

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MULTIDISCIPLINARNE STUDIJE  
BIOFOTONIKA

Ana N. Jakovljević

**ULOGA MOLEKULA TENASCINA-C U  
STRUKTURNOJ PLASTIČNOSTI  
HIPOKAMPUSA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2024

UNIVERSITY IN BELGRADE  
MULTIDISCIPLINARY DOCTORAL STUDIES  
BIOPHOTONICS

Ana N. Jakovljević

**THE ROLE OF TENASCIN-C MOLECULE IN  
THE STRUCTURAL PLASTICITY OF THE  
HIPPOCAMPUS**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2024

**Mentori:**

dr Pavle R. Anđus, redovni profesor u penziji, Katedra za opštu fiziologiju i biofiziku, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Branislav Jelenković, naučni savetnik u penziji, Centar za Fotoniku, Institut za fiziku Beograd, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

dr Igor Jakovčevski, profesor, Institut za anatomiju i kliničku morfologiju, Univerzitet u Vitenu, Njemačka

dr Marija Adžić-Bukvić, naučni saradnik, Laboratorija za neurobiologiju, Katedra za opštu fiziologiju i biofiziku, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Mihailo Rabasović, viši naučni saradnik, Laboratorija za Biofiziku, Institut za fiziku, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane \_\_\_\_\_

## **Zahvalnica**

*Eksperimentalni dio ove doktorske disertacije je urađen u Centru za lasersku mikroskopiju, Katedre za biohemiju i fiziologiju „Ivan Đaja“, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Centru za svjetlosnu mikroskopiju na Institutu za molekularnu genetiku u Pragu, Češka, kao i na Institutu za anatomiju „Niko Miljanić“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.*

*Zahvaljujem se:*

*mentoru prof. dr Pavlu Anđusu što mi je ukazao povjerenje da budem dio njegovog tima, i pružio prilike da istražujem, ne samo različite tehnike, već i različite zemlje. Posebno sam zahvalna što je podsticao pronalazak kreativnih rješenja u mom eksperimentalnom i umjetničkom radu, i što je primjer nepokolebljivosti, istrajnosti i domišljatosti. Njegov način isticanja suštine je bio ključan u pisanju naučnih radova i ove doktorske disertacije, a njegovo pripovijedanje naučnih anegdota i legendi je obogatilo moj naučni put;*

*mentoru dr Branislavu Jelenkoviću na uvođenju u svijet optike. Zahvaljujem mu se na prilici da učestvujem u kreaciji vrlo zabavnog projekta koji je spajao optiku, evoluciju i elektrofiziologiju, omogućivši brojne naučne dijaloge koji su pravi primjer multidisciplinarnosti;*

*dr Igoru Jakovčevskom, što je mudrim dosjetkama usmjeravao moj naučni razvoj, i dao mi priliku da učestvujem u različitim istraživanjima koja su u konačnici oblikovale ovu doktorsku disertaciju. Zahvalna sam za njegov trud da se istraživanje o tenascinu-C nastavi, na mnogih poučnim pričama i na neprocjenjivoj pomoći pri objavljivanju naučnih radova;*

*dr Veri Stamenković, što je bila prva osoba koja me uvela u svijet eksperimentalnog rada. Svojim izuzetnim zalaganjem, strpljenjem i posvećenošću me naučila osnovama laboratorijskog rada i postavila temelj naučne tematike koju sam nastavila razvijati uz njene precizne savjete i veliku stručnost;*

*dr Joki Poleksiću, za izuzetnu pristupačnost, stalnu podršku i sjajnu koordinaciju posla koja je omogućila da pisanje prvog rada postane inspirativno iskustvo. Zahvaljujem mu se na ukazanoj prilici da saradujem sa ekipom iz Instituta za anatomiju, bilo je pravo zadovoljstvo učiti i raditi sa njim;*

*dr Mariji Adžić, na riječima ohrabrenja u svim teškim trenucima, kao i na motivaciji i velikom znanju koje nesebično dijeli. Njena detaljnost i temeljnost su istinski unaprijedile ovu doktorsku disertaciju;*

*dr Mihailu Rabasoviću, na prenesenom znanju iz optike i smjernicama koje su poboljšale ovu disertaciju. Zahvalna sam na prilikama snimanja uzoraka na novim mikroskopskim tehnikama koje je razvio iz ograničenih sredstava i neograničene snalažljivosti i kreativnosti;*

*kolegama Katarini, Dunji, Danijeli, Mini, Mariji i Darku, svima sa „galerije“ i Biološkog fakulteta koji su godine eksperimentalnog rada olakšali svojom pomoći i uljepšali svojom ličnošću;*

*kolegama sa Instituta za anatomiju i Instituta za fiziku na inspirativnoj saradnji i lijepom druženju.*

*Neizmjereno sam zahvalna mom saborcu Danielu i mojoj velikoj hajdučkoj porodici i prijateljima što su me bodrili, bezuslovno podržavali i vjerovali u moj san.*

*Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj mami Sonji.*

## ULOGA MOLEKULA TENASCINA-C U STRUKTURNOJ PLASTIČNOSTI HIPOKAMPUSA

Neuronska plastičnost predstavlja ključni mehanizam adaptacije nervnog sistema na promjene. Perineuronske mreže (PNM), kao kondenzovane forme ekstraćelijskog matriksa (EĆM) koje obavijaju neuronska tela, pokazale su se kao važni regulatori ove plastičnosti. Glikoprotein tenascin-C (TnC) je značajna komponenta EĆM, čija uloga u strukturnoj plastičnosti hipokampusa nije u potpunosti razjašnjena. Osim toga, rana traumatska iskustva, poput materinske deprivacije (MD), negativno utiču na razvoj mozga i funkciju inhibitornih parvalbumin pozitivnih (PV+) interneurona, koji eksprimiraju PNM. Obogaćena sredina (OS) je neovisna metoda za povećanje neuronske plastičnosti, dok materinska deprivacija predstavlja stresno iskustvo koje može dovesti do suprotnog efekta. Istraživanjem modela deficijencije TnC i materinske deprivacije, moguće je istražiti kako različiti uslovi utiču na PNM i sinaptičku plastičnost u hipokampusu i medijalnoj prefrontalnoj kori (mPFK). TnC deficijentni (TnC<sup>-/-</sup>) i miševi divljeg tipa (TnC<sup>+/+</sup>) starosti 21 dan, su uzgajani u OS i standardnoj sredini (SS) 8 sedmica nakon čega je pristupljeno ispitivanju broja, inteziteta i ultrastrukture PNM, ekspresiji inhibitornih i ekscitatornih sinaptičkih završetaka, koristeći savremene tehnike fluorescentne mikroskopije. Naši rezultati pokazuju da je nedostatak TnC doveo do promjene u ultrastrukтури PNM ka smanjenju kondenzovanosti sa povećanjem gustine inhibitornih i smanjenjem gustine ekscitatornih završetaka u dentatnom girusu (DG). Takođe, nedostatak TnC vodi do povećanja broja PNM i inhibitornih završetaka u CA2 regionu hipokampusa. OS je uticala na povećanje gustine inhibitornih završetaka u DG, CA2 i CA3 regionima, s tim da je promjena u DG praćena i povišenim intezitetom PNM. Promjene u PNM i sinaptičkoj ekspresiji nisu pronađene u CA1 regionu. Da bismo ispitali uticaj MD na PNM i PV+ interneurone u medijalnoj prefrontalnoj kori i dorzalnom hipokampusu pacova, primjenili smo 24-časovno odvajanje od majke na 9. postnatalni dan. MD u mPFK odraslih pacova je uzrokovala smanjenje gustine ukupnih PNM i PNM koji obavijaju PV+ interneurone (PNM+PV+) u rostralnoj cingulatnoj kori, kao i smanjenje inteziteta iste populacije u prelimbičkoj kori. Gustina i intezitet PNM+PV+ su smanjeni u infralimbičkoj kori nakon MD, dok je intezitet inhibitornih završetaka na PNM+PV+ neurone povišen. MD nije uzrokovala promene u gustini PV+ interneurona u mPFK, niti je uticala na PNM i PV+ interneurone u hipokampusu. Zaključujemo da TnC svoju ulogu u regulaciji strukturne plastičnosti hipokampusa najizraženije ispoljava u regionima DG i CA2. Takođe, pokazujemo da rano traumatsko iskustvo u vidu MD najviše uticaja ima na infralimbičku koru mPFK.

**Ključne riječi:** tenascin-C, perineuronske mreže, sinaptička plastičnost, interneuroni, parvalbumin, obogaćena sredina, materinska deprivacija, hipokampus, prefrontalna kora

**Naučna oblast:** Biološke nauke

**Uža naučna oblast:** Biofotonika

## THE ROLE OF TENASCIN-C MOLECULE IN THE STRUCTURAL PLASTICITY OF THE HIPPOCAMPUS

Neuronal plasticity represents a key mechanism for adapting nervous system to changes. Perineuronal nets (PNNs), as condensed forms of extracellular matrix (ECM) surrounding neuronal cell bodies, have been shown to be important regulators of neuronal plasticity. The glycoprotein tenascin-C (TnC) is a significant component of ECM, and its role in the structural plasticity of the hippocampus is not fully understood. Additionally, early traumatic experiences, such as maternal deprivation (MD), negatively impact brain development and the function of inhibitory parvalbumin-positive (PV+) interneurons, which express PNNs. Enriched environment (EE) is a non-invasive method to enhance neuronal plasticity, while maternal deprivation represents a stressful experience that may lead to the opposite effect. By investigating TnC-deficient models and maternal deprivation, it is possible to explore how different conditions affect PNNs and synaptic plasticity in the hippocampus and medial prefrontal cortex (mPFC). TnC-deficient (TnC<sup>-/-</sup>) and wild-type (TnC<sup>+/+</sup>) mice, 21-day-old, were reared in EE and standard environment (SE) for 8 weeks, after which the number, intensity, and ultrastructure of PNNs, as well as the expression of inhibitory and excitatory synaptic terminals, were examined using advanced fluorescent microscopy techniques. Our results show that TnC deficiency led to changes in the ultrastructure of PNNs, with a reduction in condensation, an increase in the density of inhibitory terminals and a decrease in the density of excitatory terminals in the dentate gyrus (DG). Also, TnC deficiency leads to an increase in the number of PNNs and inhibitory terminals in the CA2 region of the hippocampus. EE induced an increase in the density of inhibitory terminals in CA2, CA3, and DG regions, with changes in DG being accompanied by increased intensity of PNNs. No changes in PNNs and synaptic expression were found in the CA1 region. To investigate the effect of MD on PNNs and PV+ interneurons in the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus of rats, we applied a 24-hour maternal separation on postnatal day 9. MD in the mPFC of adult rats caused a reduction in the density of total PNNs and PNNs surrounding PV+ interneurons (PNN+PV+) in the rostral cingulate cortex, as well as a reduction in the intensity of this population in the prelimbic cortex. The density and intensity of PNN+PV+ were decreased in the infralimbic cortex after MD, while the intensity of inhibitory terminals on PNN+PV+ neurons was increased. MD did not cause changes in the density of PV+ interneurons in the mPFC, nor did it affect PNNs and PV+ interneurons in the hippocampus. We conclude that TnC plays its role in regulating structural plasticity of the hippocampus most prominently in the DG and CA2 regions. Additionally, we show that early traumatic experiences in the form of MD have the greatest impact on the infralimbic cortex of the mPFC.

