika, što ukazuje da prisustvo hroničnog socijalnog stresa dovodi do habituacije odgovora HPA osovine organizma na dodatni, akutni fiziološki stres.

Poznato je da hronični stres značajno utiče na metabolizam i da se povezuje sa gojaznošću kod ljudi (Bose i sar., 2009). Rezultati ove studije su pokazali da gajenje adolescentnih jedinki u izolaciji ne utiče na prirast mase, jer su ove jedinke imale isti opseg porasta telesne mase kao i kontrolne jedinke, za obe starosne grupe. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih studija

koje su ukazale da socijalna izolacija ne dovodi do promene u telesnoj masi, kao ni konzumiranju hrane (Hellemans i sar., 2004; Fone, Porkess, 2008). Ipak, prekonoćno gladovanje je dovelo do značajnog smanjenja telesne mase kod obe eksperimentalne grupe rano adolescentnih životinja, što nije bio slučaj sa srednje adolescentim jedinkama. Ovo može ukazati da gladovanje preko noći, što je aktivna faza kod glodara, predstavlja veći stres za životinje u ranoj nego u srednjoj adolescentnoj fazi, nezavisno od različitog socijalnog okruženja.

Međutim, analiza koncentracije glukoze u krvi nakon prekonoćnog gladovanja jedinki gajenih u grupi ili izolaciji je ukazala da gajenje u izolaciji tokom rane adolescencije nosi rizik za narušeni metabolizam glukoze (Potrebić i sar., 2021), jer su nakon prekonoćnog gladovanja jedinke gajene u uslovima socijalne izolacije tokom rane adolescencije imale viši nivo glukoze u poređenju sa grupno gajenim kontrolama. Tokom gladovanja inicijalno dolazi do pada nivoa glukoze, kao i povećanja nivoa kortikosterona (Jensen i sar., 2013), što za posledicu ima porast nivoa glukoze u cirkulaciji, jer hormoni stresa pozitivno utiču na hepatičnu glukoneogenezu (Sharabi i sar., 2015). Dakle, povišen nivo glukoze uz smanjen nivo kortikosterona uočava se nakon prekonoćnog gladovanja kod jedinki gajenih u izolaciji tokom rane adolescencije u odnosu na grupno gajene kontrole, kao indikator narušenog metaboličkog stanja koje bez izlaganja dodatnom stresoru ostaje nezapaženo.

Rezultati ove studije su ukazali da nedostatak adekvatne, vršnjačke socijalne sredine, naročito tokom peripuberteta/adolescencije, utiče na smanjenje funkcionalnosti HPA osovine sudeći po koncentraciji glukokortikoida, što može da utiče na odgovor na dodatni stresor.

5.7. Koncentracija ukupnih proteina, albumina, holesterola, triglicerida i testosterona u krvi peripubertetskih mužjaka pacova gajenih u grupi ili izolaciji

Uloga lipidnog statusa u depresiji je tema koja privlači sve više pažnje naučne javnosti, a razmatra se i uvođenje ovih parametara kao perifernih biomarkera u dijagnozi i lečenju depresije (Parekh i sar., 2017). Visoke koncentracije holesterola se dovode u vezu sa izmenjenim inflamatornim profilom i nastankom depresivnih oblika ponašanja (*inflamatorna teorija depresije*, Parekh i sar., 2017), što povezuje promenu lipidnog statusa sa patofiziologijom depresije (Zwolińska, Dmistrz-Węglarz, 2023). Iako je velika meta-analiza na preko 5,000 adultnih pacijenata sa depresijom i 12,000 kontrola (Enko i sar., 2018; Bot i sar., 2020) potvrdila povezanost specifičnog lipidnog profila sa depresivnim oblicima ponašanja, isti fenomen nije uvek primećen i u mlađoj populaciji. Naime, nova studija rađena na preadolescentnim i adolescentnim depresivnim pacijentima ukazuje na nepostojanje razlika u lipidnom statusu u poređenju sa kontrolom (Katrenčíková i sar., 2020). Sa ovim su u skladu i rezultati ove studije koji su ukazali da se lipidni status ne menja kod socijalno izolovanih peripubertetskih pacova obe starosne grupe u poređenju sa grupno gajenim kontrolama (Katrenčíková i sar., 2020). Jedan od razloga heterogenosti rezultata u literaturi može biti faktor gojaznosti koji je prisutan kod određenog broja depresivnih pacijenata (Sutaria i sar., 2019). Pored razlika u starosnoj dobi, prethodna istorija bolesti i komorbiditet depresije i drugih oboljenja (Wang i sar., 2016), kao i pol (Huang i sar., 2003; Pooradl i sar., 2013) i hormonski status (Suarez, 1999; Chen, Huang, 2006) pacijenata doprinose varijabilnosti lipidnog profila unutar određenih psihopatoloških stanja (Humer, Pieh, 2020).

Različita psihopatološka stanja mogu biti udružena sa promenama u koncentraciji proteina u serumu, usled akutno-faznog odgovora organizma na stres, kada dolazi do smanjenja koncentracije određenih proteina i/ili do njihovog povećanja usled *de novo* sinteze. Nekoliko studija je ukazalo na smanjen nivo ukupnih proteina, ali i njihovih određenih elektroforetskih frakcija - albumina i α_1 , α_2 , β , γ globulina kod depresivnih pacijenata u zavisnosti od tipa i težine kliničke slike bolesti (Maes i sar., 1995). Rezultati ove studije su ukazali na povećan nivo ukupnih proteina kod srednje adolescentnih pacova gajenih u izolaciji. Uzimajući u obzir činjenicu da nakon smanjenja količine ukupnih proteina u krvi (u ranim fazama odgovora na stres) dolazi do njihovog porasta, a zatim vraćanja na kontrolni nivo (Radakovic i sar., 2005), povećana količina ukupnih proteina u krvnoj plazmi srednje adolescentnih pacova koji su živeli u uslovima socijalne izolacije može biti posledica narušenog mehanizma vraćanja parametra na kontrolni nivo usled prisustva prolongiranog

psihološkog stresa. Međutim za ovu tvrdnju bi bilo neophodno izmeriti koncentraciju ukupnih proteina u inicijalnim fazama stresa. Povećana koncentracija ukupnih proteina je u drugim studijama na animalnim modelima (Barnett i sar., 1983) primećena u prisustvu hroničnog stresa, čime bi moglo da se objasni postojanje ovakve promene kod srednje adolescentnih životinja, ali ne i kod rano adolescentnih socijalno izolovanih životinja. Iako se u nekim studijama depresivna stanja povezuju sa smanjenjem nivoa albumina u serumu, to nije bio slučaj u ovoj studiji. Manja koncentracija albumina u serumu povezana je sa povećanom osetljivošću na stres, odnosno individue koje su osetljivije na stres imaju manju koncentraciju albumina u serumu (Van Hunsel i sar., 1998). U tom smislu, odsustvo promena u koncentraciji albumina u plazmi izolovanih jedinki je u skladu sa podatkom da kod izolovanih jedinki nije detektovan povećan nivo hormona stresa. Da bi se procenio doprinos globulinske frakcije opisanom rezultatu za ukupne proteine neophodna je analiza globulinskih frakcija, jer je pokazano da različiti oblici depresije pokazuju različitu varijabilnost u svakoj od globulinskih frakcija (α_1 , α_2 , β , γ). Dakle, iako se promene u ukupnim proteinima u krvi generalno povezuju sa depresivnim oblicima ponašanja (Peng i sar., 2016), tačna veza između njih još uvek nije u potpunosti razjašnjena, a varijabilnost dostupnih rezultata ukazuje da je potreban detaljniji pristup, kako u pogledu karakterizacije proteinskih frakcija tako i podtipova određenog psihopatološkog stanja.

Identifikacija specifičnih biomarkera iz periferne krvi bi mogla pomoći u formiranju personalizovanih tretmana, posebno u mladoj populaciji, kod koje je efikasnost lečenja antidepresivima veoma niska, a može imati i kontradiktorne/kobne posledice po mladi organizam (McCain, 2009; Vitiello, Ordóñez, 2016).

5.8. Uticaj socijalne izolacije na psihofizičke karakteristike potomstva roditelja socijalno izolovanih tokom peripuberteta

Novija istraživanja ukazuju da ne samo genetički faktori, već i sredinski uticaj, putem različitih epigenetičkih mehanizama, doprinosi predispoziji razvoja različitih mentalnih oboljenja kod potomaka roditelja koji su bili izloženi stresu (Toth, 2015). Eksperimenti na glodarima su ukazali da izlaganje roditelja stresorima tokom senzitivnih razvojnih perioda može da utiče na ponašanje potomstva i odgovor na stresore (Franklin i sar., 2010).

Rezultati ove studije su dali doprinos ovoj oblasti ukazujući da samo potomstvo muškog pola socijalno izolovanih roditelja pokazuje izmenjenu/smanjenu lokomotornu aktivnost u Testu otvorenog polja u 17. postnatalnom danu (P17). S obzirom da efekat nije bio evidentan tokom inicijalne (prvih 5 minuta testa) već samo tokom faze koja sledi (drugih 5 minuta testa), ovakav rezultat ukazuje da se ove jedinke brže umaraju ili pak brže gube interesovanje/motivaciju za novo okruženje. Razlike u telesnoj masi jedinki i vremena otvaranja očiju nije bilo, što ukazuje da uočeni rezultat nije posledica promena u razvoju (otvaranje očiju predstavlja spoljašnji znak normalne maturacije centralnog nervnog sistema, Strömmland, Pinazo-Durán, 2002; Podgorac i sar., 2016).

Druga istraživanja su ukazala da se transgeneracijski efekat različito prenosi na potomstvo oba pola, a kada je socijalni stresor u pitanju, posledice su izraženije kod potomaka muškog pola, što ih čini podložnijim za razvoj emotivnih psihopatologija (Dietz i sar., 2011). Danas se zna da početni stadijumi nekoliko neuropsihijatrijskih oboljenja, koja se ispoljavaju pretežno tokom detinjstva i adolescencije (shizofrenija, autistični spektar ponašanja, poremećaj pažnje sa hiperaktivnošću), imaju kao rani simptom kašnjenje u ranom motoričkom razvoju, tokom prvih godina života, te se i u različitim animalnim modelima sve više pažnje obraća na rani motorički razvoj jedinki (Eltokhi i sar., 2021). Od posebnog značaja je činjenica da problemi u ranom motoričkom razvoju mogu da imaju spontani oporavak, ali uz istovremenu pojavu drugih nepravilnosti u ponašanju. U prilog tome ide i rezultat dobijen u ovoj studiji, potomstvo grupno gajenih i socijalno izolovanih roditelja nije pokazivalo razlike u aktivnosti u otvorenom polju 29 postnatalnog dana. Međutim, neophodna su dodatna testiranja da bi se utvrdio psihosocijalni status potomaka. Značaj boljeg poznavanja ranog psihomotoričkog razvoja ističe se u novoj literaturi posvećenoj psihičkom zdravlju dece i mladih (Carey i sar., 2023).

Brojne kliničke studije ukazuju da je faktor rizika nastanka poremećaja raspoloženja kod potomaka prisustvo poremećaja raspoloženja kod roditelja (Maciejewski i sar., 2018), međutim postoji veoma malo podataka koji ukazuju na povezanost sa socijalnim/vršnjačkim iskustvom samih potomaka. Deca koja imaju mentalno obolele roditelje nisu samo izložena riziku lošijeg odnosa i zanemarivanja od strane roditelja, već je moguće da imaju i poteškoća u uspostavljanju vršnjačkih interakcija i formiranju kruga prijatelja usled socijalne stigme zbog obolelog roditelja (Dam, Hall, 2016). Nova istraživanja ukazuju da vršnjački odnosi potomaka imaju velikog uticaja na to da li će se neki od simptoma poremećaja raspoloženja javiti kod potomaka (Landstedt, Almquist, 2019). Takođe, ranije studije su ukazale da status deteta među vršnjacima značajno utiče na njegovo mentalno zdravlje u adultnom dobu, nezavisno od mentalnog zdravlja roditelja (Modin i sar., 2011), kao i da pozitivni socijalni odnosi sa vršnjacima mogu „poništit“ uticaj negativnih životnih događaja (Rueger i sar., 2016).

Ova studija je takođe pokazala da individualno socijalno iskustvo potomaka ima snažniji uticaj na pojavu smanjenog interesovanja za novu sredinu, izbegavanja potencijalno opasne sredine i hipohedonije, nego socijalno iskustvo roditelja. Naime, socijalno izolovano potomstvo u odnosu na grupno gajeno, bez obzira na socijalno iskustvo roditelja, je pokazalo manju lokomotornu aktivnost u testu otvorenog polja, manji broj ulaza u centralno polje arene i manji indeks preference 1% saharoze. Ono što treba naglasiti je da se rezultati dobijeni za socijalno izolovane roditelje i socijalno izolovane potomke razlikuju kada su u pitanju generalna aktivnost u otvorenom polju, jer je u roditeljskoj generaciji detektovana hiperaktivnost, a u potomačkoj hipoaktivnost u novoj sredini, dok se prisustvo indikatora hipohedoničnog ponašanja (smanjena preferenca 1% rastvora saharoze u odnosu na kontrolu) pokazalo kao konzistentan nalaz. Činjenica da je ispitivano potomstvo prvi okot mladih majki, kako ženki gajenih u grupi tako i socijalno izolovanih, jedina je metodološka razlika između dve generacije jedinki. Ono što se upoređivanjem rezultata jasno uočava je da muško potomstvo mladih majki u P29 ima manju telesnu masu nego muško potomstvo starijih majki u istom periodu razvoja ($45 \pm 1,81$ vs. $82 \pm 13,12$; Slika 4.22 i Slika 4.18.), kao i da je vertikalna aktivnost muškog potomstva mladih majki u P29 niža od vertikalne aktivnost muškog potomstva starijih majki u istom periodu razvoja ($42 \pm 4,78$ vs. $90 \pm 37,26$; Slika 4.22 i Slika 4.1C). Vertikalna aktivnost glodara u novoj sredini je indikator njihove istraživačke aktivnosti (Lever i sar., 2006), a smanjena eksploratorna aktivnost pacova u novoj sredini povezuje se sa motivacionim deficitom koji, između ostalog, može biti praćen smanjenjem telesne mase (Rygula i sar., 2005). Shodno ovim podacima, dobijeni rezultati ukazuju na motivacioni deficit potomstva mladih majki u prvoj nedelji nakon izdvajanja iz legla. Literatura koja razmatra psihofizički razvoj laboratorijskih glodara ne stavlja poseban akcenat na starost majke i redni broj okota kada su u pitanju telesna masa i psihofizičke karakteristike potomstva u kasnijim fazama razvoja i adultnom dobu (Ghasemi, Jeddi, 2021). Međutim, starija literatura ukazuje da starost ženki značajno utiče na masu potomstva ne toliko na rođenju koliko u trenutku odvajanja od majke (P21), u smislu da potomstvo ženki koje su se parile u periodu P35-P40 i P70-P75 ima značajno manju telesnu masu od potomstva ženki koje su se parile u periodu P105-P110 (Rosen i sar., 1987). O uticaju starosti mužjaka na karakteristike potomstva nema dovoljno podataka u literaturi. Ovakvo činjenično stanje ukazuje da starost majke u trenutku začeća može da bude dodatna eksperimentalna varijabla koja značajno utiče na psihofizičke karakteristike potomstva i koja bi trebala da bude evidentirana u eksperimentalnim procedurama kao obavezan parametar. U tom smislu, mora biti naglašeno da su rezultati dobijeni u ovoj studiji specifični za prvi okot mlade roditeljske generacije gajene u grupi ili izolaciji, te ne mogu biti generalizovani.