**Keywords:** tenascin-C, perineuronal nets, synaptic plasticity, interneurons, parvalbumin, enriched environment, maternal deprivation, hippocampus, prefrontal cortex

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Biophotonics

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Ekstraćelijski matriks .....	1
1.2. Perineuronske mreže .....	2
1.2.1. Istorijat .....	2
1.2.2. Sastav perineuronskih mreža .....	3
1.2.3. Funkcije perineuronskih mreža.....	4
1.2.4. Poremećaji vezani za ekspresiju PNM.....	6
1.2.5. Neuronska plastičnost, kritični period i razvoj PNM.....	7
1.3. Tenascin-C .....	9
1.3.1. Tenascin-C, neuronska plastičnost i PNM.....	11
1.4. Uticaj sredine.....	12
1.5. Obogaćena sredina .....	12
1.5.1. Obogaćena sredina i perineuronske mreže .....	14
1.6. Materinska deprivacija .....	15
1.6.1. Materinska deprivacija i perineuronske mreže .....	16
1.7. Funkcionalna anatomija hipokampusa .....	17
1.7.1. Struktura, projekcije i funkcija hipokampusa .....	17
1.7.2. Ćelijska organizacija i neurotransmiteri u hipokampusu.....	19
1.7.3. Hipokampus i obogaćena sredina .....	20
1.7.4. Hipokampus i materinska deprivacija.....	21
1.8. Funkcionalna anatomija prefrontalne kore.....	22
1.8.1. Struktura, projekcije i funkcija prefrontalne kore.....	22
1.8.2. Prefrontalna kora i hipokampus .....	23
1.8.3. Ćelijska organizacija i neurotransmiteri .....	23
1.8.4. Prefrontalna kora i materinska deprivacija .....	24
2. Ciljevi istraživanja.....	26
3. Materijal i metode.....	27
3.1. Upotrebljene hemikalije, pufferi, rastvori i antitijela .....	27

3.2.	Životinje .....	30
3.2.1.	Genotipizacija miševa PCR reakcijom .....	30
3.3.	Eksperiment obogaćene sredine .....	31
3.4.	Eksperiment materinske deprivacije .....	33
3.5.	Priprema tkiva .....	34
3.6.	Imunohistohemija.....	35
3.7.	Histološko bojenje.....	36
3.8.	Mikroskopija .....	39
3.8.1.	Konfokalna mikroskopija.....	39
3.8.2.	Svjetlosna mikroskopija.....	39
3.8.3.	Super-rezoluciona mikroskopija .....	40
3.9.	Analiza slika.....	42
3.9.1.	Analiza ekspresije PNM i sinaptičkih terminala.....	42
3.9.2.	Analiza zapremine mozga.....	42
3.9.3.	Analiza ultrastrukture PNM.....	43
3.10.	Statistička analiza .....	44
4.	Rezultati.....	45
4.1.	Uloga TnC i obogaćene sredine u ekspresiji PNM u hipokampusu miša .....	45
4.2.	Uloga TnC i obogaćene sredine u strukturnoj sinaptičkoj plastičnosti hipokampusa miša 48	
4.3.	Uloga TnC i obogaćene sredine u formiranju ultrastrukture PNM u hipokampusu miša 53	
4.4.	Utjecaj MD na ekspresiju PNM i PV neurona u mPFK i hipokampusu pacova .....	55
4.5.	Utjecaj MD na strukturnu sinaptičku plastičnost u mPFK pacova .....	60
4.6.	Efekat MD na volumen mPFK i hipokampusa pacova .....	61
5.	Diskusija .....	62
5.1.	Uloga TnC i obogaćene sredine u strukturnoj plastičnosti DG.....	63
5.2.	Osvrt na upotrebu mikroskopskih tehnika sa super rezolucijom .....	64
5.3.	Uloga TnC i obogaćene sredine u ultrastrukтури PNM i sinaptičkoj ekspresiji DG.....	66
5.4.	Uloga TnC u strukturnoj plastičnosti CA1-3 regiona .....	67
5.5.	Utjecaj MD na PNM u prefrontalnoj kori pacova.....	69
5.6.	Utjecaj MD na PNM u hipokampusu pacova .....	70
5.7.	Utjecaj MD na volumen prefrontalne kore i hipokampusa pacova .....	70



5.8. Uticaj MD na sinaptičku plastičnost mPFK.....	71
5.9. Interakcija PNM i sinapsi u modelu ranog traumatskog iskustva.....	71
6. Zaključci .....	73
7. Literatura .....	74

# 1. Uvod

## 1.1. Ekstraćelijski matriks

Potporna sredina koja omogućava pravilno funkcionisanje organizma, održavajući integritet tkiva i međućelijsku komunikaciju, se naziva ekstraćelijski matriks - EĆM (eng. *extracellular matrix, ECM*). EĆM se sastoji od velikog broja međusobno povezanih makromolekula, čiji je sastav različit u zavisnosti od funkcije koju obavlja (Mouw et al., 2014a). Različita tkiva se odlikuju specifičnim odnosom ćelija i EĆM, npr. vezivna tkiva sadrže mnoštvo EĆM i manje ćelija, dok su epitelna tkiva odlikovana gustom distribucijom ćelija i manjim sadržajem EĆM (Novak and Kaye, 2000). EĆM centralnog nervnog sistema sadrži mnoge komponente koje se mogu naći u ostalim tkivima, ali se od njih izdvaja jedinstvenim molekularnim sastavom (Novak and Kaye, 2000).

Glavne makromolekule koje čine EĆM su: kolagen, elastin, fibronektin, laminin, proteoglikani i glikoproteini (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Mouw et al., 2014a). EĆM nervnog sistema sadrži relativno malu količinu fibrozni proteina kao što su kolagen i fibronektin, jer u njegov sastav većinski ulaze glikozaminoglikani (GAG), bilo da su vezani za proteine i formiraju proteoglikane, ili nevezani u formi hijaluronske kiseline (HK) (Novak and Kaye, 2000). Proteoglikani se sastoje se od centralnog proteina kovalentno vezanog za dugačke lance ponavljajućih disaharida glikozaminoglikana. U zavisnosti od strukture GAG lanaca, njihove distribucije i gustine, proteoglikani se dijele na: heparin sulfat, dermatan sulfat, kreatin sulfat i hondroitin sulfat (Bandtlow and Zimmermann, 2000). Hondroitin sulfat proteoglikani (HSPG), poznati kao i lektikani, su glavne gradivne i regulatorne molekule EĆM-a nervnog sistema (Ruoslahti, 1989). Sastoje se od centralnog proteina i ponavljajućih disaharida glukuronske kiseline i N-acetilgalaktozamina koji čine GAG. Prema građi i funkciji u nervnom sistemu, HSPG dijelimo na: agrekan, neurokan, verzikan i brevikan. HSPG intereguju sa drugim molekulama tako što posjeduju domene za vezivanje sa: hijaluronskom kiselinom, faktorima rasta, glikoproteinima i drugim lektikanima (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Lundell et al., 2004; Yamaguchi, 2000).

U nervnom sistemu, neuroni i glija ćelije luče makromolekule EĆM-a čiji se profil ekspresije dinamično mijenja tokom razvića i rasta jedinke, varirajući u različitim regionima mozga (Ruoslahti, 1996). 10-20% moždanog tkiva čini upravo EĆM koji se, po svom sastavu i funkciji klasifikuje na:

- Perineuronske mreže (PNM) su forma EĆM koja usko obavija tijela i proksimalne nastavke određenih neurona u centralnom i perifernom nervnom sistemu. Odlikuje se većim stepenom kondenzovanosti i različitim ekspresivnim profilom molekula od okolnog tkiva, tako praveći posebnu formu koja nalikuje na mrežu. PNM se većinski sastoje od proteoglikana, hijaluronske kiseline i glikoproteina, sa glavnom funkcijom u regulaciji neuronske plastičnosti.

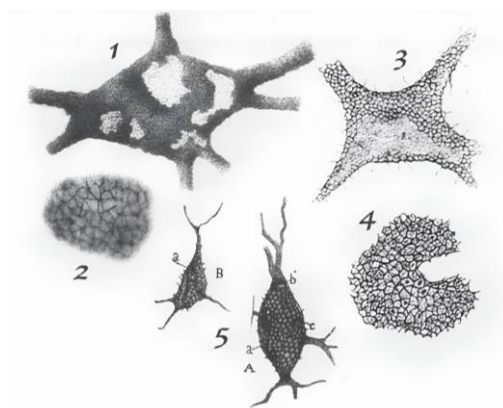
- Perivaskularni EĆM, većinski građen od kolagena i laminina, zauzima prostor između endotelnih ćelija i astrocita i važan je u održavanju krvno-moždane barijere kao mehanička i hemijska potpora.
- Intersticijalni “hibridni“ matriks, kojeg čine proteoglikani, kolagen, fibronektin i laminin, popunjava preostali ekstraćelijski prostor nervnog sistema, posredujući između nervnih, glijalnih, imunskih i endotelnih ćelija (Ulbrich et al., 2021).

Osim osnovne potporne uloge, pokazano je da EĆM učestvuje u homeostazi tkiva, migraciji ćelija, njihovom preživljavanju, sazrijevanju i diferencijaciji, kao i u razvijanju tumora (Novak and Kaye, 2000).

## 1.2. Perineuronske mreže

### 1.2.1. Istorijat

Čuveni citolog, Kamilo Goldži, je 1898. godine, posmatrajući koru velikog mozga mačke, prvi put opisao retikularne formacije okolo tijela neurona i proksimalnih nastavaka, nazvaši ih „perifernim retikulom“, a zatim perineuronalnim mrežama (PNM) (Slika 1) (Golgi, 1898). Njegovi učenici su kasnije potvrdili postojanje ovih struktura, čak i tada interpretirajući poligonalne šupljine kao prostore kroz koje prolaze aksonski terminali i projektuju se na površinu neurona. Isprva, citolozi nisu prihvatili postojanje PNM, smatrajući da su to artefakti koagulacije pericelularne tečnosti, ali nakon što je vodeći patolog tog vremena, Ramon I Kahal, potvrdio postojanje PNM, bile su prihvaćene od strane naučne zajednice. 1931. godine, Rondinini je napravio prvu komparativnu studiju PNM, pokazavši da su prisutne u centralnom nervnom sistemu vodozemaca, gmizavaca i ptica (Celio et al., 1998).



**Slika 1. Originalni crteži iz radova Golžija, Donadija i Ramon I Kahala.** 1) Prvi crtež PNM, rad Kamila Golžija, nervna ćelija sa retikularnim omotačem u kičmenoj moždini mačke. 2) Uvećani detalj koji pokazuje izgled šupljina u PNM. 3) Crtež Artura Donadija, nervna ćelija iz kičmene moždine psa. 4) Uvećani detalj pericelularne mreže. 5) Rad Ramon I Kahala, neuron iz mozga mačke. Modifikovano iz Vitellaro-Zuccarello et al., 1998.

### 1.2.2. Sastav perineuronskih mreža

PNM su visoko heterogene strukture, čije su osnovne gradivne jedinice:

- Hijaluronska kiselina,
- Proteoglikani: agrekan, brevikan, neurokan i verzikan,
- Link proteini HAPLN-1, -3 i -4 (eng. *Hyaluronic Acid and Proteoglycan Link Protein – HAPLN*),
- Glikoproteini: tenascin R i C (TnR i TnC) (Ruoslahti, 1996).