5.9. Ograničenja studije i preporuke za buduća istraživanja

Ispitivanje samo jedinki muškog pola predstavlja značajno ograničenje sprovedene studije. Međutim, ovakav izbor se može obrazložiti time da je broj jedinki koje su testirane bio u granicama kapaciteta institutskog vivarijuma i eksperimentne aparature kojom Laboratorija za molekularnu neurobiologiju i ponašanje raspolaže, imajući u vidu da je bilo neophodno testirati eksperimentalne jedinke u određenom danu postnatalne starosti. Kao i da bi rad na ženkama implicirao i praćenje

estrusnog ciklusa (prvi estrusni ciklus se kod ženki pacova javlja oko P32-35; Vidal, 2017) kao i usklađivanje dana testiranja sa fazom ciklusa, što bi moglo da rezultuje varijabilnošću perioda izolacije. Osim toga, zna se da rukovanje životinjama koje su socijalno izolovane može da utiče na ishod eksperimenta (Bigelow i sar., 2023), te bi direktno poređenje rezultata dobijenih na mužjacima, kojima je rukovano samo za potrebe testiranja, i ženki, koje bi zahtevale i rukovanje radi uzimanja vaginalnog brisa radi usklađivanja faze estrusnog ciklusa kada se vrši testiranje, bilo neadekvatno.

Eksperimenti na ženkama pacova u modelu socijalne izolacije bi značajno doprineli sagledavanju potencijalnih polno-specifičnih razlika u odgovoru na odsustvo pripadnosti vršnjačkoj grupi tokom perioda adolescencije. Nova literatura naglašava pogodnost *Wistar* pacova za istraživanja koja se bave socijalnim ponašanjem (Reppucci i sar., 2020), kao i značaj *Wistar Han* soja u ispitivanju antidepresiva (Silveira i sar., 2023). Naime, u odnosu na miševe, pacovi su društveniji, te bi mogli predstavljati bolji model sistem za osnovna biološka pitanja vezana za socijalno ponašanje.

Ponašanje laboratorijskih glodara svakako ne odražava kompleksno socijalno ponašanje ljudi u zajednici. Međutim, pojedinačni aspekti socijalnog ponašanja, kao što su socijalne preference i pristupi, povlačenje i socijalno prepoznavanje, se mogu lakše tumačiti i dati solidne smernice o posledicama neispunjenih osnovnih bioloških potreba kakva je i potreba za pripadnošću vršnjačkoj grupi.

6. ZAKLJUČCI

Eksperimenti sprovedeni u okviru ove doktorske disertacije, imali su za cilj da ispitaju efekat odsustva direktnih socijalnih kontakata na ponašanje, antioksidativni status perifernih organa peripubertetskih pacova, kao i sposobnost da odgovore na izlaganje dodatnom stresoru. Osim toga, ispitivane su psihofizičke karakteristike potomstva roditeljske generacije koja je prošla period socijalne izolacije tokom peripuberteta, u cilju sagledavanja uticaja roditeljskog socijalnog iskustva na mentalno zdravlje potomstva. Postavljeni ciljevi iznedrili su sledeće zaključke:

- 1) Socijalna izolacija tokom perioda rane adolescencije dovodi do ispoljavanja hiper-reaktivnosti u odgovoru na novu sredinu, kao i senzacionalističkog i ponašanja nalik anksioznom.
- 2) Socijalna izolacija tokom perioda srednje adolescencije ne dovodi do hiperaktivnosti u novoj sredini, ali smanjuje odgovor na D-AMPH, farmakološki stimulus sa nagrađujućim efektom, što je praćeno pojačanom aktivnošću neurona prefrontalne zone kore velikog mozga.
- 3) Socijalna izolacija tokom peripuberteta izaziva konzumatornu hipohedoniju koja se vremenom produbljuje, bez obzira na starost eksperimentalnih jedinki, tj. vreme trajanja socijalne izolacije.
- 4) Socijalna izolacija narušava socijalno ponašanje očekivano za dati uzrast, dovodeći do apetitivnog pristupa (socijalnosti) prema vršnjacima i narušavanja interesa za socijalne novine; mapiranje socijalnog u fizičkom prostoru favorizuje specifično kod jedinki izolovanih tokom perioda rane adolescencije.
- 5) Socijalna izolacija tokom perioda rane adolescencije smanjuje broj parvalbumin-imunoreaktivnih interneurona, kao i gustinu mikroglijskih ćelija u dentatnom girusu.
- 6) Socijalna izolacija ne izaziva promene u telesnoj masi i koncentraciji glukokortikoidnih hormona u krvi peripubertetskih jedinki, ali moduliše odgovor na dodatni stresor prekonoćnog gladovanja; specifično za ispitivani organ i enzim, kao i maturacionu fazu tokom koje se promene u socijalnom okruženju dešavaju.
- 7) Socijalna izolacija tokom perioda rane adolescencije smanjuje koncentraciju ukupnih proteina, bez promena u koncentraciji albumina, holesterola, triglicerida i testosterona.
- 8) Socijalna izolacija roditelja ne utiče na sazrevanje nervnog sistema i telesnu masu potomstva oba pola tokom ranog postnatalnog razvoja, ali smanjuje lokomotornu aktivnost i interesovanje za novu sredinu kod muških potomaka. Socijalno iskustvo potomstva tokom perioda peripuberteta ima snažniji uticaj na lokomotornu aktivnost i interesovanje za novinu i stimulse sa nagrađujućim efektom u poređenju sa efektom socijalnog iskustva roditelja.

Istraživanje sprovedeno u okviru ove doktorske teze je dalo doprinos proučavanju biološkog značaja pripadnosti vršnjačkoj grupi tokom adolescencije. Dobijeni rezultati naglašavaju da je ishod odsustva direktnog društvenog kontakata sa vršnjacima tokom peripuberteta dinamičan, sa klasterom atipičnih ranih simptoma koji tokom vremena prerastaju u sindrom težak za detekciju rutinskim merenjem i analizom parametara ponašanja i biomarkera stresa, a koji u velikoj meri odgovara kliničkoj slici atipične depresije. Studija je ukazala na prioritet društvenih potreba, tj. da je za postojanje motivisanog ponašanja ka socijalnoj novini neophodno da su prethodno zadovoljene potrebe pripadnosti vršnjačkoj grupi, što je od izuzetne važnosti za bolje razumevanje osnovnih bioloških principa socijalne kognicije kod sisara koji ispoljavaju socijalno ponašanje. Isticanje specifičnosti dobijenih rezultata u kontekstu starosti eksperimentalnih jedinki je od velikog značaja za produbljevanje vrednosti animalnih modela u biološkoj psihijatriji.

LITERATURA

- AHMAD, A., RASHEED, N., BANU, N. & PALIT, G. 2010. Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress*, 13, 355-64.
- AINSWORTH, M. D. 1989. Attachments beyond infancy. *Am Psychol*, 44, 709-16.
- AITKEN, R. J. 1999. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil*, 115, 1-7.
- AITKEN, R. J. & ROMAN, S. D. 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol*, 636, 154-71.
- ALBERT, D., CHEIN, J. & STEINBERG, L. 2013. Peer Influences on Adolescent Decision Making. *Curr Dir Psychol Sci*, 22, 114-120.
- ALLCHIN, A., MELCHIOR, M., FOMBONNE, E. & SURKAN, P. J. 2016. Parental social networks during childhood and offspring depression in early adulthood: a lifecourse approach. *Depress Anxiety*, 33, 1031-1038.
- ANDREYEV, A. Y., KUSHNAREVA, Y. E. & STARKOV, A. A. 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 200-14.
- ANTONIJEVIC, I. A. 2006. Depressive disorders -- is it time to endorse different pathophysiologies? *Psychoneuroendocrinology*, 31, 1-15.
- ANTUNES, M. & BIALA, G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, 13, 93-110.
- ARAIN, M., HAQUE, M., JOHAL, L., MATHUR, P., NEL, W., RAIS, A., SANDHU, R. & SHARMA, S. 2013. Maturation of the adolescent brain. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 9, 449-61.
- ARAKAWA, H. 2018. Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents. *Behav Brain Res*, 341, 98-108.
- ARBUCKLE, E. P., SMITH, G. D., GOMEZ, M. C. & LUGO, J. N. 2015. Testing for odor discrimination and habituation in mice. *J Vis Exp*, e52615.
- ARCHER, J. 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav*, 21, 205-35.
- BADIANI, A., OATES, M. M., DAY, H. E., WATSON, S. J., AKIL, H. & ROBINSON, T. E. 1998. Amphetamine-induced behavior, dopamine release, and c-fos mRNA expression: modulation by environmental novelty. *J Neurosci*, 18, 10579-93.
- BARNETT, J., HEMSWORTH, P. & HAND, A. 1983. Effects of chronic stress on some blood parameters in the pig. *Applied Animal Ethology*, 9, 273-277.
- BAUD, O., GREENE, A. E., LI, J., WANG, H., VOLPE, J. J. & ROSENBERG, P. A. 2004. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci*, 24, 1531-40.
- BAUMEISTER, R. F. & LEARY, M. R. 1995. The need to belong: desire for interpersonal attachments as a fundamental human motivation. *Psychol Bull*, 117, 497-529.
- BAVELIER, D., LEVI, D. M., LI, R. W., DAN, Y. & HENSCH, T. K. 2010. Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *J Neurosci*, 30, 14964-71.
- BECKSTEAD, R. M., DOMESICK, V. B. & NAUTA, W. J. 1979. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res*, 175, 191-217.
- BELIN, D., BERSON, N., BALADO, E., PIAZZA, P. V. & DEROUCHE-GAMONET, V. 2011. High-novelty-preference rats are predisposed to compulsive cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, 36, 569-579.
- BEN-AMI BARTAL, I., RODGERS, D. A., BERNARDEZ SARRIA, M. S., DECETY, J. & MASON, P. 2014. Pro-social behavior in rats is modulated by social experience. *Elife*, 3, e01385.
- BERLIN, I., GIVRY-STEINER, L., LECRUBIER, Y. & PUECH, A. J. 1998. Measures of anhedonia and hedonic responses to sucrose in depressive and schizophrenic patients in comparison with healthy subjects. *Eur Psychiatry*, 13, 303-9.

- BERLYNE, D. E. 1960. Conflict, arousal, and curiosity. McGraw-Hill Book Company.
- BERRIDGE, K. C. 1996. Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev*, 20, 1-25.
- BERRIDGE, K. C. 2004. Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav*, 81, 179-209.
- BERRIDGE, K. C. 2018. Evolving Concepts of Emotion and Motivation. *Front Psychol*, 9, 1647.
- BERRIDGE, K. C. & ROBINSON, T. E. 2016. Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *Am Psychol*, 71, 670-679.
- BERRIDGE, K. C., ROBINSON, T. E. & ALDRIDGE, J. W. 2009. Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. *Curr Opin Pharmacol*, 9, 65-73.
- BEST, O. & BAN, S. 2021. Adolescence: physical changes and neurological development. *Br J Nurs*, 30, 272-275.
- BEUTLER, E. 1984. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. Grune & Stratton. Inc. Orlando, FL, 32887, 248-251.
- BIAŁY, M. & KACZMAREK, L. 1996. c-Fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behaviour of males. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 56, 567-77.
- BICKS, L. K., YAMAMURO, K., FLANIGAN, M. E., KIM, J. M., KATO, D. & LUCAS, E. K. 2020. Prefrontal parvalbumin interneurons require juvenile social experience to establish adult social behavior. *Nat Commun*. 11, 1003.
- BIEDERMANN, S. V., BIEDERMANN, D. G., WENZLAFF, F., KURJAK, T., NOURI, S., AUER, M. K., WIEDEMANN, K., BRIKEN, P., HAAKER, J., LONSDORF, T. B. & FUSS, J. 2017. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. *BMC Biol*. 15, 125.
- BIGELOW, L. J., POPE, E. K., MACDONALD, D. S., ROCK, J. E. & BERNARD, P. B. 2023. Getting a handle on rat familiarization: The impact of handling protocols on classic tests of stress in *Rattus norvegicus*. *Lab Anim*, 57, 259-269.
- BIJLSMA, A., VANDERSCHUREN, L. J. & WIERENGA, C. J. 2023. Social play behavior shapes the development of prefrontal inhibition in a region-specific manner. *bioRxiv*, 2023.02.13.528312.
- BLOCK, E. R., NUTTLE, J., BALCITA-PEDICINO, J. J., CALTAGARONE, J. & WATKINS, S. C. 2015. Brain Region-Specific Trafficking of the Dopamine Transporter. *J Neurosci*. 35, 12845-58.
- BLOCK, M. L., ZECCA, L. & HONG, J. S. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8, 57-69.
- BOISSY, A., MANTEUFFEL, G., JENSEN, M. B., MOE, R. O., SPRUIJT, B., KEELING, L. J., WINCKLER, C., FORKMAN, B., DIMITROV, I., LANGBEIN, J., BAKKEN, M., VEISSIER, I. & AUBERT, A. 2007. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiol Behav*, 92, 375-97.
- BOSE, M., OLIVÁN, B. & LAFERRÈRE, B. 2009. Stress and obesity: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in metabolic disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 16, 340-6.
- BOT, M., MILANESCHI, Y., AL-SHEHRI, T., AMIN, N., GARMAEVA, S., ONDERWATER, G. L. J., POOL, R., THESING, C. S., VIJFHUIZEN, L. S., VOGELZANGS, N., ARTS, I. C. W., DEMIRKAN, A., VAN DUJIN, C., VAN GREEVENBROEK, M., VAN DER KALLEN, C. J. H., KÖHLER, S., LIGTHART, L., VAN DEN MAAGDENBERG, A., MOOK-KANAMORI, D. O., DE MUTSERT, R., TIEMEIER, H., SCHRAM, M. T., STEHOUWER, C. D. A., TERWINDT, G. M., WILLEMS VAN DIJK, K., FU, J., ZHERNAKOVA, A., BEEKMAN, M., SLAGBOOM, P. E., BOOMSMA, D. I. & PENNINX, B. 2020. Metabolomics Profile in Depression: A Pooled Analysis of 230 Metabolic Markers in 5283 Cases With Depression and 10,145 Controls. *Biol Psychiatry*, 87, 409-418.
- BOUAYED, J., RAMMAL, H. & SOULIMANI, R. 2009. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev*, 2, 63-7.

- BOVE, M., MORGESE, M. G., DIMONTE, S., SIKORA, V., AGOSTI, L. P., PALMIERI, M. A., TUCCI, P., SCHIAVONE, S. & TRABACE, L. 2024. Increased stress vulnerability in the offspring of socially isolated rats: Behavioural, neurochemical and redox dysfunctions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 131, 110945.
- BOWLBY, J. 1982. Attachment and loss: retrospect and prospect. *Am J Orthopsychiatry*, 52, 664-678.
- BRAET, C., VAN VLIERBERGHE, L., VANDEVIVERE, E., THEUWIS, L. & BOSMANS, G. 2013. Depression in early, middle and late adolescence: differential evidence for the cognitive diathesis-stress model. *Clin Psychol Psychother*, 20, 369-83.
- BRAMBILLA, P., PEREZ, J., BARALE, F., SCHETTINI, G. & SOARES, J. C. 2003. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry*, 8, 721-37, 715.
- BREAUX, R., CASH, A. R., LEWIS, J., GARCIA, K. M., DVORSKY, M. R. & BECKER, S. P. 2023. Impacts of COVID-19 quarantine and isolation on adolescent social functioning. *Curr Opin Psychol*, 52, 101613.
- BRENHOUSE, H. C. & ANDERSEN, S. L. 2011. Developmental trajectories during adolescence in males and females: a cross-species understanding of underlying brain changes. *Neurosci Biobehav Rev*, 35, 1687-703.
- BRODERICK, P. A. & PHELIX, C. F. 1997. I. Serotonin (5-HT) within dopamine reward circuits signals open-field behavior. II. Basis for 5-HT--DA interaction in cocaine dysfunctional behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 21, 227-60.
- BROTMAN, M. A., SCHMAJUK, M., RICH, B. A., DICKSTEIN, D. P., GUYER, A. E., COSTELLO, E. J., EGGER, H. L., ANGOLD, A., PINE, D. S. & LEIBENLUFT, E. 2006. Prevalence, clinical correlates, and longitudinal course of severe mood dysregulation in children. *Biol Psychiatry*, 60, 991-7.
- BROWN, G. C. & NEHER, J. J. 2014. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci*, 15, 209-16.
- BRYDA, E. C. 2013. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med*, 110, 207-11.
- BUCHANAN, K. L., EVANS, M. R., GOLDSMITH, A. R., BRYANT, D. M. & ROWE, L. V. 2001. Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signalling? *Proc Biol Sci*, 268, 1337-44.
- BURKE, A. R., MCCORMICK, C. M., PELLIS, S. M. & LUKKES, J. L. 2017. Impact of adolescent social experiences on behavior and neural circuits implicated in mental illnesses. *Neurosci Biobehav Rev*, 76, 280-300.
- BURKHART, B. R., SCHWARZ, R. M. & GREEN, S. B. 1978. Relationships between dimensions of anxiety and sensation seeking. *J Consult Clin Psychol*, 46, 194-5.
- BURMAN, O., OWEN, D., ABOUISMAIL, U. & MENDL, M. 2008. Removing individual rats affects indicators of welfare in the remaining group members. *Physiol Behav*, 93, 89-96.
- BUTLER, T. R., ARIWODOLA, O. J. & WEINER, J. L. 2014. The impact of social isolation on HPA axis function, anxiety-like behaviors, and ethanol drinking. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, 102.
- CALCIA, M. A., BONSALE, D. R., BLOOMFIELD, P. S., SELVARAJ, S., BARICHELLO, T. & HOWES, O. D. 2016. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)*, 233, 1637-50.
- CALIPARI, E. S., FERRIS, M. J., SALAHPOUR, A., CARON, M. G. & JONES, S. R. 2013. Methylphenidate amplifies the potency and reinforcing effects of amphetamines by increasing dopamine transporter expression. *Nat Commun*, 4, 2720.
- CAMERON, L. P., BENSON, C. J., DUNLAP, L. E. & OLSON, D. E. 2018. Effects of N, N-Dimethyltryptamine on Rat Behaviors Relevant to Anxiety and Depression. *ACS Chem Neurosci*. 9, 1582-1590.

- CAREY, E., HEALY, C., PERRY, Y., GILLAN, D., WHITEHOUSE, A. J. O., CANNON, M. & LIN, A. 2023. Evidence that infant and early childhood developmental impairments are associated with hallucinatory experiences: results from a large, population-based cohort study. *Psychol Med*, 53, 2116-2124.
- CARLSSON, L. M., JONSSON, J., EDLUND, T. & MARKLUND, S. L. 1995. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6264-8.
- CARPENTER-HYLAND, E. P. & CHANDLER, L. J. 2007. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, 86, 200-8.
- CARROLL, D., LOVALLO, W. R. & PHILLIPS, A. C. 2009. Are large physiological reactions to acute psychological stress always bad for health? *Social and Personality Psychology Compass*, 3, 725-743.
- CASEY, B. J. & JONES, R. M. 2010. Neurobiology of the adolescent brain and behavior: implications for substance use disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49, 1189-201; quiz 1285.
- CASTNER, S. A. & GOLDMAN-RAKIC, P. S. 2003. Amphetamine sensitization of hallucinatory-like behaviors is dependent on prefrontal cortex in nonhuman primates. *Biol Psychiatry*, 54, 105-10.
- CATALANO, L. T., WYNN, J. K., GREEN, M. F. & GOLD, J. M. 2022. Reduced neural activity when anticipating social versus nonsocial rewards in schizophrenia: Preliminary evidence from an ERP study. *Schizophr Res*, 246, 7-16.
- CATALDI, S. & STANLEY, A. T. 2022. Interpreting the role of the striatum during multiple phases of motor learning. *FEBS J*. 289, 2263-2281.
- CHARITOU, S., ASONITOU, K. & KOUTSOUKI, D. 2010. Prediction of infant's motor development. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 9, 456-461.
- CHELIKANI, P., FITA, I. & LOEWEN, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*, 61, 192-208.
- CHEN, C. C. & HUANG, T. L. 2006. Association of serum lipid profiles with depressive and anxiety disorders in menopausal women. *Chang Gung Med J*, 29, 325-30.
- CHEN, H. C., YIP, T., LEE, J. K., JULIANI, J., SERNIA, C. & HILL, A. F. 2020. Restraint Stress Alters Expression of Glucocorticoid Bioavailability Mediators, Suppresses Nrf2, and Promotes Oxidative Stress in Liver Tissue. *Antioxidants (Basel)*. 9, 853.
- CHEN, Y.-W., BUNDY, A. C., CORDIER, R., CHIEN, Y.-L. & EINFELD, S. L. 2015. Motivation for everyday social participation in cognitively able individuals with autism spectrum disorder. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 2699-2709.
- CHEVALLIER, C., KOHLS, G., TROIANI, V., BRODKIN, E. S. & SCHULTZ, R. T. 2012. The social motivation theory of autism. *Trends Cogn Sci*, 16, 231-9.
- COHEN, H., ZOHAR, J., GIDRON, Y., MATAR, M. A., BELKIND, D., LOEWENTHAL, U., KOZLOVSKY, N. & KAPLAN, Z. 2006. Blunted HPA axis response to stress influences susceptibility to posttraumatic stress response in rats. *Biological psychiatry*, 59, 1208-1218.
- COLAIANNA, M., SCHIAVONE, S., ZOTTI, M., TUCCI, P., MORGESE, M. G., BÄCKDAHL, L., HOLMDAHL, R., KRAUSE, K.-H., CUOMO, V. & TRABACE, L. 2013. Neuroendocrine profile in a rat model of psychosocial stress: relation to oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 18, 1385-1399.
- CONTESTABILE, A., CASAROTTO, G., GIRARD, B. & TZANOULINO, S. 2021. Deconstructing the contribution of sensory cues in social approach. *Eur J Neurosci*. 53, 3199-3211.
- COUTO, N., MALYS, N., GASKELL, S. J. & BARBER, J. 2013. Partition and turnover of glutathione reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a proteomic approach. *J Proteome Res*, 12, 2885-94.

- CRANE, L., GODDARD, L. & PRING, L. 2009. Sensory processing in adults with autism spectrum disorders. *Autism*, 13, 215-28.
- CRONE, E. A. & DAHL, R. E. 2012. Understanding adolescence as a period of social-affective engagement and goal flexibility. *Nat Rev Neurosci*, 13, 636-50.
- CUMMINGS, C. M., CAPORINO, N. E. & KENDALL, P. C. 2014. Comorbidity of anxiety and depression in children and adolescents: 20 years after. *Psychol Bull*, 140, 816-45.
- CUNNINGHAM, A. M., WALKER, D. M. & NESTLER, E. J. 2021. Paternal transgenerational epigenetic mechanisms mediating stress phenotypes of offspring. *Eur J Neurosci*, 53, 271-280.
- CZÉH, B., VARGA, Z. K., HENNINGSEN, K., KOVÁCS, G. L., MISETA, A. & WIBORG, O. 2015. Chronic stress reduces the number of GABAergic interneurons in the adult rat hippocampus, dorsal-ventral and region-specific differences. *Hippocampus*, 25, 393-405.
- D'ALOIA, A. & MOLTENI, L. 2021. Palmitoylethanolamide Modulation of Microglia Activation: Characterization of Mechanisms of Action and Implication for Its Neuroprotective Effects. *Int J Mol Sci*. 22.
- DAHL, R. E. 2004. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci*, 1021, 1-22.
- DAI, Y. C., ZHANG, H. F., SCHÖN, M., BÖCKERS, T. M., HAN, S. P., HAN, J. S. & ZHANG, R. 2018. Neonatal Oxytocin Treatment Ameliorates Autistic-Like Behaviors and Oxytocin Deficiency in Valproic Acid-Induced Rat Model of Autism. *Front Cell Neurosci*, 12, 355.
- DAM, K. & HALL, E. O. 2016. Navigating in an unpredictable daily life: a metasynthesis on children's experiences living with a parent with severe mental illness. *Scand J Caring Sci*, 30, 442-57.
- DANTZER, R., O'CONNOR, J. C., FREUND, G. G., JOHNSON, R. W. & KELLEY, K. W. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9, 46-56.
- DATTA, D. & ARNSTEN, A. F. T. 2019. Loss of Prefrontal Cortical Higher Cognition with Uncontrollable Stress: Molecular Mechanisms, Changes with Age, and Relevance to Treatment. *Brain Sci*, 9.
- DAVIDSON, J. R., MILLER, R. D., TURNBULL, C. D. & SULLIVAN, J. L. 1982. Atypical depression. *Arch Gen Psychiatry*, 39, 527-34.
- DE HAAN, M. & GUNNAR, M. R. 2009. *Handbook of developmental social neuroscience*, Guilford Press.
- DE LA ZERDA, S. H., NETSER, S., MAGALNIK, H., BRILLER, M., MARZAN, D., GLATT, S., ABERGEL, Y. & WAGNER, S. 2022. Social recognition in laboratory mice requires integration of behaviorally-induced somatosensory, auditory and olfactory cues. *Psychoneuroendocrinology*, 143, 105859.
- DE LORGERIL, M., SALEN, P., ACCOMINOTTI, M., CADAU, M., STEGHENS, J. P., BOUCHER, F. & DE LEIRIS, J. 2001. Dietary and blood antioxidants in patients with chronic heart failure. Insights into the potential importance of selenium in heart failure. *Eur J Heart Fail*, 3, 661-9.
- DEFOE, I. N., DUBAS, J. S., DALMAIJER, E. S. & VAN AKEN, M. A. G. 2020. Is the Peer Presence Effect on Heightened Adolescent Risky Decision-Making only Present in Males? *J Youth Adolesc*, 49, 693-705.
- DEL ARCO, A., ZHU, S., TERASMAA, A., MOHAMMED, A. H. & FUXE, K. 2004. Hyperactivity to novelty induced by social isolation is not correlated with changes in D2 receptor function and binding in striatum. *Psychopharmacology (Berl)*, 171, 148-55.
- DELLU, F., PIAZZA, P., MAYO, W., LE MOAL, M. & SIMON, H. 1996. Novelty-seeking in rats: biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology*, 34, 136-145.
- DENCKLA, M. B. 2005. Why assess motor functions "early and often?". *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 11, 3.

- DER-AVAKIAN, A. & MARKOU, A. 2012. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci*, 35, 68-77.
- DICHTER, G. S., SMOSKI, M. J., KAMPOV-POLEVOY, A. B., GALLOP, R. & GARBUTT, J. C. 2010. Unipolar depression does not moderate responses to the Sweet Taste Test. *Depress Anxiety*, 27, 859-63.
- DIETHORN, E. J. & GOULD, E. 2023. Development of the hippocampal CA2 region and the emergence of social recognition. *Dev Neurobiol*. 83, 143-156.
- DIETZ, D. M., LAPLANT, Q., WATTS, E. L., HODES, G. E., RUSSO, S. J., FENG, J., OOSTING, R. S., VIALOU, V. & NESTLER, E. J. 2011. Paternal transmission of stress-induced pathologies. *Biol Psychiatry*, 70, 408-14.
- DJORDJEVIĆ, J., CVIJIĆ, G. & DAVIDOVIĆ, V. 2003. Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats. *Physiol Res*, 52, 67-72.
- DJORDJEVIC, J., DJORDJEVIC, A., ADZIC, M., NICIFOROVIC, A. & RADOJCIC, M. B. 2010. Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats. *Physiol Res*, 59, 729-736.
- DOMÍNGUEZ, S., REY, C. C., THERREAU, L., FANTON, A., MASSOTTE, D., VERRET, L., PISKOROWSKI, R. A. & CHEVALEYRE, V. 2019. Maturation of PNN and ErbB4 signaling in area CA2 during adolescence underlies the emergence of PV interneuron plasticity and social memory. *Cell Reports*, 29, 1099-1112. e4.
- DOUGLAS, L. A., VARLINSKAYA, E. I. & SPEAR, L. P. 2003. Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: effects of social isolation. *Physiol Behav*, 80, 317-25.
- DRABKIN, D. L. & AUSTIN, J. H. 1935. Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 112, 51-65.
- DRAGUNOW, M. & BILKEY, D. 2002. Chapter II neuroanatomical and functional mapping using activation of transcription factors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier.
- DREVETS, W. C., PRICE, J. L., BARDGETT, M. E., REICH, T., TODD, R. D. & RAICHLE, M. E. 2002. Glucose metabolism in the amygdala in depression: relationship to diagnostic subtype and plasma cortisol levels. *Pharmacol Biochem Behav*, 71, 431-47.
- DRINGEN, R., PAWLOWSKI, P. G. & HIRRLINGER, J. 2005. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res*, 79, 157-65.
- DU, H., DENG, W., AIMONE, J. B., GE, M., PARYLAK, S., WALCH, K., ZHANG, W., COOK, J., SONG, H., WANG, L., GAGE, F. H. & MU, Y. 2016. Dopaminergic inputs in the dentate gyrus direct the choice of memory encoding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E5501-10.
- DUBEY, I., ROPAR, D. & HAMILTON, A. F. C. 2017. Social seeking declines in young adolescents. *R Soc Open Sci*, 4, 170029.
- EINON, D. F. & MORGAN, M. J. 1977. A critical period for social isolation in the rat. *Dev Psychobiol*, 10, 123-32.
- ELLENBROEK, B. & YOUN, J. 2016. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Dis Model Mech*. 9, 1079-1087.
- ELTOKHI, A., JANMAAT, I. E., GENEDI, M. & HAARMAN, B. C. M. 2020. Dysregulation of synaptic pruning as a possible link between intestinal microbiota dysbiosis and neuropsychiatric disorders. *J Neurosci Res*. 98, 1335-1369.
- ELTOKHI, A., KURPIERS, B. & PITZER, C. 2021. Comprehensive characterization of motor and coordination functions in three adolescent wild-type mouse strains. *Sci Rep*, 11, 6497.
- ENGELBERG, H. 1992. Low serum cholesterol and suicide. *Lancet*, 339, 727-9.
- ENKO, D., BRANDMAYR, W., HALWACHS-BAUMANN, G., SCHNEDL, W. J., MEINITZER, A. & KRIEGSHÄUSER, G. 2018. Prospective plasma lipid profiling in individuals with and without depression. *Lipids Health Dis*, 17, 149.
- ENNACEUR, A. 2010. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural brain research*, 215, 244-254.