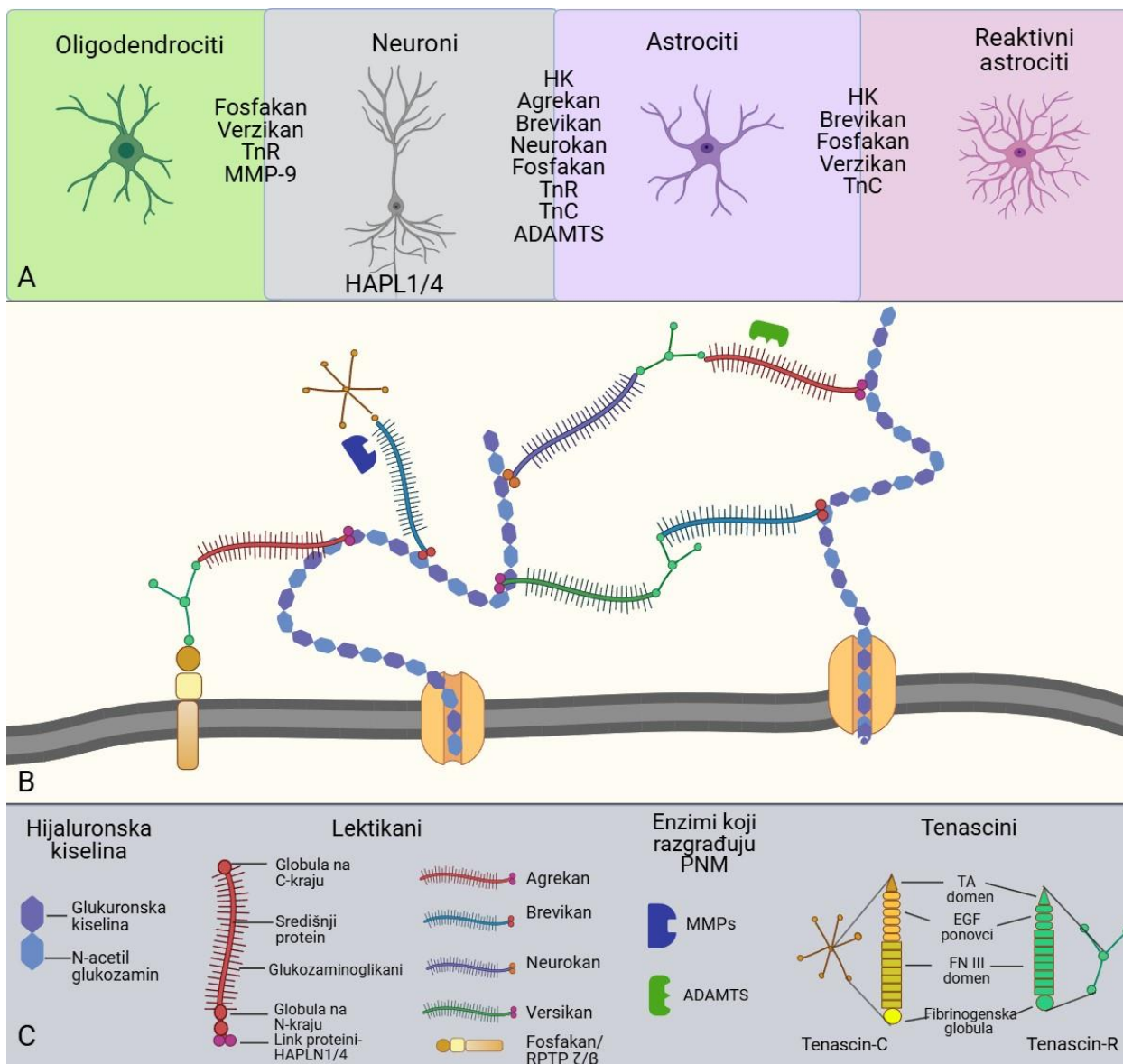
Nastanak PNM je iniciran aktivnošću transmembranskog enzima hijaluronan-sintetaze (HAS) koji sintetiše lance hijaluronske kiseline u ekstraćelijski prostor. HK je polimer sastavljen od stotina ponovljenih disaharidnih jedinica glukuronske kiseline i acetilgalaktozamina i jedini je glikozaminoglikan u PNM koji nije sulfatisan (Rhodes and Fawcett, 2004). Hijaluronska kiselina je glavna komponenta PNM, koja stvara potporni okvir za vezivanje ostalih molekula. *In vitro* istraživanje je pokazalo da i drugi tipovi ćelija, kao što su HEK ćelije, posjeduju mogućnost formiranja kondenzovanog EĆM i strukture slične PNM, kada im se ugrade HAS enzimi u membranu (Kwok et al., 2010).

Lektikani se odlikuju višestrukim mjestima vezivanja drugih molekula, gdje se njihov N-terminalni kraj veže za hijaluronsku kiselinu, dok se C-terminalni kraj proteina veže za tenascin-R. Ove molekule ne posjeduju samo strukturnu ulogu u mozgu, već su i uključeni i u njegov razvoj, tako što interaguju sa faktorima rasta i molekulama koje regulišu ćelijsku ateziju (Bandtlow and Zimmermann, 2000).

Glikoproteini tenascinske porodice koji ulaze u sastav PNM predstavljaju važnu grupu molekula koja će biti opisana u posebnom poglavlju ove doktorske teze.

Link proteini, kojima pripadaju HAPLN grupa formiraju nekovalentne veze između hijaluronske kiseline i proteoglikana, sprečavajući difuziju lektikana (Galtrey et al., 2008). Familija HAPLN link proteina se sastoji od 4 različita proteina od kojih su tri detektovana u mozgu: HAPLN1 i HAPLN4 koje eksprimiraju neuroni koji su okruženi PNM, i HAPLN2 kojeg eksprimiraju oligodendrociti i koji je prisutan u PNM većinski sastavljenih od verzikana koje se nalaze oko Ranvijerovih čvorova (Oohashi et al., 2015).

PNM se formira tako što se linearni lanci hijaluronske kiseline vežu za ekstraćelijske lektikane, a njihove interakcije su ojačane vezanjem link proteina i glikoproteinima tenascinske porodice (Celio and Chiquet-Ehrismann, 1993; Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2011; Lundell et al., 2004; Yamaguchi, 2000). Molekule PNM-a se prvo povezuju u trimerne jedinice, sastavljene od lektikana koji se svojim N krajem vezao za HK, a C krajem za tenascin-R. Međusobnim povezivanjem i interakcijom trimernih jedinca nastaje kompletna PNM. Osim neurona oko kojeg se obavlja PNM, komponente koje ulaze u njen sastav luče i glijalne ćelije, mirujuć i reaktivni astrociti, kao i oligodendrociti (Slika 2) (Kwok et al., 2011).



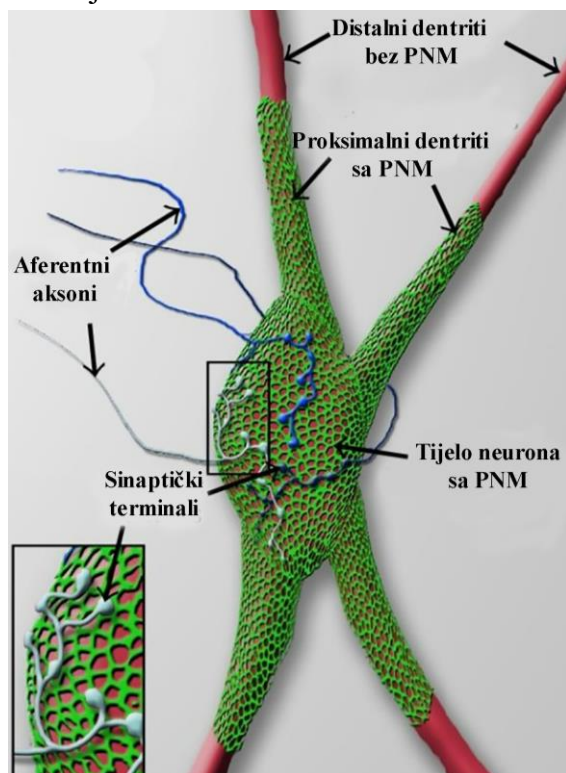
**Slika 2. Sastav i organizacija PNM.** A) Molekule EĆM koje luče različiti tipovi ćelija: oligodendrociti, neuroni, astrociti i reaktivni astrociti. B) PNM su sklopljene na način da se na hijaluronsku kiselinu vežu proteoglikani koje međusobno povezuje tenascin-R. Dio PNM su TnC i enzimi koji je razgrađuju. C) Tipovi i strukture molekula koje čine i razgrađuju PNM.

### 1.2.3. Funkcije perineuronskih mreža

PNM su pronađene u svim regionima mozga i kičmene moždine, ali njihove funkcije su najviše istraživane u kori velikog mozga i subkortikalnim moždanim strukturama (Celio et al., 1998). Tako je potvrđeno da PNM kontrolišu plastičnost vizuelne kore velikog mozga (Pizzorusso, 2002), kontrolu straha u amigdali (Gogolla et al., 2009), prostornu organizaciju mrežnih ćelija

(eng. *grid cells*) u entorinalnoj kori (Christensen et al., 2021), asocijativno motorno učenje u malom mozgu (Carulli et al., 2020) i socijalnu memoriju u hipokampusu (Cope et al., 2022; Domínguez et al., 2019).

Prvobitno se smatralo da je glavna funkcija PNM mehanička potpora neuronima, međutim, danas se zna da su PNM dinamične strukture koje aktivno učestvuju u regulaciji sinaptičke aktivnosti, smatrajući se dijelom četvorodjelne sinapse, koja predstavlja jedinstvo pre- i postsinaptičkih terminala, glija ćelija i EĆM (Dityatev and Rusakov, 2011). Odnos PNM i sinaptičkih terminala je predstavljen na Slici 3.



**Slika 3. Šematski prikaz neurona koji je obavijen perineuronalnom mrežom.** Tijelo neurona i proksimalni nastavci su obavijeni retikularnom mrežom koja podsjeća na saće, dok distalni nastavci nemaju PNM. Šupljine u mreži su mjesta gdje aferentni aksoni uspostavljaju sinapse sa neuronom koji eksplicira PNM. Modifikovano iz De Winter et al., 2016.

PNM vrše nekoliko osnovnih funkcija u nervnom sistemu:

- Regulisanje plastičnosti stabilizacijom sinaptičke povezanosti (Van't Spijker et al., 2019);
- Zaštita neurona i sinapsi formiranjem fizičke barijere i jonskog štita koji bi održavao integritet sinaptičkih veza od potencijalno oštećujućih neurohemijskih stimulusa (Morawski et al., 2004);
- Vezivanje molekula koje omogućavaju ili inhibiraju formiranje sinapsi (De Winter et al., 2016).



PNM regulišu formiranje sinapsi na dva različita načina: stabilizacijom postojećih i restrikcijom nastanka novih sinapsi (Carceller et al., 2020a). PNM su takođe svojevrsni puferski sistemi i rezervoari katjona, poput  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Fe}^{2+}$  (Brückner et al., 1993; Cabungcal et al., 2013). Akumulirajući  $\text{Fe}^{2+}$  jone, PNM učestvuju u odbrani neurona protiv oksidativnog stresa, kao i od Tau proteina u Alchajmerovoj bolesti, ostvarujući na taj način svoju protektivnu ulogu (Suttkus et al., 2016).

U zavisnosti u kojem regionu mozga i oko kojih tipova neurona se eksprimiraju, PNM imaju specijalizovane uloge u regulaciji plastičnosti. U kori velikog mozga, PNM se najčešće formiraju okolo inhibitornih interneurona koji eksprimiraju  $\text{Ca}^{2+}$ -vezujući protein – parvalbumin, i označavaju se PV+ interneuroni (Carceller et al., 2020b; Yamada et al., 2015). PV+ interneuroni obavijeni sa PNM pokazuju veću gustinu perisomatskih ekscitatornih i inhibitornih sinaptičkih klastera i duže aksone, u poređenju sa PV+ neuronima bez PNM (Carceller et al., 2020b). Zbog toga se funkcije PNM i PV+ interneurona često zajedno ispituju kao i njihova uzročno-posljedična veza. Međutim, PNM u hipokampusu se većinom nalaze okolo ekscitatornih piramidalnih neurona (Carstens et al., 2016; Gottschling et al., 2019), što ukazuje na različitu funkciju u ovom regionu mozga. Lupori i saradnici su objavili sveobuhvatan atlas ekspresije PNM i PV+ interneurona za više od 600 regiona mozga odraslog miša (Lupori et al., 2023). Pokazali su da je ekspresija PV+ dobar prediktor agregacije PNM i da su PNM najviše zastupljene u četvrtom sloju primarnih senzornih područja kore velikog mozga, kao i da je njihova zastupljenost u korelaciji sa projekcijama iz talamusa. Osim što su difuzne PNM pronađene u somatosenzornoj, vizualnoj, auditornoj i retrosplenijalnoj kori velikog mozga, u velikom broju su zastupljene u srednjem mozgu, produženoj moždini i moždanom stablu, a gdje njihova funkcija nije dovoljno istažena, budući da se prednost daje višim moždanim strukturama. Takođe, analizom distribucije PNM i atlasa ekspresije gena, utvrđeno je da je pojava PNM pozitivno korelisana sa ekspresijom gena koji učestvuju u mijelinizaciji, mitohondrijskih funkcija i ćelijskog disanja, dok su negativno korelisane sa procesima sinaptičke plastičnosti, postsinaptičke gustine, regulacije strukture sinapsi, učenja i memorije (Lupori et al., 2023).

#### **1.2.4. Poremećaji vezani za ekspresiju PNM**

Poremećaji u ekspresiji PNM su pronađeni kod neuropsihijatrijskih bolesti u čijoj je bazi poremećena homeostaza ekscitacije i inhibicije, kao što je šizofrenija, bolesti zavisnosti i gubitak memorije (Mauney et al., 2013; Slaker et al., 2016a; Thompson et al., 2018). Zbog toga, PNM su kandidati za farmakološku terapiju ovakvih poremećaja. Osim farmakološki, u cilju terapije je moguće djelovati na PNM promjenom ponašanja i okruženja, budući da ekspresija PNM zavisi od uticaja spoljašnje sredine i iskustava kroz koje jedinka prolazi (Soleman et al., 2013).

### 1.2.5. Neuronska plastičnost, kritični period i razvoj PNM

Promjene u fiziologiji i ponašanju koje nastaju kao posljedica iskustva jedinke, su posredovane reorganizacijom sinaptičkih konekcija u određenim neurološkim mrežama. Ova osobina nervnog sistema je nazvana neuronska plastičnost (Kolb et al., 2012). Tokom ranog razvoja, nervni sistem je posebno podložan spoljašnjim stimulusima i tada su nivoi neuronske plastičnosti najviši tokom života jedinke (Citri and Malenka, 2008).

Važna osobina promjena koje su oblikovane spoljašnjim stimulusima je da su vremenski zavisne, i efekat tih promjena upravi zavisi od toga kada se u razvoju mozga jedinke desio određeni stimulus. Vremenski interval u kojem neko iskustvo može da utiče na razvoj mozga se naziva prozor plastičnosti. Ukoliko je ključno da se iskustvo desi u određenom vremenskom intervalu tokom razvoja mozga, taj vremenski interval se naziva kritični period (Pinel and Barnes, 2018). Kod glodara, kritični period se završava par sedmica nakon rođenja, u zavisnosti od regiona mozga, međutim, važno je da se poklapa sa završetkom formiranja PNM (Kwok et al., 2011; Wang and Fawcett, 2012). Sastav PNM se mjenja sa razvićem jedinke, tako da su PNM u prvih par sedmica života manje kondenzovane i sačinjene od neurokana, verzikana i tenascina-C, dok su agrekan, brevikan i tenascin-R dominantni u mozgu adulta čineći ove strukture kondenzovanijim (Carulli et al., 2007).

Jedna od osnovnih hipoteza o ulozi PNM u neuronskoj plastičnosti navodi da PNM omogućavaju remodelovanje sinapsi razvijajućeg mozga zbog stanja niske kondenzovanosti, koja se mjenja starenjem i vjerovatno ograničava sinaptogenezu i ojačava postojeće konekcije u adultnom životu (Yamaguchi, 2000). Zbog toga je razgradnja PNM u adultnom dobu povezana sa reaktivacijom plastičnih procesa koje odlikuju kritični period (Romberg et al., 2013). U vizuelnoj kori pacova, kraj kritičnog perioda se dešava oko treće sedmice života i mjeri se stabilizacijom formiranih sinapsi (Pizzorusso et al., 2002). U medijalnoj entorinaloj kori velikog mozga, koja šalje i prima signale iz hipokampusa, PNM se počinu formirati oko 12-tog postnatalnog dana (PND 12). Oko 17-tog PND dobijaju potpunu ekspresiju i formu, što je uzeto kao okvirni interval za kritični period hipokampalne formacije (Travaglia et al., 2018). Molekularni markeri i obrasci ponašanja koji služe za praćenje kraja kritičnog perioda se mogu razlikovati između regiona mozga, ali ono što se ističe jeste da su vezani za završetak formiranja PNM.

Jedna od najistraženijih funkcija PNM je njihov uticaj na sinaptičku plastičnost. Ova vrsta plastičnosti se odnosi na promjene u strukturi sinapsi (strukturna plastičnost) i snazi prenošenja signala u mozgu (funkcionalna plastičnost), a zaslužna je za adaptaciju nervnog sistema na dinamičnu spoljašnju i unutrašnju sredinu (Bosiacki et al., 2019). Funkcionalne promjene podrazumjevaju modifikacije broja i aktivnosti neurotransmiterskih receptora na membrani pre- i post sinapse, kao i promjene u intezitetu oslobađanja neurotransmitera. Najčešće se eksperimentalno određuju mjerenjem dugotrajne potencijacije (eng. *long-term potentiation, LTP*) i dugotrajne depresije (eng. *long-term depression, LTD*) da bi se utvrdila snaga sinaptičke povezanosti (Lee et al., 2000). Dok se funkcionalne promjene uglavnom proučavaju upotrebom elektrofizioloških metoda, strukturna sinaptička plastičnost, na kojoj će biti fokus u ovom radu, se



oslanja na upotrebu mikroskopije za snimanje sinaptičkih klastera na dendritskim trnovima (Nimchinsky et al., 2002).

Najvažniji faktori koji utiču na sinaptičku plastičnost jeste sinteza i proteoliza komponenata E<sup>CM</sup> i PNM. Dodavanjem enzima ABC hondroitinaze, koji razlaže HSPG, glavne komponente PNM, pokazana je promjena u veličini dentritskih trnova (De Vivo et al., 2013). Kondenzovane PNM mogu fizički ograničavati sinaptičke receptore poput AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionska kiselina) receptore (AMPA), čija se lateralna difuzija povećava nakon razgradnje PNM u kulturi hipokampalnih neurona pacova (Frischknecht et al., 2009). Osim razlaganja HSPG, digestija hijaluronske kiseline dovodi do hiperekcitabilnosti neuronske mreže hipokampalnih neurona, epileptične aktivnosti koja je suprimirana dodatkom AMPAR i L-tipa voltažno zavisnih kalcijumskih kanala (eng. *L-type voltage dependent calcium channel*, *L-VDCC*) (Vedunova et al., 2013). Iz ovih primjera je vidljivo da digestijom molekula koje čine PNM dolazi do poremećaja sinaptičkih projekcija i prenosa signala u neuronskim mrežama, ukazujući na važnost PNM za sinaptičku plastičnost. Još jedan od načina kontrole formiranja sinapsi je vezivanje odbijajućih molekula poput semaforina 3A za PNM, koji sprječavaju uspostavljanje sinapsi (De Winter et al., 2016). Kreiranjem linije miševa koji posjeduju Cre-LoxP sistem za kontrolisanu ekspresiju enzima ABC hondroitinaze u CA2 neuronima hipokampusu, uspostavljena je selektivna digestija HSPG koja omogućava detaljnije ispitivanje funkcija PNM (Carstens et al., 2020). Remodelovanje PNM se može postići aplikacijom enzima koji degradiraju njene komponente, gdje se ističu matriksne metaloproteinaze (MMP) i disintegrin metaloproteinaze sa trombospondinskim motivima (eng. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*, *ADAMTS*) (Levy et al., 2015; Stamenkovic et al., 2017a). ADAMTS degradiraju lektikane, lokalizovani su u neokorteksu i hipokampusu, a povećana im je aktivnost krajem druge postnatalne sedmice, što se poklapa sa kritičnim periodom sinaptogeneze (Levy et al., 2015). Povišena aktivnost MMP-9 je dovela do razgradnje PNM koje obavijaju PV<sup>+</sup> interneurone, rezultujući u senzornoj hipersenzitivnosti u životinjskom modelu Fragile X sindroma (Wen et al., 2018). Aktivnost MMP-9 je takođe bila povišena u malom mozgu miša nakon gajenja u stimulatívnoj sredini, dok je ekspresija PNM smanjena u tom regionu, ukazujući na moguću razgradnju posredovanu ovim enzimom (Stamenkovic et al., 2017a).

Osim enzimatskog uklanjanja komponenti PNM, da bi ispitali koji je značaj pojedinačnih molekula u sinaptičkoj plastičnosti, kreirane su linije životinja sa selektivno eliminisanim: agrekanom, brevikanom, neurokanom, TnR i TnC (Favuzzi et al., 2017; Rowlands et al., 2018a, Evers et al. 2002). Adultni miševi kojima je onemogućena ekspresija agrekana su imali reaktivirano stanje plastičnosti vizuelne kore, što je pozitivno uticalo na njihovu memoriju prepoznavanja objekata (Rowlands et al., 2018b). Time je prvi put pokazan značaj agrekana kao glavnog funkcionalnog konstituenta PNM. Ispitivanjem brevikanskih mutanata utvrđeno je da ovaj molekul utiče na hipokampalne PV<sup>+</sup> interneurone tako što kontroliše lokalizaciju K<sup>+</sup> kanala i nivoe AMPA receptora (Favuzzi et al., 2017). Uklanjanje neurokana je dovelo do promjena u PNM prefrontalne kore velikog mozga, i uticalo na sposobnost prepoznavanja redoslijeda događaja i

adaptiranja na nove situacije (Baidoe-Ansah et al., 2023). Nedostatak tenascina-R utiče na stabilizaciju strukture PNM, i neophodan je za integraciju agrekana u PNM kao i za ekspresiju brevikana, HK i neurokana (Brückner et al., 2000; Morawski et al., 2014). Uticaj nedostatka tenascina-C na strukturu i funkciju PNM će biti posebno opisan u ovoj tezi.