- ENOMOTO, S. & KATO, T. A. 2022. Stress, Microglial Activation, and Mental Disorders. *Stress-Related Disorders*.
- ERNST, M., PINE, D. S. & HARDIN, M. 2006. Triadic model of the neurobiology of motivated behavior in adolescence. *Psychol Med*, 36, 299-312.
- ESTES, M. L. & MCALLISTER, A. K. 2014. Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol*, 24, 623-30.
- EVERITT, B. J. & ROBBINS, T. W. 2013. From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction. *Neurosci Biobehav Rev*, 37, 1946-54.
- EXNER, M. & CLARK, D. 1993. Behaviour in the novel environment predicts responsiveness to d-amphetamine in the rat: a multivariate approach. *Behav Pharmacol*, 4, 47-56.
- FARAVELLI, C., GORINI AMEDEI, S., ROTELLA, F., FARAVELLI, L., PALLA, A., CONSOLI, G., RICCA, V., BATINI, S., LO SAURO, C., SPITI, A. & CATENA DELL'OSSO, M. 2010. Childhood traumata, Dexamethasone Suppression Test and psychiatric symptoms: a trans-diagnostic approach. *Psychol Med*, 40, 2037-48.
- FARAVELLI, C., LO SAURO, C., GODINI, L., LELLI, L., BENNI, L., PIETRINI, F., LAZZERETTI, L., TALAMBA, G. A., FIORAVANTI, G. & RICCA, V. 2012. Childhood stressful events, HPA axis and anxiety disorders. *World J Psychiatry*, 2, 13-25.
- FAWCETT, J. & SIOMOPOULOS, V. 1971. Dextroamphetamine response as a possible predictor of improvement with tricyclic therapy in depression. *Archives of General Psychiatry*, 25, 247-255.
- FERENCZI, E. A., ZALOCUSKY, K. A., LISTON, C., GROSENICK, L., WARDEN, M. R., AMATYA, D., KATOVICH, K., MEHTA, H., PATENAUDE, B., RAMAKRISHNAN, C., KALANITHI, P., ETKIN, A., KNUTSON, B., GLOVER, G. H. & DEISSEROTH, K. 2016. Prefrontal cortical regulation of brainwide circuit dynamics and reward-related behavior. *Science*, 351, aac9698.
- FERGUSON, J. N., YOUNG, L. J. & INSEL, T. R. 2002. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol*, 23, 200-24.
- FERLAND, C. L. & SCHRADER, L. A. 2011. Cage mate separation in pair-housed male rats evokes an acute stress corticosterone response. *Neurosci Lett*, 489, 154-8.
- FERNÁNDEZ-ARJONA, M. D. M., GRONDONA, J. M., GRANADOS-DURÁN, P., FERNÁNDEZ-LLEBREZ, P. & LÓPEZ-ÁVALOS, M. D. 2017. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci*, 11, 235.
- FILICE, F., JANICKOVA, L., HENZI, T., BILELLA, A. & SCHWALLER, B. 2020. The Parvalbumin Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Front Cell Neurosci*, 14, 577525.
- FILICE, F., VÖRCKEL, K. J., SUNGUR, A., WÖHR, M. & SCHWALLER, B. 2016. Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. *Mol Brain*, 9, 10.
- FILIPOVIĆ, D., TODOROVIĆ, N., BERNARDI, R. E. & GASS, P. 2017. Oxidative and nitrosative stress pathways in the brain of socially isolated adult male rats demonstrating depressive- and anxiety-like symptoms. *Brain Struct Funct*, 222, 1-20.
- FILIPOVIĆ, D., ZLATKOVIĆ, J., GASS, P. & INTA, D. 2013. The differential effects of acute vs. chronic stress and their combination on hippocampal parvalbumin and inducible heat shock protein 70 expression. *Neuroscience*, 236, 47-54.
- FLORIN, S. M., KUCZENSKI, R. & SEGAL, D. S. 1992. Amphetamine-induced changes in behavior and caudate extracellular acetylcholine. *Brain Res*, 581, 53-8.
- FONE, K. C. & PORKESS, M. V. 2008. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 32, 1087-102.
- FORBES, J. M. & THORBURN, D. R. 2018. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 14, 291-312.

- FRANCO, M. C., DENNYS, C. N., ROSSI, F. H. & ESTÉVEZ, A. G. 2013. Superoxide dismutase and oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis*.
- FRANKLIN, T. B., LINDER, N., RUSSIG, H., THÖNY, B. & MANSUY, I. M. 2011. Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. *PLoS One*, 6, e21842.
- FRANKLIN, T. B., RUSSIG, H., WEISS, I. C., GRÄFF, J., LINDER, N., MICHALON, A., VIZI, S. & MANSUY, I. M. 2010. Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol Psychiatry*, 68, 408-15.
- FRICK, L. R., WILLIAMS, K. & PITTENGER, C. 2013. Microglial dysregulation in psychiatric disease. *Clin Dev Immunol*, 2013, 608654.
- FUHRMANN, D., KNOLL, L. J. & BLAKEMORE, S. J. 2015. Adolescence as a Sensitive Period of Brain Development. *Trends Cogn Sci*, 19, 558-566.
- FUHRMANN, D., KNOLL, L. J., SAKHARDANDE, A. L., SPEEKENBRINK, M., KADOSH, K. C. & BLAKEMORE, S. J. 2016. Perception and recognition of faces in adolescence. *Sci Rep*, 6, 33497.
- FULFORD, A. J. & MARSDEN, C. A. 1998. Conditioned release of 5-hydroxytryptamine in vivo in the nucleus accumbens following isolation-rearing in the rat. *Neuroscience*, 83, 481-7.
- FURMAN, W. & BUHRMESTER, D. 1992. Age and sex differences in perceptions of networks of personal relationships. *Child Dev*, 63, 103-15.
- GABBAY, V., JOHNSON, A. R., ALONSO, C. M., EVANS, L. K., BABB, J. S. & KLEIN, R. G. 2015. Anhedonia, but not irritability, is associated with illness severity outcomes in adolescent major depression. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 25, 194-200.
- GALEF JR, B. G. 1981. The ecology of weaning: parasitism and the achievement of independence by altricial mammals. *Parental care in mammals*. Springer.
- GARCIA-DIAZ, E. C., GOMEZ-QUIROZ, L. E., ARENAS-RIOS, E., ARAGON-MARTINEZ, A., IBARRA-ARIAS, J. A. & DEL SOCORRO, I. R.-M. M. 2015. Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat. *Syst Biol Reprod Med*, 61, 150-60.
- GARNER, J. P. 2005. Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. *Ilar j*, 46, 106-17.
- GAWRYLUK, J. W., WANG, J. F., ANDREAZZA, A. C., SHAO, L. & YOUNG, L. T. 2011. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, 14, 123-30.
- GENTSCH, C., LICHTSTEINER, M. & FEER, H. 1981. Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. *Physiology & behavior*, 27, 183-186.
- GENTSCH, C., LICHTSTEINER, M. & FEER, H. 1982. Behavioural comparisons between individually- and group-housed male rats: effects of novel environments and diurnal rhythm. *Behav Brain Res*, 6, 93-100.
- GHASEMI, A. & JEDDI, S. 2021. The laboratory rat: Age and body weight matter. *EXCLI J*. 20, 1431-1445.
- GHOSH, D., DAS, U. B., GHOSH, S., MALLICK, M. & DEBNATH, J. 2002. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. *Drug Chem Toxicol*, 25, 281-92.
- GKESOGLOU, T. & BARGIOTA, S. I. 2022. Prognostic Significance of Blood-Based Baseline Biomarkers in Treatment-Resistant Depression: A Literature Review of Available Studies on Treatment Response. *Brain Sci*. 12.
- GLATZLE, D., VUILLEUMIER, J. P., WEBER, F. & DECKER, K. 1974. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*, 30, 665-7.

- GOLD, P. W. & CHROUSOS, G. P. 2013. Melancholic and atypical subtypes of depression represent distinct pathophysiological entities: CRH, neural circuits, and the diathesis for anxiety and depression. *Mol Psychiatry*, 18, 632-4.
- GOLDMAN, L., WINGET, C., HOLLINGSHEAD, G. W. & LEVINE, S. 1973. Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology*, 12, 199-211.
- GOLDSTEIN, D., PACAK, K. & KOPIN, I. 1996. Nonspecificity versus primitive specificity of stress response. *Stress: molecular genetic and neurobiological advances*, 1, 3-20.
- GÓMEZ-OCÁDIZ, R., TRIPPA, M. & ZHANG, C. L. 2022. A synaptic signal for novelty processing in the hippocampus. *Nat Commun.* 13, 4122.
- GONZALEZ, A. & HAMMOCK, E. A. D. 2022. Oxytocin and microglia in the development of social behaviour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 377, 20210059.
- GRABERT, K. & MICHOEL, T. 2016. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci.* 19, 504-16.
- GRASES, G., COLOM, M. A., FERNANDEZ, R. A., COSTA-BAUZÁ, A. & GRASES, F. 2014. Evidence of higher oxidative status in depression and anxiety. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 430216.
- GRIEBEL, G., BELZUNG, C., MISSLIN, R. & VOGEL, E. 1993. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol*, 4, 637-644.
- GROMER, D., KISER, D. P. & PAULI, P. 2021. Thigmotaxis in a virtual human open field test. *Sci Rep*, 11, 6670.
- GRØNLI, J., FISKE, E., MURISON, R., BJORVATN, B., SØRENSEN, E., URSIN, R. & PORTAS, C. M. 2007. Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. *Behav Brain Res*, 181, 42-51.
- GUAN, Y., HICKEY, M. J., BORGSTAHL, G. E., HALLEWELL, R. A., LEPOCK, J. R., O'CONNOR, D., HSIEH, Y., NICK, H. S., SILVERMAN, D. N. & TAINER, J. A. 1998. Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34. *Biochemistry*, 37, 4722-30.
- GUESMI, F., BEGHLEM, H., TYAGI, A. K., ALI, M. B., MOUHOUB, R. B., BELLAMINE, H. & LANDOULSI, A. 2016. Prevention of H₂O₂ Induced Oxidative Damages of Rat Testis by Thymus algeriensis. *Biomed Environ Sci*, 29, 275-85.
- GULLEY, J. M. & STANIS, J. J. 2010. Adaptations in medial prefrontal cortex function associated with amphetamine-induced behavioral sensitization. *Neuroscience*, 166, 615-24.
- GUNTHER MOOR, B., VAN LEIJENHORST, L., ROMBOUITS, S. A., CRONE, E. A. & VAN DER MOLEN, M. W. 2010. Do you like me? Neural correlates of social evaluation and developmental trajectories. *Soc Neurosci*, 5, 461-82.
- GUTMAN, D. A. & NEMEROFF, C. B. 2003. Persistent central nervous system effects of an adverse early environment: clinical and preclinical studies. *Physiol Behav*, 79, 471-8.
- GUZMÁN, D. C., MEJÍA, G. B., VÁZQUEZ, I. E., GARCÍA, E. H., DEL ANGEL, D. S. & OLGUÍN, H. J. 2005. Effect of testosterone and steroids homologues on indolamines and lipid peroxidation in rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 94, 369-73.
- HAINMUELLER, T. & BARTOS, M. 2020. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nat Rev Neurosci.* 21, 153-168.
- HAJNAL, A., SMITH, G. P. & NORRGREN, R. 2004. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286, R31-R37.
- HALL, R. C., BERESFORD, T. P., FAWCETT, J., KRAVITZ, H. M. & SABELLI, H. C. 1984. Stimulant challenge tests. *Handbook of Psychiatric Diagnostic Procedures Vol. I*, 223-251.
- HALLIWELL, B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97, 1634-58.

- HAMMERSLAG, L. R. & BELAGODU, A. P. 2019. Adolescent impulsivity as a sex-dependent and subtype-dependent predictor of impulsivity, alcohol drinking and dopamine D(2) receptor expression in adult rats. *Addict Biol.* 24, 193-205.
- HARLAN, R. E. & GARCIA, M. M. 1998. Drugs of abuse and immediate-early genes in the forebrain. *Mol Neurobiol*, 16, 221-67.
- HARLOW, H., HARLOW, M. & SUOMI, S. 1971. From thought to therapy. *Am. sci*, 59, 538-549.
- HASSAMAL, S. 2023. Chronic stress, neuroinflammation, and depression: an overview of pathophysiological mechanisms and emerging anti-inflammatories. *Front Psychiatry*, 14, 1130989.
- HATZIGIAKOUKIS, D. S., MARTINOTTI, G., GIANNANTONIO, M. D. & JANIRI, L. 2011. Anhedonia and substance dependence: clinical correlates and treatment options. *Front psychiatry*, 2, 10.
- HAWKLEY, L. C., COLE, S. W., CAPITANIO, J. P., NORMAN, G. J. & CACIOPPO, J. T. 2012. Effects of social isolation on glucocorticoid regulation in social mammals. *Horm behav*, 62, 314-323.
- HEIDBREDER, C. A., WEISS, I. C., DOMENEY, A. M., PRYCE, C., HOMBERG, J., HEDOU, G., FELDON, J., MORAN, M. C. & NELSON, P. 2000. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience*, 100, 749-68.
- HELLEMANS, K. G., BENGE, L. C. & OLMSTEAD, M. C. 2004. Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Res Dev Brain Res*, 150, 103-15.
- HELLMANN, J. K., BUKHARI, S. A., DENO, J. & BELL, A. M. 2019. Sex-specific transgenerational plasticity I: Maternal and paternal effects on sons and daughters. *J Anim Ecol*.
- HERANE-VIVES, A., ARNONE, D., DE ANGEL, V., PAPADOPOULOS, A., WISE, T., ALAMEDA, L., CHUA, K. C., YOUNG, A. H. & CLEARE, A. J. 2020. Cortisol levels in unmedicated patients with unipolar and bipolar major depression using hair and saliva specimens. *Int J Bipolar Disord*, 8, 15.
- HERANE-VIVES, A., DE ANGEL, V., PAPADOPOULOS, A. & WISE, T. 2018. Short-term and long-term measures of cortisol in saliva and hair in atypical and non-atypical depression. *Acta Psychiatr Scand*. 137, 216-230.
- HERMES, G. L., ROSENTHAL, L., MONTAG, A. & MCCLINTOCK, M. K. 2006. Social isolation and the inflammatory response: sex differences in the enduring effects of a prior stressor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R273-82.
- HITTI, F. L. & SIEGELBAUM, S. A. 2014. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, 508, 88-92.
- HOFFMAN, K. L. 2016. What can animal models tell us about depressive disorders. *Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals*, 35-86.
- HOGAN, R., JONES, W. H. & CHEEK, J. M. 1985. Socioanalytic theory: An alternative to armadillo psychology. *The self and social life*, 175, 198.
- HOMAYOUN, H. & MOGHADDAM, B. 2006. Progression of cellular adaptations in medial prefrontal and orbitofrontal cortex in response to repeated amphetamine. *J Neurosci*, 26, 8025-39.
- HOMEL, R., BURNS, A. & GOODNOW, J. 1987. Parental social networks and child development. *JSPR*, 4, 159-177.
- HONG, Y. A. & PARK, C. W. 2021. Catalytic Antioxidants in the Kidney. *Antioxidants (Basel)*, 10.
- HUANG, T. L. 2002. Lower serum albumin levels in patients with mood disorders. *Chang Gung Med J*, 25, 509-13.
- HUANG, T. L., WU, S. C., CHIANG, Y. S. & CHEN, J. F. 2003. Correlation between serum lipid, lipoprotein concentrations and anxious state, depressive state or major depressive disorder. *Psychiatry Res*, 118, 147-53.
- HUMER, E. & PIEH, C. 2020. Metabolomic Biomarkers in Anxiety Disorders. *Int J Mol Sci*. 21.