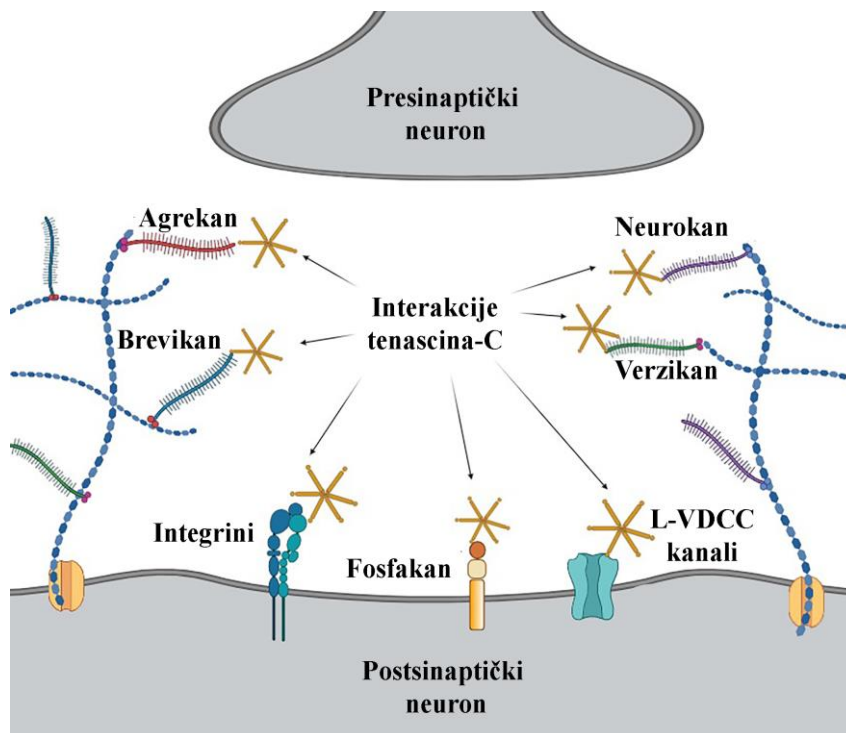
### 1.3. Tenascin-C

Tenascini predstavljaju familiju glikoproteina ekstraćelijskog matriksa velike molekulske mase, od kojih se tri ekspimiraju u nervnom sistemu, tenascin R, tenascin Y i tenascin-C (Joester and Faissner, 2001). Dok je uloga tenascina-R (TnR) u sastavu i funkciji PNM potvrđena, uloga tenascina-C (TnC) je manje istražena, i ispoljava se u uslovima povišene plastičnosti i određenih patoloških stanja (Morawski et al., 2014; Stamenkovic et al., 2017a, Scheffler et al., 1997). TnR i TnC se razlikuju i u strukturi, prvi je trimer, dok je TnC heksamer, koji se sastoji od dva trimera povezana disulfudnim vezama. Počevši od N kraja, monomer TnC se sastoji od ponovaka epidermalnog faktora rasta (eng. *epidermal growth factor, EGF*), domena fibronektina tipa III i globularnog fibronektina na C kraju proteina (Celio and Chiquet-Ehrismann, 1993). Upravo multidomenska struktura TnC mu omogućava različite interakcije sa ligandama HSPG (Day et al., 2004; Grumet et al., 1994). Mnoštvo funkcija TnC je rezultat post-translacionih modifikacija, pri čemu nastaje veliki broj različitih izoformi (Midwood et al., 2016). TnC ima važnu ulogu u procesima razvića nervnog sistema, migracije neurona, neurogeneze, proliferacije i regeneracije, kao i rasta neurita (Faissner et al., 2017; Ferhat et al., 1996b; Midwood et al., 2016; Rigato et al., 2002; Šekeljić and Andjus, 2012; Tucić et al., 2021). U patološkim uslovima, TnC učestvuje u regeneraciji kičmene moždine, formiranju glijalnog ožiljka, kao i inflamacijskim procesima eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa i ishemije (Bijelić et al., 2022, 2021; Dzyubenko et al., 2022; Manrique-Castano et al., 2021; Momčilović et al., 2017). U nervnom tkivu, TnC direktno interaguje sa različitim receptorima na površini ćelija, kao što su HSPG, integrini, i kalcijumski kanali (Slika 4) (Andrews et al., 2009; Maurel et al., 1994; Schnapp et al., 1995).

Osim u strukturi, TnC i TnR se razlikuju u vremenskom obrascu ekspresije. TnC se može detektovati tokom razvića u mozgu miša 10-tog dana embrionalnog razvoja, dok je TnR zastupljeniji u mozgu adulta (Bartsch 1996; Brückner et al. 2000; Erickson 1993). U prvih nekoliko nedelja života, EĆM mozga glodara se većinski sastoji od TnC, neurokana i verzikana, što odgovara difuznijem stanju matriksa. Tokom odrastanja, profil ekspresije molekula EĆM se mijenja tako da agrekan, brevikan i TnR formiraju kondenzovaniji EĆM i PNM, stabilizirajući uspostavljene sinapse (Mouw et al., 2014).

Ćelije koje luče TnC u ekstraćelijski prostor moždanih struktura su većinom astrociti, radijalna glija i ograničen broj tipova neurona: granularne ćelije u dentatnom girusu (DG) hipokampusa, motorni neuroni u kičmenoj moždini, i piramidalne ćelije kore velikog mozga (Bartsch, 1996; Brodkey et al., 1995). Iako se TnC najviše ekspimirira tokom razvića, u adultnom mozgu je njegova ekspresija zabilježena u hipotalamusu i cerebelumu (Ferhat et al., 1996a; Stamenkovic et al., 2017a; Theodosis et al., 1997).

Životinje kojima je genetskom modifikacijom onemogućena ekspresija funkcionalnog TnC, su ispoljavale hiperlokomociju i slabiju sposobnost plivanja, kao i smanjen nivo serotonina i dopamina u kori velikog mozga, hipokampusa i strijatuma (Fukamauchi et al., 1996). Kreiranjem drugog TnC mutanta, koji će biti opisan u ovoj tezi, Evers i saradnici su prijavili spontanu noćnu hiperaktivnost, slabu senzomotornu koordinaciju i sporije plivanje kod miševa koji ne ekspimiraju funkcionalne molekule tenascina-C (Evers et al., 2002). Stamenkovic i saradnici (2017b) su daljim ispitivanjem ponašanja potvrdili ulogu TnC u regulisanju lokomocije, koordinacije kao i emotivne reaktivnosti i sposobnosti učenja i pamćenja. Navedeni efekti su povezani sa hipotezom da je TnC evolutivno konzervisan da bi se spriječila hiperaktivnost životinja koja bi ih mogla dovesti u opasnost od predatora (Mackie and Tucker, 1999). Nova bioinformatička istraživanja humanog proteoma E<sub>CM</sub> su pokazala da je TnC uključen u odgovore na povrede aksona, organizaciju ekstraćelijskog matriksa, uspostavljanju nervno-mišićne sinapse kao i u odontogenezi u neurodegenerativnim bolestima (Freitas et al., 2021).



**Slika 4. Interakcija tenascina-C sa drugim molekulama.** Šematizovan prikaz vezivanja tenascina-C sa lektikanima, integrinima i kalcijumskim kanalima.

### 1.3.1. Tenascin-C, neuronska plastičnost i PNM

Ispitivanje funkcije tenascina-C kao modulatora PNM je počelo sa formiranjem TnC mutanta, gdje je prvobitno pokazano da se morfologija ovih struktura u hipokampusu ne razlikuje od PNM miševa divljeg soja, starih mjesec dana (Evers et al., 2002). Takođe, ekspresija TnC u kori velikog mozga adultnog miša je generalno niska u regionima koji su bogati PNM, i morfologija PNM se nije značajno razlikovala kod miševa koji ne ekspresiraju TnC i divljeg soja (Irintchev et al., 2005). Međutim, pronađena je smanjena ekspresija PNM u malom mozgu adultnog miša koji ne ekspresira funkcionalan TnC, što ukazuje na važnu ulogu ovog molekula u maturaciji i razviću PNM (Stamenkovic et al., 2017a). Gajenje životinja u visoko stimulativnom okruženju povećava nivo TnC u malom mozgu i utiče na remodelovanje PNM, tako što modulira aktivnost enzima MMP-9 koji vrši proteolitičku razgradnju PNM. Na taj način je TnC uključen u regulaciju plastičnosti malog mozga, gdje utiče na ravnotežu ekscitacije i inhibicije, ka većoj inhibiciji, koja se tumači kao smanjenje plastičnosti kod miševa koji ne ekspresiraju TnC (Stamenkovic et al., 2017a). Miševi koji ne ekspresiraju TnC su imali abnormalno visoku gustinu neurona, astrogliozu, smanjene gustine PV+ interneurona i izmjenjen odnos oligodendrocita i neurona, kao i inhibitornih i ekscitatornih neurona u somatosenzornoj i motornoj kori velikog mozga (Irintchev et al., 2005). Nedavna studija je prijavila odloženo sazrijevanje PNM u hipokampusu miševa koji ne ekspresiraju 4 molekule E $\mathcal{C}$ M, TnC, TnR, neurokan i brevikan, gdje je individualan doprinos TnC nepoznat (Gottschling et al., 2019). TnC interaguje sa komponentama PNM, agrekanom, neurokanom i fosfakanom. Dodavanjem TnC u ćelijsku kulturu koja ne ekspresira TnR, nije omogućilo sklapanje PNM, što pokazuje da uloge TnR i TnC molekula u održavanju integriteta PNM nisu kompenzatorne (Morawski et al., 2014).

Navedena istraživanja su se oslanjala na testove ponašanja i korištenje mikroskopije kao glavnih tehnika, ali su tek elektrofiziološka ispitivanja proširila saznanja o ulozi TnC u sinaptičkoj plastičnosti. TnC se pokazao bitnim za nastanak normalnog gama ritma u hipokampusu, a njegov nedostatak je doveo do smanjenja broja interneurona pozitivnih na somatostatin (Gurevicius et al., 2009). Dugotrajna potencijacija (LTP), koja se smatra mehanizmom učenja i pamćenja, je smanjena u hipokampusu miševa koji ne ekspresiraju TnC (Evers et al., 2002). Evers i saradnici su pokazali da do takvog efekta dolazi zbog poremećene signalizacije preko L-VDCC kanala. Tada se, usljed nedostatka TnC, povećava influks Ca<sup>2+</sup> jona dovodeći do poremećaja LTP. Osim za L-VDCC kanale, TnC se veže i ostvaruje signalizaciju preko integrina, što je drugi predloženi mehanizam sinaptičke plastičnosti (Slika 3) (Šekeljić and Andjus, 2012). Novija studija je pokazala smanjenje ekspresije TnC i broja PNM nakon tretmana inhibitorima serotonina, koji se koriste kao terapija za depresiju (Mukhopadhyay et al., 2021).

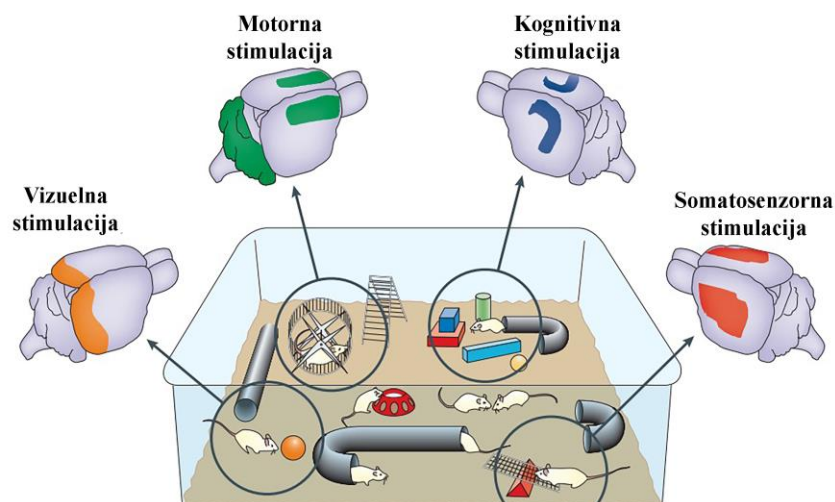
## 1.4. Uticaj sredine

Većina istraživanja koja ispituju efekte iskustva na razviće nervnog sistema je fokusirana na senzorni i motorni sistem, i u tom cilju manipulirše eksperimentalnom postavkom spoljašnje sredine. Zbog toga, najranija istraživanja se baziraju na dva pristupa: senzorna deprivacija i obogaćenje. U prvim studijama senzorne deprivacije pacovi su odgajani u mraku, i pronađeno je da imaju manje sinapsi i sinaptičkih dendrita u primarnoj vizuelnoj kori velikog mozga, kao i deficite u vidu kao odrasle jedinke. Suprotno tome, prve studije ranog izlaganja obogaćenju sredini pokazale su korisne efekte na razvoj i funkcionisanje nervnog sistema (Kempermann et al., 1997; Praag et al., 1999; Rosenzweig et al., 1978; van Praag et al., 2000).