- IGHODARO, O. & AKINLOYE, O. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54, 287-293.
- INGLIS, I. R., LANGTON, S., FORKMAN, B. & LAZARUS, J. 2001. An information primacy model of exploratory and foraging behaviour. *Animal behaviour*, 62, 543-557.
- INSEL, T. R. 2003. Is social attachment an addictive disorder? *Physiol Behav*, 79, 351-7.
- IRONSIDE, M., KUMAR, P., KANG, M. S. & PIZZAGALLI, D. A. 2018. Brain mechanisms mediating effects of stress on reward sensitivity. *Curr Opin Behav Sci*, 22, 106-113.
- IVERSEN, D., WILKINSON, S. & SIMPSON, B. 1971. Enhanced amphetamine responses after frontal cortex lesions in the rat. *Eur J Pharmacol*, 13, 387-90.
- JENSEN, T. L., KIERSGAARD, M. K., SØRENSEN, D. B. & MIKKELSEN, L. F. 2013. Fasting of mice: a review. *Lab Anim*, 47, 225-40.
- JONES, C. B., MANGE, A. & GRANATA, L. 2019. Short and Long-Term Changes in Social Odor Recognition and Plasma Cytokine Levels Following Oxygen ((16)O) Ion Radiation Exposure. *Int J Mol Sci*, 20.
- JORGENSEN, N. A. & NELSON, L. J. 2018. Moving toward and away from others: Social orientations in emerging adulthood. *J App Dev Psychology*, 58, 66-76.
- JURADO-PARRAS, M. T., SAFAIE, M., SARNO, S., LOUIS, J., KAROUTCHI, C., BERRET, B. & ROBBE, D. 2020. The Dorsal Striatum Energizes Motor Routines. *Curr Biol*, 30, 4362-4372.e6.
- KAMPE, K. K., FRITH, C. D., DOLAN, R. J. & FRITH, U. 2001. Reward value of attractiveness and gaze. *Nature*, 413, 589.
- KASSAB, R. & ALEXANDRE, F. 2018. Pattern separation in the hippocampus: distinct circuits under different conditions. *Brain Struct Funct*. 223, 2785-2808.
- KATREŇÍKOVÁ, B., VAVÁKOVÁ, M., WĄCZULÍKOVÁ, I., ORAVEC, S., GARAIOVA, I., NAGYOVÁ, Z., HLAVÁČOVÁ, N. & ĎURAČKOVÁ, Z. 2020. Lipid Profile, Lipoprotein Subfractions, and Fluidity of Membranes in Children and Adolescents with Depressive Disorder: Effect of Omega-3 Fatty Acids in a Double-Blind Randomized Controlled Study. *Biomolecules*. 10.
- KEENAN, K., HIPWELL, A. E., CLASS, Q. A. & MBAYIWA, K. 2018. Extending the developmental origins of disease model: Impact of preconception stress exposure on offspring neurodevelopment. *Dev Psychobiol*, 60, 753-764.
- KENNEDY, M., KREPPNER, J., KNIGHTS, N., KUMSTA, R., MAUGHAN, B., GOLM, D., RUTTER, M., SCHLOTZ, W. & SONUGA-BARKE, E. J. 2016. Early severe institutional deprivation is associated with a persistent variant of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: clinical presentation, developmental continuities and life circumstances in the English and Romanian Adoptees study. *J Child Psychol Psychiatry*, 57, 1113-25.
- KENNEDY, P. J. & SHAPIRO, M. L. 2009. Motivational states activate distinct hippocampal representations to guide goal-directed behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 10805-10.
- KERESZTES, A., NGO, C. T., LINDENBERGER, U., WERKLE-BERGNER, M. & NEWCOMBE, N. S. 2018. Hippocampal Maturation Drives Memory from Generalization to Specificity. *Trends Cogn Sci*, 22, 676-686.
- KETTENMANN, H., KIRCHHOFF, F. & VERKHRATSKY, A. 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77, 10-8.
- KHALFAN, A. F., CAMPISI, S. C., LO, R. F., MCCRINDLE, B. W. & KORCZAK, D. J. 2023. The association between adolescent depression and dyslipidemia. *J Affect Disord*, 338, 239-245.
- KIEHN, O. 2006. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci*, 29, 279-306.
- KITADA, M., XU, J., OGURA, Y., MONNO, I. & KOYA, D. 2020. Manganese Superoxide Dismutase Dysfunction and the Pathogenesis of Kidney Disease. *Front Physiol*, 11, 755.

- KLEIN, D. N., SHANKMAN, S. A., LEWINSOHN, P. M. & SEELEY, J. R. 2009. Subthreshold depressive disorder in adolescents: predictors of escalation to full-syndrome depressive disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 48, 703-710.
- KLEIN, Z. A. & ROMEO, R. D. 2013. Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal stress responsiveness before and after puberty in rats. *Horm Behav*, 64, 357-63.
- KLIMSTRA, T. A., HALE, W. W., RAAIJMAKERS, Q. A., BRANJE, S. J. & MEEUS, W. H. 2009. Maturation of personality in adolescence. *J Pers Soc Psychol*, 96, 898-912.
- KNUTSON, B., BHANJI, J. P., COONEY, R. E., ATLAS, L. Y. & GOTLIB, I. H. 2008. Neural responses to monetary incentives in major depression. *Biol Psychiatry*, 63, 686-92.
- KOGAN, J. H., FRANKLAND, P. W. & SILVA, A. J. 2000. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*, 10, 47-56.
- KOHEN, R. & NYSKA, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 30, 620-50.
- KÖHLER, O., BENROS, M. E., NORDENTOFT, M., FARKOUH, M. E., IYENGAR, R. L., MORS, O. & KROGH, J. 2014. Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Psychiatry*, 71, 1381-91.
- KONRAD, K. & MELZACK, R. 1975. Novelty-enhancement effects associated with early sensory-social isolation. *The Developmental Neuropsychology of Sensory Deprivation*. Academic Press, New York, 253-276.
- KRAVITZ, A. V. & MATIKAINEN-ANKNEY, B. A. 2020. Motor Control: Memory and Motor Control in the Dorsal Striatum. *Curr Biol*, 30, R1366-r1368.
- KREPPNER, J. M., O'CONNOR, T. G. & RUTTER, M. 2001. Can inattention/overactivity be an institutional deprivation syndrome? *J Abnorm Child Psychol*, 29, 513-28.
- KRINGELBACH, M. L. & BERRIDGE, K. C. 2016. Neuroscience of reward, motivation, and drive. *Recent developments in neuroscience research on human motivation*. Emerald Group Publishing Limited.
- KRISHNAMURTHY, P. & WADHWANI, A. 2012. Antioxidant enzymes and human health. *Antioxidant enzyme*, 1, 3-18.
- KUCZENSKI, R. & SEGAL, D. 1989. Concomitant characterization of behavioral and striatal neurotransmitter response to amphetamine using in vivo microdialysis. *J Neurosci*, 9, 2051-65.
- LAIBLE, D., CARLO, G. & RAFFAELLI, M. 2000. The Differential Relations of Parent and Peer Attachment to Adolescent. *J Youth and Adol*, 29, 45-59.
- LAMERS, F., VOGELZANGS, N., MERIKANGAS, K. R., DE JONGE, P., BEEKMAN, A. T. & PENNINX, B. W. 2013. Evidence for a differential role of HPA-axis function, inflammation and metabolic syndrome in melancholic versus atypical depression. *Mol Psychiatry*, 18, 692-9.
- LANDSTEDT, E. & ALMQUIST, Y. B. 2019. Intergenerational patterns of mental health problems: the role of childhood peer status position. *BMC Psychiatry*. 19, 286.
- LAPIZ, M. D., FULFORD, A., MUCHIMAPURA, S., MASON, R., PARKER, T. & MARSDEN, C. A. 2003. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci Behav Physiol*, 33, 13-29.
- LAUBACH, M., AMARANTE, L. M., SWANSON, K. & WHITE, S. R. 2018. What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *eNeuro*, 5.
- LAVIGNE, G. L., VALLERAND, R. J. & CREVIER-BRAUD, L. 2011. The fundamental need to belong: on the distinction between growth and deficit-reduction orientations. *Pers Soc Psychol Bull*, 37, 1185-201.
- LAVIOLA, G., MACRÌ, S., MORLEY-FLETCHER, S. & ADRIANI, W. 2003. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 19-31.

- LAWSON, L. J., PERRY, V. H., DRI, P. & GORDON, S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39, 151-70.
- LAZIC, S. E. & ESSIUX, L. 2013. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neurosci*, 14, 37.
- LE MAGUERESSE, C. & MONYER, H. 2013. GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. *Neuron*, 77, 388-405.
- LEBLANC, H. & RAMIREZ, S. 2020. Linking Social Cognition to Learning and Memory. *J Neurosci*, 40, 8782-8798.
- LEBOVITZ, R. M., ZHANG, H., VOGEL, H., CARTWRIGHT, J., JR., DIONNE, L., LU, N., HUANG, S. & MATZUK, M. M. 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9782-7.
- LEE, J. W. & JUNG, M. W. 2017. Separation or binding? Role of the dentate gyrus in hippocampal mnemonic processing. *Neurosci Biobehav Rev*, 75, 183-194.
- LEE, K. & AN, S. Y. 2023. Anatomical and Functional Comparison of the Caudate Tail in Primates and the Tail of the Striatum in Rodents: Implications for Sensory Information Processing and Habitual Behavior. *Mol Cells*. 46, 461-469.
- LEGAULT, M. & WISE, R. A. 2001. Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: dependence on impulse flow from the ventral subiculum and glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci*, 13, 819-28.
- LENNARZ, W. J. & LANE, M. D. 2013. Encyclopedia of biological chemistry, Academic Press.
- LEUSSIS, M. P. & BOLIVAR, V. J. 2006. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev*, 30, 1045-64.
- LEVER, C., BURTON, S. & O'KEEFE, J. 2006. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev Neurosci*, 17, 111-33.
- LI, C. T., SU, T. P., WANG, S. J., TU, P. C. & HSIEH, J. C. 2015. Prefrontal glucose metabolism in medication-resistant major depression. *Br J Psychiatry*, 206, 316-23.
- LI, Y., HUANG, T. T., CARLSON, E. J., MELOV, S., URSELL, P. C., OLSON, J. L., NOBLE, L. J., YOSHIMURA, M. P., BERGER, C., CHAN, P. H., WALLACE, D. C. & EPSTEIN, C. J. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, 11, 376-81.
- LIANG, N. Y. & RUTLEDGE, C. O. 1982. Comparison of the release of [3H] dopamine from isolated corpus striatum by amphetamine, fenfluramine and unlabelled dopamine. *Biochem pharmacol*, 31, 983-992.
- LILJEHOLM, M. & O'DOHERTY, J. P. 2012. Contributions of the striatum to learning, motivation, and performance: an associative account. *Trends Cogn Sci*, 16, 467-75.
- LISTER, R. G. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 92, 180-5.
- LIU, T., ZHONG, S., LIAO, X., CHEN, J., HE, T., LAI, S. & JIA, Y. 2015. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PLoS One*, 10, e0138904.
- LIU, Y., ZHAO, J. & GUO, W. 2018. Emotional Roles of Mono-Aminergic Neurotransmitters in Major Depressive Disorder and Anxiety Disorders. *Front Psychol*, 9, 2201.
- ŁOJKO, D. & RYBAKOWSKI, J. K. 2017. Atypical depression: current perspectives. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 13, 2447-2456.
- LONDON, T. D., LICHOLAI, J. A., SZCZOT, I., ALI, M. A., LEBLANC, K. H. & FOBBS, W. C. 2018. Coordinated Ramping of Dorsal Striatal Pathways preceding Food Approach and Consumption. *J Neurosci*. 38, 3547-3558.
- LOVALLO, W. R. 2013. Early life adversity reduces stress reactivity and enhances impulsive behavior: Implications for health behaviors. *Int j psychophysiol*, 90, 8-16.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.

- LUKES, J. L., MOKIN, M. V., SCHOLL, J. L. & FORSTER, G. L. 2009. Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Horm Behav*, 55, 248-56.
- MAASWINKEL, H., BAARS, A. M., GISPEN, W. H. & SPRUIJT, B. M. 1996. Roles of the basolateral amygdala and hippocampus in social recognition in rats. *Physiol Behav*, 60, 55-63.
- MACIEJEWSKI, D., HILLEGERS, M. & PENNINX, B. 2018. Offspring of parents with mood disorders: time for more transgenerational research, screening and preventive intervention for this high-risk population. *Curr Opin Psychiatry*, 31, 349-357.
- MADAN, C. R. 2017. Motivated cognition: Effects of reward, emotion, and other motivational factors across a variety of cognitive domains. *Collabra: Psychology*, 3, 24.
- MADRIGAL, J. L., OLIVENZA, R., MORO, M. A., LIZASOAIN, I., LORENZO, P., RODRIGO, J. & LEZA, J. C. 2001. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 24, 420-9.
- MAES, M., GALECKI, P., CHANG, Y. S. & BERK, M. 2011. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35, 676-92.
- MAES, M., WAUTERS, A., NEELS, H., SCHARPÉ, S., VAN GASTEL, A., D'HONDT, P., PEETERS, D., COSYNS, P. & DESNYDER, R. 1995. Total serum protein and serum protein fractions in depression: relationships to depressive symptoms and glucocorticoid activity. *J Affect Disord*, 34, 61-9.
- MAJIMA, H. J., OBERLEY, T. D., FURUKAWA, K., MATTSON, M. P., YEN, H. C., SZWEDA, L. I. & ST CLAIR, D. K. 1998. Prevention of mitochondrial injury by manganese superoxide dismutase reveals a primary mechanism for alkaline-induced cell death. *J Biol Chem*, 273, 8217-24.
- MALIK, R., LI, Y., SCHAMILOGLU, S. & SOHAL, V. S. 2022. Top-down control of hippocampal signal-to-noise by prefrontal long-range inhibition. *Cell*, 185, 1602-1617.e17.
- MARAZZITI, D., MUCCI, F. & FONTENELLE, L. F. 2018. Immune system and obsessive-compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 93, 39-44.
- MARGARITELIS, N. V., VESKOUKIS, A. S., PASCHALIS, V., VRABAS, I. S., DIPLA, K., ZAFEIRIDIS, A., KYPAROS, A. & NIKOLAIDIS, M. G. 2015. Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers*, 20, 97-108.
- MARINKOVIĆ, P., PESIĆ, V., LONCAREVIĆ, N., SMILJANIĆ, K., KANAZIR, S. & RUZDIJIĆ, S. 2007. Behavioral and biochemical effects of various food-restriction regimens in the rats. *Physiol Behav*, 92, 492-9.
- MARTIN, J. L., MAGISTRETTI, P. J. & ALLAMAN, I. 2013. Regulation of neurotrophic factors and energy metabolism by antidepressants in astrocytes. *Curr Drug Targets*, 14, 1308-21.
- MASI, A. & QUINTANA, D. S. 2015. Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 20, 440-6.
- MASON, G. J. 1991. Stereotypies and suffering. *Behav Processes*, 25, 103-15.
- MATSUMOTO, K., FUJIWARA, H., ARAKI, R. & YABE, T. 2019. Post-weaning social isolation of mice: A putative animal model of developmental disorders. *J Pharmacol Sci*, 141, 111-118.
- MCCABE, C., COWEN, P. J. & HARMER, C. J. 2009. Neural representation of reward in recovered depressed patients. *Psychopharmacology (Berl)*, 205, 667-77.
- MCCAIN, J. A. 2009. Antidepressants and suicide in adolescents and adults: a public health experiment with unintended consequences? *P t*, 34, 355-78.
- MCCORMICK, C. M., MATHEWS, I. Z., THOMAS, C. & WATERS, P. 2010. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn*, 72, 73-85.

- MCCOURT, W. F., GURRERA, R. J. & CUTTER, H. S. 1993. Sensation seeking and novelty seeking. Are they the same? *J Nerv Ment Dis*, 181, 309-12.
- MCINTOSH, L. J., HONG, K. E. & SAPOLSKY, R. M. 1998. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res*, 791, 209-14.
- MCMAKIN, D. L., OLINO, T. M., PORTA, G., DIETZ, L. J., EMSLIE, G., CLARKE, G., WAGNER, K. D., ASARNOW, J. R., RYAN, N. D., BIRMAHER, B., SHAMSEDEEN, W., MAYES, T., KENNARD, B., SPIRITO, A., KELLER, M., LYNCH, F. L., DICKERSON, J. F. & BRENT, D. A. 2012. Anhedonia predicts poorer recovery among youth with selective serotonin reuptake inhibitor treatment-resistant depression. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 51, 404-11.
- MEINZER, M. C., PETTIT, J. W., LEVENTHAL, A. M. & HILL, R. M. 2012. Explaining the covariance between attention-deficit hyperactivity disorder symptoms and depressive symptoms: the role of hedonic responsivity. *J Clin Psychol*, 68, 1111-21.
- MEIRA, T., LEROY, F., BUSS, E. W., OLIVA, A., PARK, J. & SIEGELBAUM, S. A. 2018. A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 critical for social memory dynamics. *Nat Commun*, 9, 4163.
- MELLO, A. F., JURUENA, M. F., PARIANTE, C. M., TYRKA, A. R., PRICE, L. H., CARPENTER, L. L. & DEL PORTO, J. A. 2007. Depression and stress: is there an endophenotype?. *Braz J Psychiatry*, 29 Suppl 1, S13-8.
- MIAO, L. & ST CLAIR, D. K. 2009. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*, 47, 344-56.
- MIKULINCER, M. & SHAVER, P. R. 2010. Attachment in adulthood: Structure, dynamics, and change, Guilford Publications.
- MILER, M. 2017. Uticaj citrusnih flavanona na tiroidnu homeostazu i lipidni status starih pacova. University of Belgrade, Faculty of Biology, 1-150.
- MINIKSAR, D. Y. & GÖÇMEN, A. Y. 2022. Childhood depression and oxidative stress. *The Egypt J Neurology, Psychiatry, and Neurosurgery*, 58.
- MISRA, H. P. & FRIDOVICH, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247, 3170-5.
- MODIN, B., OSTBERG, V. & ALMQUIST, Y. 2011. Childhood peer status and adult susceptibility to anxiety and depression. A 30-year hospital follow-up. *J Abnorm Child Psychol*, 39, 187-99.
- MOGENSON, G. J., JONES, D. L. & YIM, C. Y. 1980. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol*, 14, 69-97.
- MOGENSON, G. J. & YANG, C. R. 1991. The contribution of basal forebrain to limbic-motor integration and the mediation of motivation to action. *Adv Exp Med Biol*, 295, 267-90.
- MONDELLI, V., VERNON, A. C., TURKHEIMER, F., DAZZAN, P. & PARIANTE, C. M. 2017. Brain microglia in psychiatric disorders. *Lancet Psychiatry*, 4, 563-572.
- MONTAGRIN, A. & SAIOTE, C. 2018. The social hippocampus. *Hippocampus*, 28, 672-679.
- MONTGOMERY, K. C. 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 48, 254-60.
- MORA, F., SWEENEY, K., ROLLS, E. & SANGUINETTI, A. 1976. Spontaneous firing rate of neurones in the prefrontal cortex of the rat: evidence for a dopaminergic inhibition. *Brain Research*, 116, 516-522.
- MORELAND, R. L. 1987. The formation of small groups. In C. Hendrick (Ed.), *Group processes* (pp. 80-110). Sage Publications, Inc.
- MORGAN, J. I. & CURRAN, T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*, 14, 421-51.
- MORRISON, H., YOUNG, K., QURESHI, M., ROWE, R. K. & LIFSHITZ, J. 2017. Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Sci Rep*, 7, 13211.