## 1.5. Obogaćena sredina

Iako je Hebb, 1949. godine, prvi došao na ideju da izlaganje obogaćenju sredini (OS) ima uticaja na moždane funkcije, nju je u praksu prvi uveo Rosenzweig tek 1978. godine tako što je ispitivao uticaj socijalnih interakcija u takvom okruženju (Hebb, 1949; Rosenzweig et al., 1978). Nakon toga, koncept OS je varirao, ali su se zadržali osnovni postulati da je svrha OS pozitivni efekti na nervni sistem i potencijalne terapijske aplikacije u raznim bolestima. OS tipično podrazumjeva modifikovanje životnog prostora laboratorijskih životinja tako da imitiraju prirodno stanište koje bi stimulisalo neuronalnu plastičnost i sveukupno zdravlje životinje (Han et al., 2022).

Standardizovani protokoli OS uključuju smještanje većeg broja životinja u veće kaveze u koje se stavljaju razni objekti koji čine prostor složenijim, i omogućavaju stalnu voljnu fizičku aktivnost (Harland and Dalrymple-Alford, 2020). Osim u laboratorijskim uslovima, OS se koristi kao sredina u kojoj se gaje i razmnožavaju ugrožene vrste, tako što se imitiraju uslovi prirodne sredine (Young, 2007). Dizajn OS može da varira u brojnim parametrima, među kojima su najbitniji: veličina kaveza i broj životinja u njima, tip korištenih objekata, starost životinje, vremenski period koji provedu u OS, odgovarajuća kontrolna grupa, soj životinja i pol životinja. Najčešće korišteni objekti su: točak za trčanje i merdevine koji pružaju motornu stimulaciju; plastične komercionalno dostupne igračke i tuneli za kognitivnu stimulaciju; zvonca i različite podloge za somatosenzornu stimulaciju; ogledala i predmeti kontrastnih boja za vizuelnu stimulaciju (Slika 5) (Simpson and Kelly, 2011). Pokazano je da OS može uzrokovati dugotrajne efekte, kako na biohemiju mozga tako i na ponašanje životinja. Na nivou ponašanja, obogaćena sredina ima brojne pozitivne efekte kao što su poboljšanje učenja i pamćenja, usporavanje gubitka pamćenja kod starijih jedinki, smanjenje anksioznosti i povećanje istraživačkog nagona kod životinja (Han et al., 2022). Miševi izloženi OS imaju bolje rezultate u testovima prostornog pamćenja od onih koji su gajeni u standardnim uslovima. Takođe, pokazano je da dobrovoljno trčanje na točku i pokretnoj traci poboljšava prostorno pamćenje (Praag et al., 2000). Čak i kratkotrajno izlaganje životinja OS poboljšava kognitivne funkcije kod starijih jedinki, ali takođe nije iznenađujuće što se dugotrajno izlaganje pokazalo korisnijim od kratkotrajnog (Kobayashi et al., 2002).



**Slika 5. Vrste stimulacija koju omogućava obogaćena sredina.** Povećana senzorna, stimulacija, koja uključuje vizuelne i somatosenzorne podražaje aktivira vizuelnu (narandžasto) i somatosenzornu (crveno) koru velikog mozga. Intenzivna kognitivna stimulacija, koja uključuje kodiranje prostornih mapa, prostornu memoriju i prepoznavanje novih objekata, aktivira hipokampus (plavo). Povećana voljna fizička aktivnost i aktivno istraživanje okoline koja se mijenja, stimuliše motornu koru i mali mozak (zeleno). Modifikovano iz Nithianantharajah i Hannan, (2006).

Obogaćena sredina može redukovati zavisnost, ponašanje nalik depresiji i ove vrste promjena mogu biti povezane sa povećanjem ekspresije sinaptičkih proteina ili neurotrofina (Cao et al., 2014). Takođe, smatra se da socijalne interakcije doprinose poboljšanju senzo-motornih i kognitivnih funkcija, zbog čega se životinje gaje u većim grupama. Upravo kombinacija povišene fizičke aktivnosti i socijalnih interakcija poboljšava moždane funkcije. Fizička aktivnost poboljšava kognitivne sposobnosti koje se ogledaju u povećanju neurogeneze, neurotrofičkih faktora rasta i povišene ekspresije neurotransmitera, dok socijalno obogaćenje sredine rezultuje povećanjem mase mozga (Alwis and Rajan, 2014).

Životinje mogu biti izložene obogaćenoj sredini u prenatalnom i postnatalnom dobu koji obuhvata juvenilno, adultno i starije doba. Stimulacija obogaćenom sredinom rezultuje mnoštvom plastičnih modifikacija u mozgu adulta, prije svega sinaptičkim remodelovanjem, rastom dendrita, gliogenezom, angiogenezom i neurogenezom (Han et al., 2022). Pokazano je da OS povećava neurogenezu u hipokampusu i uključuje novonastale ćelije u postojeća funkcionalna kola (Nithianantharajah and Hannan, 2006). Nakamura i saradnici su pokazali da promjene u gustini sinaptičkih vezikula aksospijalnih sinapsi dostižu maksimum vrijednosti kod pacova starih 3 sedmice nakon izlaganja OS. Nakon OS, gustina sinaptičkih vezikula somatskih sinapsi se blago povećavala do 12 mjeseci starosti i ostaje ista tokom starenja (Nakamura et al., 1999). Utvrđeno je da fizička aktivnost skotnih ženki pacova pozitivno utiče na rast fetusa i da hipokampus tih mladunaca pokazuje povišenu ekspresiju faktora rasta BDNF (eng. *brain derived neurotrophic factor*, *BDNF*) i proliferaciju ćelija granularnog sloja dentatnog girusa. Pored toga, intenzivna fizička aktivnost skotne ženke ima dugotrajan efekat na potomstvo, povećava kognitivne sposobnosti mladunčadi i adulta, ali i omogućava neuroprotekciju u starijem dobu (Sale et al.,



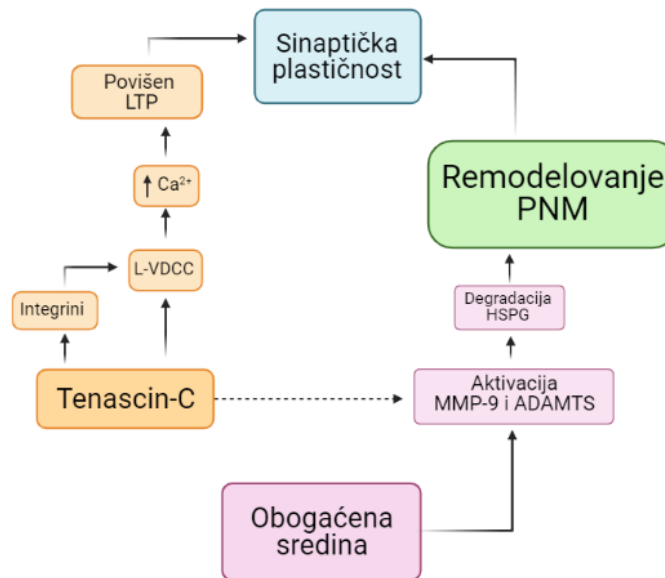
2014). Pomenuti pozitivni efekti OS na neurogenezu potiču uglavnom od uvođenja redovne vježbe u eksperimentalni protokol. Obogaćenje sredine može dovesti do povećanja neurotrofina, kao što su BDNF i NGF (eng. *nerve growth factor*, *NGF*) koji igraju bitnu ulogu u neuronalnoj signalizaciji (Cao et al., 2014). Takođe, nakon OS je pronađeno povećanje ekspresije proteina 95 postsinaptičke gustine (eng. *post-synaptic density protein 95*, *PSD-95*), i izmjena u ekspresiji subjedinica NMDA (N-metil-D-aspartat) i AMPA receptora, koje su uključene u glutamatergičku signalizaciju, što govori o uticaju OS na intezivno sinaptičko remodelovanje i sinaptogenezu (Nithianantharajah and Hannan, 2006).

### 1.5.1. Obogaćena sredina i perineuronske mreže

Obogaćena sredina utiče na ekspresiju PNM u raznim regionima mozga i tako dovodi do brojnih promjena u strukturnoj i sinaptičkoj plastičnosti. Jedna od prvih studija o efektu OS na PNM je pokazala da odgajanje miševa u OS od PND 21 u trajanju od 3 mjeseca značajno poboljšava vizuelnu preciznost životinja koje su odgajane u mraku. Prikazano povećanje broja PNM u subgranularnom sloju somatosenzorne kore, ukazuje da OS može doprinjeti oporavku vida tako što utiče na ekspresiju PNM (Trévia et al., 2011). Uticaj OS na PNM u somatosenzornoj kori je pokazan i u eksperimentu izazvanog moždanog udara. Nakon indukovano mogdanog udara, miševi su smješteni u OS, u trajanju od 2 mjeseca, što je dovelo do smanjenja broja PNM koje su pozitivne na agrekan (Madinier et al., 2014). Moguće je da OS pokreće mehanizme za oporavak obrađivanja senzornih informacija, tako što modulira ekspresiju PNM u somatosenzornoj kori. Osim na oporavak, OS može da utiče na zavisnost od glukoze i kreiranje navika, tako što modulira ekspresiju PNM u prefrontalnoj kori. Nakon navikavanja na saharozu, pacovi su bili smješteni u OS što je rezultovalo povećanjem ekspresije PNM. Pacovima koji nisu imali zavisnost od saharoze je samo jedan dan izlaganja OS doveo do smanjenja inteziteta PNM u prelimbičkoj kori, povećanja u orbitofrontalnoj kori i izostanka efekta u infralimbičkoj kori (Slaker et al., 2016b). OS ne utiče samo na PNM u kori velikog mozga, već i u strijatumu, subkortikalnoj strukturi koja je zaslužna za planiranje i izvršenje voljnih pokreta. OS je dovela do značajnog povećanja PNM u strijatumu miša starog 15 dana, koji je ovoj sredini bio izložen od rođenja, međutim dugotrajan efekat na PNM je izostao (O'Connor et al., 2019).

PNM u hipokampusu su pokazale različite odgovore na izlaganje životinja OS. Miševi koji su odgajani u OS od rođenja, su imali povećanu gustinu PNM u CA2 regionu hipokampusa, što je izmjereno 21. i 45. postnatalnog dana (Carstens et al., 2016). U mišijem modelu Alzhajmerove bolesti, OS u trajanju od 3 mjeseda je dovela do povećanja inteziteta PNM u CA2 regionu hipokampusa. Isto istraživanje je pokazalo smanjenje ekspresije PNM oko PV+ neurona nakon OS kod miševa divljeg soja, što se tumači kao efekat uspostavljanja novih sjećanja (Cattaud et al., 2018). U kombinaciji sa OS, dvosedmični tretman antidepresivnim lijekom venlafaksinom, je doveo do smanjenja broja PV+ neurona koji okružuju PNM u hipokampusu. Time je pokazano da OS može da ubrza promjene u neuronskim mrežama koje su zavisne od aktivnosti inhibitornih interneurona, a koje su važne za tretiranje depresivnih poremećaja (Coutens et al., 2023).

Razgradnja PNM je uočena u malom mozgu miševa koji su bili izloženi OS u trajanju od jedan i dva mjeseca, gdje se ističe uloga MMP-9 kao enzima koji je učestvovao u razgradnji (Foscarin et al., 2011; Stamenkovic et al., 2017a). Međutim, kod miševa koji ne eksprimiraju tenascin-C, OS dovodi do blagog povećanja ekspresije PNM, što ukazuje na važnu ulogu ovog molekula u pokretanju plastičnih promjena u malom mozgu (Slika 6) (Stamenkovic et al., 2017a).



**Slika 6. Mogući mehanizmi remodelovanja PNM i uticaja na sinaptičku plastičnost.** Predloženi su putevi koji uključuju obogaćenu sredinu i TnC u sinaptičkoj plastičnosti, direktno vezivanjem za integrine i indirektno uticajem na enzime koje remodeluju PNM. Isprekidana linija označava nedostak direktnog dokaza sa postojanjem eksperimentalnih podataka u Stamenkovic et al., (2017a).

## 1.6. Materinska deprivacija

Materinska deprivacija (MD) je jedan od najčešće korištenih eksperimentalnih paradigmi koje služe kao model ranog traumatskog iskustva. Takav model podrazumjeva rano, kontrolisano odvajanje mladunčadi od majke, u različitom trajanju, i koristi se za ispitivanje psihopatoloških poremećaja kao što su šizofrenija i depresija (Marco et al., 2015). Vjerovatnoća da odrasla jedinka boluje od šizofrenije ili depresije ubrzano raste sa prijavljenim ranim traumatskim iskustvom u vidu zanemarivanja, emocionalnim, seksualnim ili fizičkim zlostavljanjem u djetinjstvu (Bentall et al., 2012; Infurna et al., 2016). Stres u ranom životnom dobu je povezan sa morfološkim promjenama u mozgu, kao što je smanjenje sive mase u prefrontalnoj kori velikog mozga, hipokampusu i amigdali (Edmiston, 2011; Gorke et al., 2014; Underwood et al., 2019). Rano traumatsko iskustvo negativno utiče na pravilno razviće mozga i povećava osjetljivost na budući stres, budući da naredni stresni događaji koji se dese u adultnom dobu mogu da budu okidač za nastanak mentalnih poremećaja (Maynard et al., 2001; McEwen and Morrison, 2013).



Eksperiment MD može da varira u početku i trajanju, gdje su najčešći pristupi kratkotrajno odvajanje mladih od majke u trajanju od nekoliko dana, npr. 3h svaki dan u toku perioda dojenja (Baudin et al., 2012), ili odvajanje u toku 24h na 9-ti postnatalni dan (PND9) (Ellenbroek et al., 2004). Posljednji pristup je pokazao da cjelodnevno odvajanje od majke, nedugo nakon rođenja, dovodi do poremećaja u obradi senzornih informacija u adultnom dobu eksperimentalne životinje, što je bio moguće tretirati antipsihoticima (Ellenbroek and Peter T.J.M. van den Kroonenberg, 1998). U daljim istraživanjima je pokazano da je MD od 24h na PND 9 dovela do ćelijskih promjena u prefrontalnoj kori mladih adulta pacova, u vidu smanjene gustine neurona i promjena u inhibitornim neuronima (Aksic et al., 2021; Aksić et al., 2013; Poleksic et al., 2021). Ove poromjene su praćene aktivacijom mikroglije čiji odgovor može da varira u različitim modelima ranog traumatskog iskustva (Ferle et al., 2020; Poleksic et al., 2021; R. Wang et al., 2020). Pored ćelijskih promjena, MD vodi dugotrajnim funkcionalnim poremećajima u kognitivnoj fleksibilnosti (Baudin et al., 2012), memoriji prepoznavanja (Marco et al., 2013) i društvenog ponašanja (Holland et al., 2014).

### **1.6.1. Materinska deprivacija i perineuronske mreže**

Materinska deprivacija može uticati na normalan razvoj PNM i PV interneurona, uzrokujući promjene u njihovom broju i intezitetu (Gildawie et al., 2020). Pogođeni regioni mozga su uključeni u kortiko-limbičke krugove i promjene mogu biti specifične za određen pol (Page and Coutellier, 2018; Riga et al., 2017; Soares et al., 2020). Rano traumatsko iskustvo dovodi do ubrzanog ili odloženog sazrijevanja PNM u amigdali, u zavisnosti od starosti, pola, tipa i trajanja stresora, kao i vrste ispitivane životinja, što rezultate o ovoj oblasti čini dosta heterogenim (Perez-Rando et al., 2022). Mušjaci miševa koji su prošli eksperiment MD od 4h i 8h tokom PND 2-16, su pokazali povećan intezitet ekspresije PNM, i smanjenje gustine PV+ interneurona u ventralnom hipokampusu, kao i anksioznost i hiperaktivnost (Murthy et al., 2019). U studiji Gildawie i saradnika, ponavljana MD (trajanje 4h od PND 2-20) je dovela do povećanja gustine PNM u amigdali adolescentnih mužjaka pacova (Gildawie et al., 2020). Taj efekat na oba pola pacova je izostao u studiji koja je imala neznatno izmjenjen protokol deprivacije u trajanju od 3h, PND 2-14 (Richardson et al., 2021). Koristeći limitiran materijal za pravljenje gnijezda, koji dovodi do neadekvatne brige majke o potomstvu, pokazano je da samo adolescentni mužjaci, ali ne i ženke, imaju povećan intezitet PNM u desnoj amigdali (Guadagno et al., 2020). Istraživanja o uticaju MD na ekspresiju PNM i PV+ interneurona su uglavnom fokusirana na amigdal, hipokampus i prefrontalnu koru.

## 1.7. Funkcionalna anatomija hipokampusa

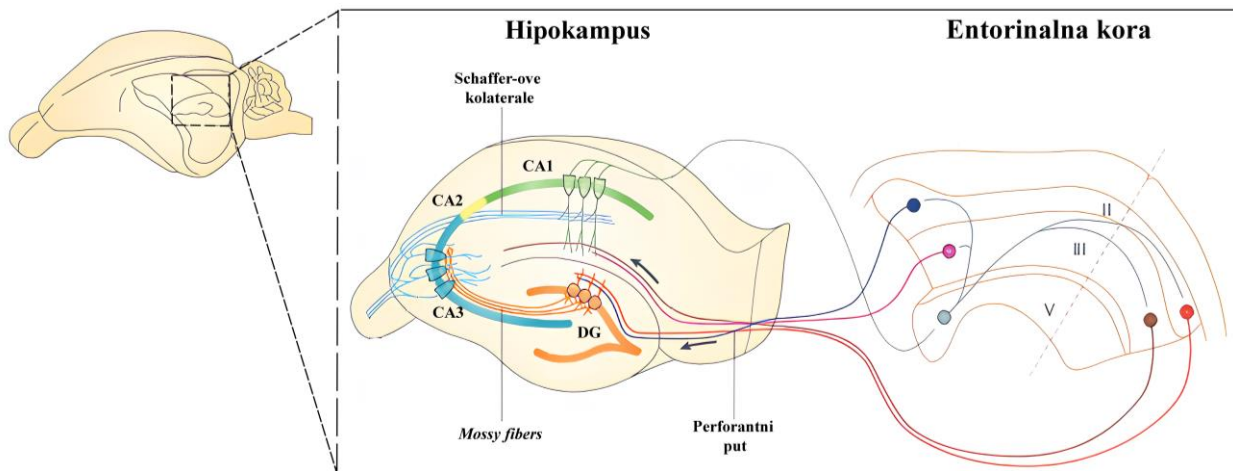
### 1.7.1. Struktura, projekcije i funkcija hipokampusa

Hipokampus je parna struktura koja se nalazi ispod neokorteksa u temporalnom režnju i dio je limbičkog sistema. Funkcionalno pripada većoj hipokampalnoj formaciji, koja se, pored hipokampusa, sastoji iz još dva glavna dijela: entorinalne kore i subikuluma. Unutrašnja podjela hipokampusa podrazumjeva anatomsku i funkcionalnu distinkciju na dva osnovna podregiona: dentatni girus (DG) i Amonovi rogovi (lat. *Cornu Ammonis*, CA), koji se dalje dijele na CA1, CA2 i CA3 podregion (Slika 7) (Taupin, 2007).

Svaki dio hipokampalne formacije se povezuje sa susjednim dijelom, ali su te konekcije rijetko recipročne, (Hjorth-Simonsen, 1973) za razliku od regiona kore velikog mozga koje su generalno recipročno međusobno povezane (Felleman and Van Essen, 1991). Jednosmjerne intrahipokampalne konekcije se predstavljaju “trisinaptičkim kolom” i opisuju njegovu unutrašnju povezanost i protok informacija (Taupin, 2007). Čelije koje ostvaruju sinapse u trisinaptičkom kolu su granularni neuroni u DG i piramidalni neuroni u CA regionima. Polazna tačka trisinaptičkog kola su ekscitatorni piramidalni neuroni entorinalne kore, čiji aksoni perforiraju subikulum, formirajući perforantni put (Hjorth and Jeune, 1972). Aksoni entorinalne kore dopiru do granularnih ćelija DG i formiraju prve sinapse trisinaptičkog kola (Spencer and Bland, 2019). DG ne projektuje aksone nazad do entorinalne kore, već uspostavlja drugu sinapsu kola sa apikalnim dendritima piramidalnih ćelija CA3 regiona. Ove projekcije se nazivaju paučinasta vlakna (eng. *mossy fibers*) i specifične po tome što imaju velike terminale, brojna mjesta otpuštanja neurotransmitera i veliku postsinaptičku gustinu (Radonjic et al., 2014; Spencer and Bland, 2019; Taupin, 2007). Posljednja sinapsa u trisinaptičkom kolu se odnosi na projekcije aksona CA3 regiona na apikalne dendrite piramidalnih ćelija CA1 regiona, i takve projekcije su nazvane Schaffer-ovim kolateralama (Yeckel and Berger, 1990). Schaffer-ove kolaterale su vjerovatno najbolje proučen sinaptički put unutar hipokampusa, jer se dovode u vezu sa raznim vrstama sinaptičke plastičnosti. Svaki akson koji polazi sa CA3 se projektuje na hiljade piramidalnih ćelija CA1 regiona, ali obično sa samo jednim ili dva sinaptička kontakta po neuronu (Li et al., 1994). Piramidalne ćelije CA1 regiona se projektuju na subikulum i entorinalni korteks, a glavni izlazni put implusa iz hipokampusa je kroz vlakna forniksa (Taupin, 2007). Informacija iz entorinalne kore prati opisano trisinaptičko kolo kroz sve regione hipokampusa i vraća se u nazad u mjesto polaska - entorinalnu koru. Smatra se da promjene koje se dešavaju tokom prenosa signala od suštinske važnosti za skladištenje informacija u vidu dugotrajne memorije (Yeckel and Berger, 1990).

Za CA2 region se prvobitno smatralo da je prelazna zona između CA1 i CA3 regiona, zbog čega su njegove funkcionalno-anatomske karakteristike posljednje opisane. Naime, Haglund, 1984. godine, je pokazao da je CA2 jedini CA region koji prima projekcije od hipotalamičnih supramamilarnih jezgara (Haglund et al., 1984). Iako ne učestvuje u trisinaptičkom kolu,

piramidalni neuroni u CA2 se projektuju na svaki CA region, i tako utiču na cijelu hipokampalnu mrežu, posebno ekcitrirajući neurone iz dubljih slojeva CA1 regiona (Hitti and Siegelbaum, 2014; Kohara et al., 2014). Piramidalni neuroni CA2 regiona primaju projekcije direktno iz entorinalne kore i takođe ostvaruju sinapse sa granularim neuronima DG, s tim da se paučinstva vlakna projekcije DG na CA2 region razlikuju od dobro proučenih DG-CA3 sinapsi (Kohara et al., 2014). DG-CA2 sinapse imaju relativno manji nivo ekscitatorne transmisije i čak je pokazano da novi diferencirani granularni neuroni DG projektuju svoje aksone na neurone u CA2 (Llorens-Martín et al., 2015).