- MOSER, E., MOSER, M. B. & ANDERSEN, P. 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci*, 13, 3916-25.
- MOY, S., NADLER, J., PEREZ, A., BARBARO, R., JOHNS, J., MAGNUSON, T., PIVEN, J. & CRAWLEY, J. 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3, 287-302.
- NANDI, A. & YAN, L. J. 2019. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019, 9613090.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL PANEL ON ADOLESCENT, P. & CHILDBEARING 1987. In: HOFFERTH, S. L. & HAYES, C. D. (eds.) *Risking the Future: Adolescent Sexuality, Pregnancy, and Childbearing, Volume II: Working Papers and Statistical Appendices*. Washington (DC): National Academies Press (US). Copyright © National Academy of Sciences.
- NAVARRO-ARÉVALO, A. & SÁNCHEZ-DEL-PINO, M. J. 1998. Age and exercise-related changes in lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in liver and soleus muscle tissues of rats. *Mech Ageing Dev*, 104, 91-102.
- NEMEROFF, C. C. 2004. Early-Life Adversity, CRF Dysregulation, and Vulnerability to Mood and Anxiety Disorders. *Psychopharmacol Bull*, 38, 14-20.
- NG, F., BERK, M., DEAN, O. & BUSH, A. I. 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11, 851-76.
- NGUYEN, T. V., KOSOFSKY, B. E., BIRNBAUM, R., COHEN, B. M. & HYMAN, S. E. 1992. Differential expression of c-fos and zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4270-4.
- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F. & HELMCHEN, F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-8.
- OISHI, K. & MACHIDA, K. 2002. Different effects of immobilization stress on the mRNA expression of antioxidant enzymes in rat peripheral organs. *Scand J Clin Lab Invest*, 62, 115-21.
- OLAH, M., BIBER, K., VINET, J. & BODDEKE, H. W. 2011. Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 10, 108-18.
- OLDFIELD, J., HUMPHREY, N. & HEBRON, J. 2016. The role of parental and peer attachment relationships and school connectedness in predicting adolescent mental health outcomes. *Child Adolesc Ment Health*, 21, 21-29.
- OLSON, E. A., KAISER, R. H., PIZZAGALLI, D. A., RAUCH, S. L. & ROSSO, I. M. 2018. Anhedonia in Trauma-Exposed Individuals: Functional Connectivity and Decision-Making Correlates. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*, 3, 959-967.
- OPPENHEIM, R. W. 1981. Ontogenetic adaptations and retrogressive processes in the development of the nervous system and behavior: A neuroembryological perspective. *Maturation and development: Biological and psychological perspectives*, 73-109.
- ORIHUELA, R., MCPHERSON, C. A. & HARRY, G. J. 2016. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, 173, 649-65.
- PAE, C. U., MARKS, D. M., HAN, C. & PATKAR, A. A. 2008. Does minocycline have antidepressant effect? *Biomed Pharmacother*, 62, 308-11.
- PAGE, C. E. & COUTELLIER, L. 2019. Prefrontal excitatory/inhibitory balance in stress and emotional disorders: Evidence for over-inhibition. *Neurosci Biobehav Rev*, 105, 39-51.
- PAGLIA, D. E. & VALENTINE, W. N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70, 158-69.
- PALMITER, R. D. 2008. Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. *Ann N Y Acad Sci*, 1129, 35-46.
- PAMPLONA, R. 2008. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 1249-62.

- PANKSEPP, J., SIVIY, S. & NORMANSELL, L. 1984. The psychobiology of play: theoretical and methodological perspectives. *Neurosci Biobehav Rev*, 8, 465-92.
- PAOLICELLI, R. C., BOLASCO, G., PAGANI, F., MAGGI, L., SCIANNI, M., PANZANELLI, P., GIUSTETTO, M., FERREIRA, T. A., GUIDUCCI, E., DUMAS, L., RAGOZZINO, D. & GROSS, C. T. 2011. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333, 1456-8.
- PAPAKOSTAS, G. I., ONGÜR, D., IOSIFESCU, D. V., MISCHOULON, D. & FAVA, M. 2004. Cholesterol in mood and anxiety disorders: review of the literature and new hypotheses. *Eur Neuropsychopharmacol*, 14, 135-42.
- PAPILLOUD, A., GUILLOT DE SUDUIRAUT, I., ZANOLETTI, O., GROSSE, J. & SANDI, C. 2018. Peripubertal stress increases play fighting at adolescence and modulates nucleus accumbens CB1 receptor expression and mitochondrial function in the amygdala. *Transl Psychiatry*, 8, 156.
- PAREKH, A., SMEETH, D., MILNER, Y. & THURE, S. 2017. The Role of Lipid Biomarkers in Major Depression. *Healthcare (Basel)*, 5.
- PARKHURST, C. N., YANG, G., NINAN, I., SAVAS, J. N., YATES, J. R., LAFAILLE, J. J., HEMPSTEAD, B. L., LITTMAN, D. R. & GAN, W.-B. 2013. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 155, 1596-1609.
- PARODI, J. 2014. Motility, viability, and calcium in the sperm cells. *Syst Biol Reprod Med*, 60, 65-71.
- PAUS, T., KESHAVAN, M. & GIEDD, J. N. 2008. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci*, 9, 947-57.
- PAVKOVIC, Z., MILANOVIC, D., RUZDIJIC, S., KANAZIR, S. & PESIC, V. 2018. The influence of propofol anesthesia exposure on nonaversive memory retrieval and expression of molecules involved in memory process in the dorsal hippocampus in peripubertal rats. *Paediatr Anaesth*, 28, 537-546.
- PAVKOVIĆ, Ž., POTREBIĆ, M., KANAZIR, S. & PEŠIĆ, V. 2020. Motivation, risk-taking and sensation seeking behavior in propofol anesthesia exposed peripubertal rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 96, 109733.
- PAVKOVIĆ, Ž., SMILJANIĆ, K., KANAZIR, S., MILANOVIĆ, D. & PEŠIĆ, V. 2017. Brain molecular changes and behavioral alterations induced by propofol anesthesia exposure in peripubertal rats. *Paediatr Anaesth*, 27, 962-972.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th edn Elsevier Academic Press: Burlington. MA.
- PECORARO, N., DALLMAN, M. F., WARNE, J. P., GINSBERG, A. B., LAUGERO, K. D., LA FLEUR, S. E., HOUSHYAR, H., GOMEZ, F., BHARGAVA, A. & AKANA, S. F. 2006. From Malthus to motive: how the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. *Prog Neurobiol*, 79, 247-340.
- PELLIS, S. & PELLIS, V. 2009. *The playful brain: venturing to the limits of neuroscience*. Oneworld. Oxford.
- PELLIS, S. M., CASTAÑEDA, E., MCKENNA, M. M., TRAN-NGUYEN, L. T. & WHISHAW, I. Q. 1993. The role of the striatum in organizing sequences of play fighting in neonatally dopamine-depleted rats. *Neurosci Lett*, 158, 13-5.
- PELLIS, S. M. & PELLIS, V. C. 1998. Play fighting of rats in comparative perspective: a schema for neurobehavioral analyses. *Neurosci Biobehav Rev*, 23, 87-101.
- PELLIS, S. M., PELLIS, V. C. & HIMMLER, B. T. 2014. How play makes for a more adaptable brain: a comparative and neural perspective. *American Journal of Play*, 7, 73-98.
- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E. & BRILEY, M. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14, 149-67.
- PELTOLA, V., HUHTANIEMI, I. & AHOTUPA, M. 1992. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl*, 13, 450-5.

- PENG, Y. F., XIANG, Y. & WEI, Y. S. 2016. The significance of routine biochemical markers in patients with major depressive disorder. *Sci Rep*, 6, 34402.
- PENNINX, B. W., MILANESCHI, Y., LAMERS, F. & VOGELZANGS, N. 2013. Understanding the somatic consequences of depression: biological mechanisms and the role of depression symptom profile. *BMC Med*, 11, 129.
- PERELLÓ, M., CHACON, F., CARDINALI, D. P., ESQUIFINO, A. I. & SPINEDI, E. 2006. Effect of social isolation on 24-h pattern of stress hormones and leptin in rats. *Life sciences*, 78, 1857-1862.
- PERLMAN, G., TANTI, A. & MECHAWAR, N. 2021. Parvalbumin interneuron alterations in stress-related mood disorders: A systematic review. *Neurobiol Stress*, 15, 100380.
- PESIĆ, V., JANAC, B., JELENKOVIĆ, A., VOROBYOV, V. & PROLIĆ, Z. 2004. Non-linearity in combined effects of ELF magnetic field and amphetamine on motor activity in rats. *Behav Brain Res*, 150, 223-7.
- PESIC, V., MARINKOVIC, P., JANAC, B., IGNJATOVIC, S., POPIC, J., KANAZIR, S. & RUZDIJIC, S. 2010. Changes of behavioral parameters during long-term food restriction in middle-aged Wistar rats. *Physiol Behav*, 101, 672-8.
- PIAZZA, P. V., DEROCHE, V., DEMINIÈRE, J. M., MACCARI, S., LE MOAL, M. & SIMON, H. 1993. Corticosterone in the range of stress-induced levels possesses reinforcing properties: implications for sensation-seeking behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 11738-42.
- PICCINI, P. P. 2003. Dopamine transporter: basic aspects and neuroimaging. *Mov Disord*, 18 Suppl 7, S3-8.
- PINE, D. S., COHEN, E., COHEN, P. & BROOK, J. 1999. Adolescent depressive symptoms as predictors of adult depression: moodiness or mood disorder? *Am J Psychiatry*, 156, 133-5.
- PINKHAM, A. E., HOPFINGER, J. B., PELPHREY, K. A., PIVEN, J. & PENN, D. L. 2008. Neural bases for impaired social cognition in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Schizophr Res*, 99, 164-75.
- PISKOROWSKI, R. A., NASRALLAH, K., DIAMANTOPOULOU, A., MUKAI, J., HASSAN, S. I., SIEGELBAUM, S. A., GOGOS, J. A. & CHEVALEYRE, V. 2016. Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Neuron*, 89, 163-76.
- PIZZAGALLI, D. A. 2014. Depression, stress, and anhedonia: toward a synthesis and integrated model. *Annu Rev Clin Psychol*, 10, 393-423.
- PODGORAC, J., PEŠIĆ, V., PAVKOVIĆ, Ž., MARTAĆ, L., KANAZIR, S., FILIPOVIĆ, L. & SEKULIĆ, S. 2016. Early physical and motor development of mouse offspring exposed to valproic acid throughout intrauterine development. *Behav Brain Res*, 311, 99-109.
- POORADL, M., ALIPOUR, A., DEHKORDI, M. A. & FARROKHI, M. R. 2013. Associations between self-reported anxiety and serum lipid, lipoprotein concentrations and platelets in healthy men. *Neurology Asia*, 18.
- PORRINO, L. J., LUCIGNANI, G., DOW-EDWARDS, D. & SOKOLOFF, L. 1984. Correlation of dose-dependent effects of acute amphetamine administration on behavior and local cerebral metabolism in rats. *Brain Res*, 307, 311-20.
- POTHUIZEN, H. H., ZHANG, W. N., JONGEN-RÊLO, A. L., FELDON, J. & YEE, B. K. 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci*, 19, 705-12.
- POTREBIĆ, M., PAVKOVIĆ, Ž., LONČAREVIĆ-VASILJKOVIĆ, N., KANAZIR, S. & PEŠIĆ, V. 2021. Altered hedonic, novelty-, stress- and D-amphetamine-induced response due to social isolation in peripuberty. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 108, 110186.
- POTREBIĆ, M., PAVKOVIĆ, Ž., PUŠKAŠ, N. & PEŠIĆ, V. 2022a. The Influence of Social Isolation on Social Orientation, Sociability, Social Novelty Preference, and Hippocampal Parvalbumin-Expressing Interneurons in Peripubertal Rats - Understanding the Importance of Meeting Social Needs in Adolescence. *Front Behav Neurosci*, 16, 872628.

- POTREBIĆ, M. S., PAVKOVIĆ Ž, Z., SRBOVAN, M. M., DMURA, G. M. & PEŠIĆ, V. T. 2022b. Changes in the Behavior and Body Weight of Mature, Adult Male Wistar Han Rats after Reduced Social Grouping and Social Isolation. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 61, 615-623.
- POWELL, S. B., GEYER, M. A., GALLAGHER, D. & PAULUS, M. P. 2004. The balance between approach and avoidance behaviors in a novel object exploration paradigm in mice. *Behavioural brain research*, 152, 341-349.
- PRIMACK, B. A., SHENSA, A., SIDANI, J. E., WHAITE, E. O., LIN, L. Y., ROSEN, D., COLDITZ, J. B., RADOVIC, A. & MILLER, E. 2017. Social Media Use and Perceived Social Isolation Among Young Adults in the U.S. *Am J Prev Med*, 53, 1-8.
- PROVOST, J. S., HANGANU, A. & MONCHI, O. 2015. Neuroimaging studies of the striatum in cognition Part I: healthy individuals. *Front Syst Neurosci*, 9, 140.
- RADAKOVIC, S., SURBATOVIC, M., STANKOVIC, N. & FILIPOVIC, N. 2005. Promene koncentracije proteina u serumu ranjenika sa ratnom povredom. *Acta chirurgica iugoslavica*, 52, 59.
- RADI, R., TURRENS, J. F., CHANG, L. Y., BUSH, K. M., CRAPO, J. D. & FREEMAN, B. A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*, 266, 22028-34.
- RAHNEV, D. 2017. Top-down control of perceptual decision making by the prefrontal cortex. *Current Directions in Psychological Science*, 26, 464-469.
- RAJENDRAN, P., NANDAKUMAR, N., RENGARAJAN, T., PALANISWAMI, R., GNANADHAS, E. N., LAKSHMINARASIAH, U., GOPAS, J. & NISHIGAKI, I. 2014. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta*, 436, 332-47.
- RANKIN, C. H., ABRAMS, T., BARRY, R. J., BHATNAGAR, S., CLAYTON, D. F., COLOMBO, J., COPPOLA, G., GEYER, M. A., GLANZMAN, D. L., MARSLAND, S., MCSWEENEY, F. K., WILSON, D. A., WU, C. F. & THOMPSON, R. F. 2009. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem*, 92, 135-8.
- RANSOHOFF, R. M. & PERRY, V. H. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 27, 119-45.
- RATLIFF, B. B., ABDULMAHDI, W., PAWAR, R. & WOLIN, M. S. 2016. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal*, 25, 119-46.
- RAZ, S. 2013. Ameliorative effects of brief daily periods of social interaction on isolation-induced behavioral and hormonal alterations. *Physiology & behavior*, 116, 13-22.
- RAZALI, N. M. & WAH, Y. B. 2011. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics*, 2, 21-33.
- REPPUCCI, C. J., BROWN, L. A., CHAMBERS, A. Q. & VEENEMA, A. H. 2020. Wistar rats and C57BL/6 mice differ in their motivation to seek social interaction versus food in the Social versus Food Preference Test. *Physiol Behav*, 227, 113162.
- RETANA-MÁRQUEZ, S., BONILLA-JAIME, H., VÁZQUEZ-PALACIOS, G., DOMÍNGUEZ-SALAZAR, E., MARTÍNEZ-GARCÍA, R. & VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA, J. 2003. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 28, 207-27.
- ROBBINS, T. W., JONES, G. H. & WILKINSON, L. S. 1996. Behavioural and neurochemical effects of early social deprivation in the rat. *J Psychopharmacol*, 10, 39-47.
- ROBERTS, A. G. & LOPEZ-DURAN, N. L. 2019. Developmental influences on stress response systems: Implications for psychopathology vulnerability in adolescence. *Compr Psychiatry*, 88, 9-21.
- ROBERTS, J. L. & LUNDBLAD, J. R. 2009. Regulation of Neuronal Gene Expression and Protein Synthesis. *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*, 391.
- RODGERS, R. J., HALLER, J., HOLMES, A., HALASZ, J., WALTON, T. J. & BRAIN, P. F. 1999. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav*, 68, 47-53.

- RODRIGUES-AMORIM, D., RIVERA-BALTANÁS, T., SPUCH, C., CARUNCHO, H. J., GONZÁLEZ-FERNANDEZ, Á., OLIVARES, J. M. & AGÍS-BALBOA, R. C. 2018. Cytokines dysregulation in schizophrenia: A systematic review of psychoneuroimmune relationship. *Schizophr Res*, 197, 19-33.
- ROMENS, S. E., CASEMENT, M. D., MCALOON, R., KEENAN, K., HIPWELL, A. E., GUYER, A. E. & FORBES, E. E. 2015. Adolescent girls' neural response to reward mediates the relation between childhood financial disadvantage and depression. *J Child Psychol Psychiatry*, 56, 1177-84.
- ROMEO, R. D., KARATSOREOS, I. N. & MCEWEN, B. S. 2006. Pubertal maturation and time of day differentially affect behavioral and neuroendocrine responses following an acute stressor. *Horm Behav*, 50, 463-8.
- ROSA, A. C., CORSI, D., CAVI, N. & BRUNI, N. 2021. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules*. 26.
- ROSEN, M., KAHAN, E. & DERAZNE, E. 1987. The influence of the first-mating age of rats on the number of pups born, their weights and their mortality. *Lab Anim*, 21, 348-52.
- ROSENZWEIG, M. R. & BENNETT, E. L. 1976. *Enriched environments: Facts, factors, and fantasies*, Springer.
- ROTLANT, D., MÁRQUEZ, C., NADAL, R. & ARMARIO, A. 2010. The brain pattern of c-fos induction by two doses of amphetamine suggests different brain processing pathways and minor contribution of behavioural traits. *Neuroscience*, 168, 691-705.
- RUBENSTEIN, J. L. & MERZENICH, M. M. 2003. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav*, 2, 255-67.
- RUBIN, K. H., COPLAN, R. J. & BOWKER, J. C. 2009. Social withdrawal in childhood. *Annu Rev Psychol*, 60, 141-71.
- RUEGER, S. Y., MALECKI, C. K., PYUN, Y., AYCOCK, C. & COYLE, S. 2016. A meta-analytic review of the association between perceived social support and depression in childhood and adolescence. *Psychol Bull*, 142, 1017-1067.
- RUSSELL, W. M. S. & BURCH, R. L. 1959. *The principles of humane experimental technique*, Methuen.
- RYGULA, R., ABUMARIA, N., FLÜGGE, G., FUCHS, E., RÜTHER, E. & HAVEMANN-REINECKE, U. 2005. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res*, 162, 127-34.
- SAAVEDRA-RODRÍGUEZ, L. & FEIG, L. A. 2013. Chronic social instability induces anxiety and defective social interactions across generations. *Biol Psychiatry*, 73, 44-53.
- SALAGRE, E., FERNANDES, B. S., DODD, S., BROWNSTEIN, D. J. & BERK, M. 2016. Statins for the treatment of depression: A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Affect Disord*, 200, 235-42.
- SALAMONE, J. D. & CORREA, M. 2002. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res*, 137, 3-25.
- SANBERG, P. R., ZOLOTY, S. A., WILLIS, R., TICARICH, C. D., RHOADS, K., NAGY, R. P., MITCHELL, S. G., LAFOREST, A. R., JENKS, J. A., HARKABUS, L. J. & ET AL. 1987. Digiscan activity: automated measurement of thigmotactic and stereotypic behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 27, 569-72.
- SÁNCHEZ, M. M., AGUADO, F., SANCHEZ-TOSCANO, F. & SAPHIER, D. 1998. Neuroendocrine and immunocytochemical demonstrations of decreased hypothalamo-pituitary-adrenal axis responsiveness to restraint stress after long-term social isolation. *Endocrinology*, 139, 579-587.
- SAPOLSKY, R. M., ROMERO, L. M. & MUNCK, A. U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, 21, 55-89.

- SAWYER, D. B. 2011. Oxidative stress in heart failure: what are we missing? *Am J Med Sci*, 342, 120-4.
- SCACCIANOCE, S., DEL BIANCO, P., PAOLONE, G., CAPRIOLI, D., MODAFFERI, A. M., NENCINI, P. & BADIANI, A. 2006. Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. *Behavioural brain research*, 168, 323-325.
- SCANLON, S. M., WILLIAMS, D. C. & SCHLOSS, P. 2001. Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. *Biochemistry*, 40, 10507-13.
- SCAPAGNINI, G., DAVINELLI, S., DRAGO, F., DE LORENZO, A. & ORIANI, G. 2012. Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? *CNS Drugs*, 26, 477-90.
- SCHAFER, M. & SCHILLER, D. 2018. Navigating Social Space. *Neuron*, 100, 476-489.
- SCHRAMM, E. & WAISMAN, A. 2022. Microglia as Central Protagonists in the Chronic Stress Response. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 9.
- SCHWALLER, B. 2012. The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca²⁺ buffer proteins in excitable cells. *Biochim Biophys Acta*, 1820, 1294-303.
- SCHWEINFURTH, M. K. 2020. The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Elife*, 9, e54020.
- SEIBENHENER, M. L. & WOOTEN, M. C. 2015. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*, e52434.
- SELTEN, M. & VAN BOKHOVEN, H. 2018. Inhibitory control of the excitatory/inhibitory balance in psychiatric disorders. *F1000Res*, 7, 23.
- SELYE, H. 1936. Short letter. *Nature*, 138, 32.
- SEMPLE, B. D., BLOMGREN, K., GIMLIN, K., FERRIERO, D. M. & NOBLE-HAEUSSLEIN, L. J. 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 106-107, 1-16.
- SENGUPTA, P. 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*, 4, 624-30.
- SERRA, M., PISU, M., FLORIS, I. & BIGGIO, G. 2005. Social isolation-induced changes in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Stress*, 8, 259-264.
- SERVAN-SCHREIBER, D., CARTER, C. S., BRUNO, R. M. & COHEN, J. D. 1998. Dopamine and the mechanisms of cognition: Part II. D-amphetamine effects in human subjects performing a selective attention task. *Biol Psychiatry*, 43, 723-9.
- SHAO, F., WANG, X., WU, H., WU, Q. & ZHANG, J. 2022. Microglia and Neuroinflammation: Crucial Pathological Mechanisms in Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*, 14, 825086.
- SHARABI, K., TAVARES, C. D., RINES, A. K. & PUIGSERVER, P. 2015. Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol Aspects Med*, 46, 21-33.
- SHARMA, K. 2017. Mitochondrial Dysfunction in the Diabetic Kidney. *Adv Exp Med Biol*, 982, 553-562.
- SHARP, T., ZETTERSTRÖM, T., LJUNGBERG, T. & UNGERSTEDT, U. 1987. A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain Res*, 401, 322-30.
- SHENG, M. & GREENBERG, M. E. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4, 477-85.
- SHRINER, A. M., DREVER, F. R. & METZ, G. A. 2009. The development of skilled walking in the rat. *Behav Brain Res*, 205, 426-35.
- SIKKA, S. C. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem*, 8, 851-62.
- SILVEIRA, K. M., SARTIM, A. G., VIEIRA, L., LISBOA, S. F. & WEGENER, G. 2023. Decreased sensitivity to antidepressant drugs in Wistar Hannover rats submitted to two animal models of depression. 35, 35-49.

- SIWEK, M., SOWA-KUĆMA, M., DUDEK, D., STYCZEŃ, K., SZEWCZYK, B., KOTARSKA, K., MISZTAKK, P., PILC, A., WOLAK, M. & NOWAK, G. 2013. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacol Rep*, 65, 1558-71.
- SMITH, K. S. & BERRIDGE, K. C. 2005. The ventral pallidum and hedonic reward: neurochemical maps of sucrose "liking" and food intake. *J Neurosci*, 25, 8637-49.
- SMITH, K. S. & BERRIDGE, K. C. 2007. Opioid limbic circuit for reward: interaction between hedonic hotspots of nucleus accumbens and ventral pallidum. *J Neurosci*, 27, 1594-605.
- SO, H. C., CHAU, C. K., CHENG, Y. Y. & SHAM, P. C. 2021. Causal relationships between blood lipids and depression phenotypes: a Mendelian randomisation analysis. *Psychol Med*, 51, 2357-2369.
- SONG, X., ZHANG, Z., ZHANG, R., WANG, M., LIN, D., LI, T., SHAO, J. & MA, X. 2018. Predictive markers of depression in hypertension. *Medicine (Baltimore)*, 97, e11768.
- SPANAGEL, R., HERZ, A. & SHIPPENBERG, T. S. 1992. Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2046-50.
- SPEAR, L. 2010. *The behavioral neuroscience of adolescence*, WW Norton & Company.
- SPEAR, L. P. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*, 24, 417-63.
- SPEAR, L. P. & BRAKE, S. C. 1983. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol*, 16, 83-109.
- SPELLMAN, T., RIGOTTI, M., AHMARI, S. E., FUSI, S., GOGOS, J. A. & GORDON, J. A. 2015. Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature*, 522, 309-14.
- SPIELBERGER, C. D. 2013. The effects of anxiety on complex learning. *Anxiety and behavior*, 361-398.
- SPINKA, M., NEWBERRY, R. C. & BEKOFF, M. 2001. Mammalian play: training for the unexpected. *Q Rev Biol*, 76, 141-68.
- STANSFIELD, K. H. & KIRSTEIN, C. L. 2006. Effects of novelty on behavior in the adolescent and adult rat. *Dev Psychobiol*, 48, 10-5.
- STEIMER, T. 2011. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci*, 13, 495-506.
- STEINBERG, L. & BELSKY, J. An evolutionary perspective on psychopathology in adolescence. Rochester symposium on developmental psychopathology, 1996. University of Rochester Press, 93-124.
- STEINBERG, L. & ICENOGLA, G. 2019. Using developmental science to distinguish adolescents and adults under the law. *Annual Review of Developmental Psychology*, 1, 21-40.
- STEINBERG, L., ICENOGLA, G., SHULMAN, E. P., BREINER, K., CHEIN, J., BACCHINI, D., CHANG, L., CHAUDHARY, N., GIUNTA, L. D., DODGE, K. A., FANTI, K. A., LANSFORD, J. E., MALONE, P. S., OBURU, P., PASTORELLI, C., SKINNER, A. T., SORBRING, E., TAPANYA, S., TIRADO, L. M. U., ALAMPAY, L. P., AL-HASSAN, S. M. & TAKASH, H. M. S. 2018. Around the world, adolescence is a time of heightened sensation seeking and immature self-regulation. *Dev Sci*, 21.
- STEVENSON, E. L. & CALDWELL, H. K. 2014. Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *Eur J Neurosci*, 40, 3294-301.
- STRÖMLAND, K. & PINAZO-DURÁN, M. D. 2002. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. *Alcohol Alcohol*, 37, 2-8.
- SUAREZ, E. C. 1999. Relations of trait depression and anxiety to low lipid and lipoprotein concentrations in healthy young adult women. *Psychosom Med*, 61, 273-9.
- SUGAMA, S., FUJITA, M., HASHIMOTO, M. & CONTI, B. 2007. Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience*, 146, 1388-99.

- SULZER, D., SONNERS, M. S., POULSEN, N. W. & GALLI, A. 2005. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol*, 75, 406-33.
- SUN, S., YANG, S., MAO, Y., JIA, X. & ZHANG, Z. 2015. Reduced cholesterol is associated with the depressive-like behavior in rats through modulation of the brain 5-HT1A receptor. *Lipids Health Dis*, 14, 22.
- SUTARIA, S., DEVAKUMAR, D., YASUDA, S. S., DAS, S. & SAXENA, S. 2019. Is obesity associated with depression in children? Systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*, 104, 64-74.
- TAKAO, K., SHOJI, H., HATTORI, S. & MIYAKAWA, T. 2016. Cohort Removal Induces Changes in Body Temperature, Pain Sensitivity, and Anxiety-Like Behavior. *Front Behav Neurosci*, 10, 99.
- TALANI, G., BIGGIO, F., LICHERI, V., LOCCI, V., BIGGIO, G. & SANNA, E. 2016. Isolation Rearing Reduces Neuronal Excitability in Dentate Gyrus Granule Cells of Adolescent C57BL/6J Mice: Role of GABAergic Tonic Currents and Neurosteroids. *Front Cell Neurosci*, 10, 158.
- TANAKA, K., OSAKO, Y., TAKAHASHI, K., HIDAKA, C., TOMITA, K. & YURI, K. 2019. Effects of post-weaning social isolation on social behaviors and oxytocinergic activity in male and female rats. *Heliyon*, 5, e01646.
- TAU, G. Z. & PETERSON, B. S. 2010. Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology*, 35, 147-68.
- TEMPLER, V. L., WISE, T. B., DAYAW, K. I. T. & DAYAW, J. N. T. 2018. Nonsocially housed rats (*Ratus norvegicus*) seek social interactions and social novelty more than socially housed counterparts. *J Comp Psychol*, 132, 240-252.
- TESTA, C. R. & STEINBERG, L. 2010. Depressive symptoms and health-related risk-taking in adolescence. *Suicide Life Threat Behav*, 40, 298-305.
- THANNICKAL, V. J. & FANBURG, B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, L1005-L1028.
- THAPAR, A., COLLISHAW, S., PINE, D. S. & THAPAR, A. K. 2012. Depression in adolescence. *The lancet*, 379, 1056-1067.
- TIBBOEL, H. & LIEFOOGHE, B. 2020. Attention for future reward. *Psychological Research*, 84, 706-712.
- TIWARI, B. K., PANDEY, K. B., ABIDI, A. B. & RIZVI, S. I. 2013. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *J Biomark*, 2013, 378790.
- TOFOLI, S. M. D. C., BAES, C. V. W., MARTINS, C. M. S. & JURUENA, M. 2011. Early life stress, HPA axis, and depression. *Psychology & Neuroscience*, 4, 229-234.
- TOMOVA, L., WANG, K. L., THOMPSON, T. & MATTHEWS, G. A. 2020. Acute social isolation evokes midbrain craving responses similar to hunger. *Nat Neurosci*. 23, 1597-1605.
- TORRES-PLATAS, S. G., COMEAU, S., RACHALSKI, A., BO, G. D., CRUCEANU, C., TURECKI, G., GIROS, B. & MECHAWAR, N. 2014. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation*, 11, 12.
- TOTH, M. 2015. Mechanisms of non-genetic inheritance and psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*, 40, 129-40.
- TOTH, M., MIKICS, E., TULOGDI, A., ALICZKI, M. & HALLER, J. 2011. Post-weaning social isolation induces abnormal forms of aggression in conjunction with increased glucocorticoid and autonomic stress responses. *Hormones and behavior*, 60, 28-36.
- TREADWAY, M. T. & ZALD, D. H. 2011. Reconsidering anhedonia in depression: lessons from translational neuroscience. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35, 537-555.
- TREIT, D., MENARD, J. & ROYAN, C. 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 44, 463-9.

- TREMBLAY, L. K., NARANJO, C. A., CARDENAS, L., HERRMANN, N. & BUSTO, U. E. 2002. Probing brain reward system function in major depressive disorder: altered response to dextroamphetamine. *Archives of general psychiatry*, 59, 409-416.
- TREMBLAY, M., LOWERY, R. L. & MAJEWSKA, A. K. 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol*, 8, e1000527.
- TREZZA, V., DAMSTEEGT, R., ACHTERBERG, E. J. & VANDERSCHUREN, L. J. 2011. Nucleus accumbens μ -opioid receptors mediate social reward. *J Neurosci*, 31, 6362-70.
- TSUCHIHASHI, M. 1923. Zur kenntnis der blutkatalase. *Biochem Z*, 140, 63-112.
- TWENGE, J. M., HAIDT, J., BLAKE, A. B., MCALLISTER, C., LEMON, H. & LE ROY, A. 2021. Worldwide increases in adolescent loneliness. *J Adolesc*, 93, 257-269.
- TWENGE, J. M., HISLER, G. C. & KRIZAN, Z. 2019. Associations between screen time and sleep duration are primarily driven by portable electronic devices: evidence from a population-based study of U.S. children ages 0-17. *Sleep Med*, 56, 211-218.
- TYNAN, R. J., NAICKER, S., HINWOOD, M., NALIVAICO, E., BULLER, K. M., POW, D. V., DAY, T. A. & WALKER, F. R. 2010. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun*, 24, 1058-68.
- TZANOULINO, S., RICCIO, O., DE BOER, M. W. & SANDI, C. 2014. Peripubertal stress-induced behavioral changes are associated with altered expression of genes involved in excitation and inhibition in the amygdala. *Transl Psychiatry*, 4, e410.
- UYLINGS, H. B., GROENEWEGEN, H. J. & KOLB, B. 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res*, 146, 3-17.
- VAN BAVEL, J. J., SWENCIONIS, J. K., O'CONNOR, R. C. & CUNNINGHAM, W. A. 2012. Motivated social memory: Belonging needs moderate the own-group bias in face recognition. *Journal of Experimental Social Psychology*, 48, 707-713.
- VAN DIJK, M. T. & FENTON, A. A. 2018. On How the Dentate Gyrus Contributes to Memory Discrimination. *Neuron*, 98, 832-845.e5.
- VAN GAALEN, M. M. & STECKLER, T. 2000. Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behav Brain Res*, 115, 95-106.
- VAN HEUKELUM, S., MARS, R. B., GUTHRIE, M., BUITELAAR, J. K., BECKMANN, C. F., TIESINGA, P. H. E., VOGT, B. A., GLENNON, J. C. & HAVENITH, M. N. 2020. Where is Cingulate Cortex? A Cross-Species View. *Trends Neurosci*, 43, 285-299.
- VAN HUNSEL, F., VAN GASTEL, A., NEELS, H., WAUTERS, A., DEMEDTS, P., BRUYLAND, K., DEMEESTER, I., SCHARPÉ, S., JANCA, A., SONG, C. & MAES, M. 1998. The influence of psychological stress on total serum protein and patterns obtained in serum protein electrophoresis. *Psychol Med*, 28, 301-9.
- VAN HUNSEL, F., WAUTERS, A., VANDOOOLAEGHE, E., NEELS, H., DEMEDTS, P. & MAES, M. 1996. Lower total serum protein, albumin, and beta- and gamma-globulin in major and treatment-resistant depression: effects of antidepressant treatments. *Psychiatry Res*, 65, 159-69.
- VANDERSCHUREN, L. J., ACHTERBERG, E. J. & TREZZA, V. 2016. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, 70, 86-105.
- VANDERSCHUREN, L. J., NIESINK, R. J., SPRUIJT, B. M. & VAN REE, J. M. 1995. Effects of morphine on different aspects of social play in juvenile rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 117, 225-31.
- VANDERSCHUREN, L. J., NIESINK, R. J. & VAN REE, J. M. 1997. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, 21, 309-26.
- VANDERSCHUREN, L. J. & TREZZA, V. 2014. What the laboratory rat has taught us about social play behavior: role in behavioral development and neural mechanisms. *Curr Top Behav Neurosci*, 16, 189-212.
- VARTY, G. B., PAULUS, M. P., BRAFF, D. L. & GEYER, M. A. 2000. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry*, 47, 864-73.

- VAVÁKOVÁ, M. & ĎURAČKOVÁ, Z. 2015. Markers of Oxidative Stress and Neuroprogression in Depression Disorder. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 898393.
- VERMA, P., HELLEMANS, K. G., CHOI, F. Y., YU, W. & WEINBERG, J. 2010. Circadian phase and sex effects on depressive/anxiety-like behaviors and HPA axis responses to acute stress. *Physiol Behav*, 99, 276-85.
- VESKOUKIS, A. S., NIKOLAIDIS, M. G., KYPAROS, A. & KOURETAS, D. 2009. Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radic Biol Med*, 47, 1371-4.
- VIDAL, J. D. 2017. The Impact of Age on the Female Reproductive System. *Toxicol Pathol*, 45, 206-215.
- VITIELLO, B. & ORDÓÑEZ, A. E. 2016. Pharmacological treatment of children and adolescents with depression. *Expert Opin Pharmacother*, 17, 2273-2279.
- VIVEROS, M., HERNANDEZ, R., MARTINEZ, I. & GONZALEZ, P. 1988. Effects of social isolation and crowding upon adrenocortical reactivity and behavior in the rat. *Revista española de fisiología*, 44, 315-321.
- VOLKOW, N. D., WANG, G. J., FOWLER, J. S., LOGAN, J., JAYNE, M., FRANCESCHI, D., WONG, C., GATLEY, S. J., GIFFORD, A. N., DING, Y. S. & PAPPAS, N. 2002. "Nonhedonic" food motivation in humans involves dopamine in the dorsal striatum and methylphenidate amplifies this effect. *Synapse*, 44, 175-80.
- VON FRIJTAG, J. C., SCHOT, M., VAN DEN BOS, R. & SPRUIJT, B. M. 2002. Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats. *Dev Psychobiol*, 41, 58-69.
- WALKER, F. R., BEYNON, S. B., JONES, K. A., ZHAO, Z., KONGSUI, R., CAIRNS, M. & NILSSON, M. 2014. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain Behav Immun*, 37, 1-14.
- WALKER, F. R., NILSSON, M. & JONES, K. 2013. Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. *Curr Drug Targets*, 14, 1262-76.
- WALTHER, A., CANNISTRACI, C. V., SIMONS, K., DURÁN, C., GERL, M. J., WEHRLI, S. & KIRSCHBAUM, C. 2018. Lipidomics in Major Depressive Disorder. *Front Psychiatry*, 9, 459.
- WANG, H., HE, Y., SUN, Z., REN, S., LIU, M., WANG, G. & YANG, J. 2022. Microglia in depression: an overview of microglia in the pathogenesis and treatment of depression. *J Neuroinflammation*, 19, 132.
- WANG, J., JIANG, C., CHEN, L., WU, S., LIN, J., GAO, L., XIE, B., ZHENG, D., YANG, R., LI, S., PAN, X. & LIAO, Y. 2016. A cross-sectional study to investigate the correlation between depression comorbid with anxiety and serum lipid levels. *Compr Psychiatry*, 69, 163-8.
- WANG, L. J., WU, M. S., HSU, H. J., WU, I. W., SUN, C. Y., CHOU, C. C., LEE, C. C., TSAI, C. R., TSAI, Y. C. & CHEN, C. K. 2012. The relationship between psychological factors, inflammation, and nutrition in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *Int J Psychiatry Med*, 44, 105-18.
- WARNER-SCHMIDT, J. L., VANOVER, K. E., CHEN, E. Y., MARSHALL, J. J. & GREENGARD, P. 2011. Antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are attenuated by antiinflammatory drugs in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9262-7.
- WEBER, M. D., GODBOUT, J. P. & SHERIDAN, J. F. 2017. Repeated Social Defeat, Neuroinflammation, and Behavior: Monocytes Carry the Signal. *Neuropsychopharmacology*, 42, 46-61.
- WEINTRAUB, A., SINGARAVELU, J. & BHATNAGAR, S. 2010. Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Res*, 1343, 83-92.
- WEISS, I. C., PRYCE, C. R., JONGEN-RÊLO, A. L., NANZ-BAHR, N. I. & FELDON, J. 2004. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural brain research*, 152, 279-295.

- WENZEL, J. M. & CHEER, J. F. 2018. Endocannabinoid Regulation of Reward and Reinforcement through Interaction with Dopamine and Endogenous Opioid Signaling. *Neuropsychopharmacology*, 43, 103-115.
- WILCOX, H. C. & ANTHONY, J. C. 2004. Child and adolescent clinical features as forerunners of adult-onset major depressive disorder: retrospective evidence from an epidemiological sample. *J Affect Disord*, 82, 9-20.
- WILLNER, P. 2017. Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. *Neurobiol Stress*, 6, 68-77.
- WISE, R. A. & BOZARTH, M. A. 1987. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological review*, 94, 469.
- WITTEKINDT, M. & KADDATZ, H. 2022. Different Methods for Evaluating Microglial Activation Using Anti-Ionized Calcium-Binding Adaptor Protein-1 Immunohistochemistry in the Cuprizone Model. *Cells*. 11.
- WITTMANN, B. C., BUNZECK, N., DOLAN, R. J. & DÜZEL, E. 2007. Anticipation of novelty recruits reward system and hippocampus while promoting recollection. *Neuroimage*, 38, 194-202.
- WOHLEB, E. S. & DELPECH, J. C. 2017. Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 79, 40-48.
- WOO, D., GILES, H., HOGG, M. & GOLDMAN, L. 2015. A social psychology of groups: An intergroup analysis. *Handbook of gangs and gang responses*. New York: Wiley-Blackwell, 186-212.
- WRIGHT, I. K., UPTON, N. & MARSDEN, C. A. 1991. Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. *Physiol Behav*, 50, 1129-32.
- YASSA, M. A. & STARK, C. E. 2011. Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci*, 34, 515-25.
- YATES, J. W., MEIJ, J. T., SULLIVAN, J. R., RICHTAND, N. M. & YU, L. 2007. Bimodal effect of amphetamine on motor behaviors in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett*, 427, 66-70.
- YIN, X. Y., CAI, Y., ZHU, Z. H., ZHAI, C. P., LI, J., JI, C. F., CHEN, P., WANG, J., WU, Y. M., CHAN, R. C. K., JIA, Q. F. & HUI, L. 2022. Associations of decreased serum total protein, albumin, and globulin with depressive severity of schizophrenia. *Front Psychiatry*, 13, 957671.
- YOUNG, I. S. & WOODSIDE, J. V. 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176-86.
- YOUNG, K. & MORRISON, H. 2018. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *J Vis Exp*.
- ZAIDAN, H., WNUK, A., ADERKA, I. M., KAJTA, M. & GAISLER-SALOMON, I. 2023. Pre-reproductive stress in adolescent female rats alters maternal care and DNA methylation patterns across generations. *Stress*, 26, 2201325.
- ZALETEL, I. 2016. Chronic stress, hippocampus and parvalbumin-positive interneurons: what do we know so far? *Rev Neurosci*. 27, 397-409.
- ZANOS, P., GEORGIU, P., WRIGHT, S. R., HOURANI, S. M., KITCHEN, I., WINSKY-SOMMERER, R. & BAILEY, A. 2014. The oxytocin analogue carbetocin prevents emotional impairment and stress-induced reinstatement of opioid-seeking in morphine-abstinent mice. *Neuropsychopharmacology*, 39, 855-65.
- ZELKO, I. N., MARIANI, T. J. & FOLZ, R. J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 33, 337-49.
- ZHANG, K., YANG, C., CHANG, L., SAKAMOTO, A., SUZUKI, T., FUJITA, Y., QU, Y., WANG, S., PU, Y. & TAN, Y. 2020. Essential role of microglial transforming growth factor- β 1 in

- antidepressant actions of (R)-ketamine and the novel antidepressant TGF- β 1. *Transl Psychiatry*. 10, 32.
- ZINI, A. & SCHLEGEL, P. N. 2003. Effect of hormonal manipulation on mRNA expression of antioxidant enzymes in the rat testis. *J Urol*, 169, 767-71.
- ZLATKOVIĆ, J., TODOROVIĆ, N., BOŠKOVIĆ, M., PAJOVIĆ, S. B., DEMAJO, M. & FILIPOVIĆ, D. 2014. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Mol Cell Biochem*, 393, 43-57.
- ZUCKERMAN, M. 1994. *Behavioral expressions and biosocial bases of sensation seeking*, Cambridge university press.
- ZUO, Y., LIN, A., CHANG, P. & GAN, W. B. 2005. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*, 46, 181-9.
- ZWOLIŃSKA, W. & DMITRZAK-WEGLARZ, M. 2023. Biomarkers in Child and Adolescent Depression. *Child Psychiatry Hum Dev*. 54, 266-281.

BIOGRAFIJA AUTORA

Milica Potrebić rođena je 6. aprila 1992. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (UB), modul Biologija upisala je školske 2012/2013. godine, a završila u septembru 2016. godine, gde iste godine upisuje master akademske studije, modul Zoologija, koje završava 2017. godine sa prosečnom ukupnom ocenom 9,66. Doktorske akademske studije upisuje 2017. godine na Biološkom fakultetu UB, modul Animalna i humana fiziologija i polaže sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,91. Godine 2018, po pozivu talentovanim mladim istraživačima - studentima doktorskih akademskih studija za uključivanje u naučnoistraživački rad u akreditovanim naučnoistraživačkim organizacijama od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija, zapošljava se na Institutu za Biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, na Odeljenju za citologiju, na projektu „Odgovor neuroendokrinog sistema pacova na odabrane biljne ekstrakte, fitoestrogene, steroidne i peptidne hormone”. Naredne godine prelazi na Odeljenje za neurobiologiju istog instituta, gde učestvuje u realizaciji projekta „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije”, finansiranog od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije. Zvanje istraživač pripravnik je stekla u maju 2018, a istraživač saradnik u septembru 2020. godine. Aktivni je član Društva za neuronauke Srbije, Srpskog društva za molekularnu biologiju i Federacije evropskih društva za neuronauke (engl. *Federation of European Neuroscience Societies*). Do sada je objavila 5 radova u međunarodnim časopisima i imala 13 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Потребић

број индекса Б3005/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај социјалне изолације на емоционалне реакције, психомоторну активност и антиоксидативни статус периферних органа перипубертетских пацова

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

Потпис докторанда

У Београду, 15. 4. 2024.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Потребих

Број индекса Б3005/2017

Студијски програм Биологија

Наслов рада Утицај социјалне изолације на емоционалне реакције, психомоторну активност и антиоксидативни статус периферних органа перипубертетских пацова

Ментор др Весна Пешић

Потписани/а Милица Потребих

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 15. 4. 2024.

Изјава о коришћењу

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

Утицај социјалне изолације на емоционалне реакције, психомоторну активност и антиоксидативни статус периферних органа перипубертетских пацова

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 15. 4. 2024.

1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство - некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално - без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство - без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.