**Slika 7. Anatomija hipokampusa miša.**

Povezanost sa entorinalnom korom i trisinaptički put:

- I sinapsa trisinaptičkog puta: Entorinalna kora – DG, perforantnim putem.
- II sinapsa trisinaptičkog puta: DG – CA3, paučinstim vlaknima (*mossy fibers*).
- III sinapsa trisinaptičkog puta: CA3 – CA, Schaffer-ovim kolateralama.

Modifikovano iz Küffner, 2013.

Smatra se da je hipokampus mjesto gdje se epizodična memorija događaja i činjenica obrađuje i kodira u memorijske tragove koji se šalju do drugih dijelova mozga gdje se pohranjuju kao dugotrajna memorija (Zola-Morgan et al., 1986). Podregioni hipokampusa imaju specifične funkcije i na sljedeći način su uključeni u različite tipove učenja i memorije:

- Dentatni girus je odgovoran za razdvajanje obrazaca, proces koji omogućava razlikovanje između sličnih sjećanja (Benke, 2014);
- CA1 podregion je ključan za reprezentaciju prostornih informacija, objekata i stimulusa u prostornom kontekstu (Soma et al., 2023);
- Osnovna funkcija CA2 je socijalna memorija, posebno prepoznavanje novonastalih socijalnih situacija (Hitti and Siegelbaum, 2014);
- Smatra se da je CA3 zadužen za formiranje sjećanja i prisjećanje, tako što generiše i skladišti obrazac neuronske aktivnosti koja reflektuje nedavne događaje, podržavajući konsolidaciju memorije (Rebola et al., 2017).

Hipokampus je funkcionalno razdvojen na dorzalni i ventralni hipokampus. Lezije na dorzalnom hipokampusu pogoršavaju prostorno učenje kod pacova, dok povrede ventralnog utiču na ponašanje nalik anksioznosti i nemaju uticaj na prostorno učenje (Gergues et al., 2020; Pothuizen et al., 2004). Ekspresija gena u dorzalnom hipokampusu je povezana sa dijelovima mozga uključenim u obradu kognitivnih informacija. Za razliku od dorzalnog, geni eksprimirani u ventralnom hipokampusu su povezani sa regionima mozga odgovornim za emocionalno ponašanje (Kesner et al., 2004; Moser and Moser, 1998). Uloga hipokampusa u regulaciji emocionalnog ponašanja se do sada uglavnom odnosila na regulaciju boli, gdje je istaknut polisinaptički put do prednje cingulate kore (Spencer and Bland, 2019). Gustina mineralnokortikoidnih receptora se pokazala najvećom u hipokampusu što ukazuje na njegovu ulogu u kontroli odgovora na stres (McEwen et al., 1968).

### 1.7.2. Čelijska organizacija i neurotransmiteri u hipokampusu

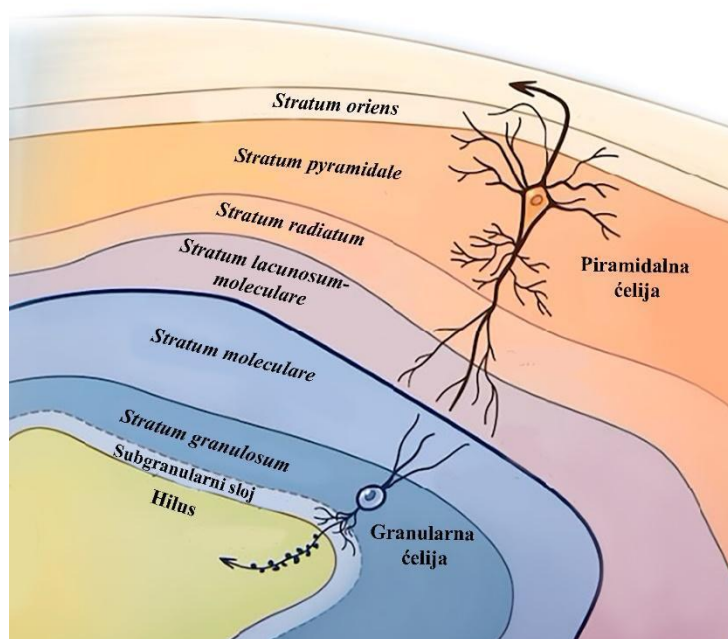
Postoje dvije osnovne grupe neurona u hipokampalnoj formaciji: glavne ćelije, koje su većinom uključene u povezivanje hipokampusa sa drugim moždanim strukturama, i nekoliko vrsta interneurona, koji su povezani u lokalnu hipokampalnu neuronsku mrežu (Radonjic et al., 2014; Spencer and Bland, 2019).

Dentatni girus se može morfološki podijeliti na 3 sloja, molekularni sloj (*stratum moleculare*), granularni sloj (*stratum granulare*) i hilus-polimorfni sloj. Molekularni sloj je najbliži hipokampalnoj fisuri i odlikuje se izostankom ćelija, osim malog broja interneurona. Principalne ćelije dentantnog girusa formiraju karakterističnu strukturu koja nalikuje zubu (lat. *gyrus dentatus*) od manjih, gusto poređanih ćelija ispod molekularnog sloja, čineći granularni sloj (Valero and de la Prida, 2018). Treći sloj DG-a je polimorfni ćelijski sloj, poznat i kao hilus, koji se nalazi između dva sloja granularnih ćelija i čija granica sa tim slojem obrazuje subgranularnu zonu, jedno od dva mjesta neurogeneze u mozgu adulta (Eriksson et al., 1998).

CA podregioni se sastoje od 4 sloja: *stratum lacunosum-moleculare*, *stratum radiatum*, piramidalni sloj (*stratum pyramidale*) i *stratum oriens*. Principalne ćelije čine ekscitatorni piramidalni neuroni, gusto poređani u CA1, a manje gusto u CA2 i CA3 podregionu. Ostatak ove strukture se sastoji od aksona i denrita principalih ćelija, i interneurona (Radonjic et al., 2014; Spencer and Bland, 2019). Prikaz ćelijskih slojeva hipokampusa miša je dat na Slici 8.

U hipokampusu glodara se eksprimiraju nekoliko tipova neurotransmitera od kojih su, pored acetilholina, najvažniji glutamat i GABA ( $\gamma$ -amino-buterna kiselina). Piramidalne i granularne ćelije hipokampusa su ekscitatorne i otpuštaju glutamat, dok su interneuroni inhibitorni i otpuštaju GABA. Glutamat je ekscitatorni neurotransmiter koji ima osnovnu ulogu u sinaptičkoj transmisiji i plastičnosti (Taupin, 2007). Važnost glutamata u hipokampusu se prepoznaje u visokoj ekspresiji raznih receptora za glutamat (Alkondon and Albuquerque, 2004). Sinapse koje ulaze u trisinaptičko kolo hipokampusa su glutamatne, a prihvatanje glutamata u sinaptičke vezikule ekscitatornih neurona obavljaju vezikularni glutamatni transporteri 1 i 2 (VGlut1 i 2) (Taupin, 2007). Sa druge strane, glavni inhibitorni neurotransmiter hipokampusa je GABA, koji reguliše

ekscitatorne signale i održava stabilnost hipokampusa (Yakel, 2004). Njegova funkcija je omogućena GABA receptorima koji su važni za generisanje oscilatornih aktivnosti u hipokampusu, ključnih za memorijske procese (Qian and Noebels, 2001). GABA se transportuje u sinaptičke vezikule pomoću vezikularnog GABA transportera (VGAT) čija aktivnost zavisi od rada protonskih pumpi združenih sa ATP-azom (Taupin, 2007). Za pravilno funkcionisanje hipokampusa i prevencije kognitivnih disfunkcija, ključno je održavanje balansa između ekscitacije i inhibicije (Chapman et al., 2022). Predložen je novi mehanizam povratne sprege između glutamata i GABA-e, gdje glutamat pospješuje funkcije GABA receptora, a gdje oba neurotransmitera regulišu signalnu međusobnu transdukciju (Sakairi et al., 2020). Interakcija između glavnih neurotransmitera hipokampusa je osnova za sinaptičku plastičnost tokom procesa učenja i pamćenja (Grahamm et al., 2018).



**Slika 8. Morfološka podjela hipokampusa na slojeve.** DG se sastoji od hilusa, subgranularnog sloja, *stratum granulosum* i *stratum moleculare*. CA regioni se sastoje od *stratum lacunosum-moleculare*, *stratum radiatum*, *stratum pyramidale* i *stratum oriens*.

Preuzeto i modifikovano od Alise Brandt, 2019.

### 1.7.3. Hipokampus i obogaćena sredina

Hipokampus se značajno strukturno i funkcionalno mjenja kao odgovor na gajenje u obogaćenoj sredini. Obogaćena sredina je dovodi do povećane plastičnosti hipokampusa, razvijajući kognitivne i memorijske kapacitete kroz nekoliko mehanizama. Uopšteno, OS pozitivno utiče na volumen hipokampusa, dendritičku arborizaciju, mijelinizaciju nerava, dendritske trnove, i podstiče neurogenezu, sinaptogenezu, angiogenezu i hormonalnu regulaciju (Zaif et al., 2018).

Jedan od najvažnijih efekata OS na strukturu i funkciju hipokampusa je uticaj na nastanak novih neurona u subgranularnoj zoni dentatnog girusa, u procesu koji je poznat kao adultna neurogeneza (Schloesser et al., 2010). Jedan od mehanizama kojim OS utiče na neurogenezu je povećanje imunoreaktivnosti markera novonastalih neurona u dorzalnom DG, kao i povećanje BDNF u ventralnom DG-u (Gualtieri et al., 2017). Pokazano je da OS dovodi do povećanja volumena CA1 regiona i dentatnog girusa, kao i povećanu funkcionalnu povezanost cjelokupnog hipokampusa (Manno et al., 2022). Tako na primer, u dijabetesu OS može da očuva morfologiju neurona u hipokampusu, tako što povećava dendritsku razgranatost u DG, CA1 i CA3 regionu i time potencijalno ublažava kognitivne defekte koji su uzrokovani stresom (Pamidi et al., 2022). OS je dovelo do povećanog rasta dendrita neurona u CA1 regionu hipokampusa atrofiranih usled endogene depresije (Bhagya et al., 2022). Značaj socijalne komponente OS je pokazan u eksperimentima gdje je OS uticala na plastičnost inhibitorne mreže i nivoe GABA neurotransmitera u CA2 regionu hipokampusa, dok je socijalna izolacija dovela do suprotnog efekta (Loisy et al., 2023). OS je dovela do povećane ekspresije proteina post-sinaptičke gustine, PSD-95, a taj uticaj na sinaptičku plastičnost je izostao kod miševa izloženim socijalnoj izolaciji (H. Wang et al., 2020). Socijalna komponenta OS se pokazala značajnom i u povećanju broja i diferencijaciji novih hipokampalnih neurona kod adultnih ženki miša, gdje se stimulatívni efekat na neurogenezu zadržao čak i bez dodatnih stimulatívni aktivnosti OS (Moreno-Jiménez et al., 2019).

Sagledavši sve efekte OS na strukturu i funkciju hipokampusa, može se zaključiti da je OS važan neinvazívni pristup kojim se mogu postaći brojne pozitivne neuroplastične promjene u svrhu ublažavanja ili uklanjanja negativnih efekata patoloških stanja.

#### **1.7.4. Hipokampus i materinska deprivacija**

Uticaj ranog traumatskog iskustva, poput maternalne deprivacije, je proučavan u dijelovima limbičkog sistema među kojima je i hipokampus. Pokazan je efekat MD na hipokampalne interneurone i inhibitorne sinapse, apoptozu neurona u hipokampusu i promjenu u proteinima koji vezuju kalcijum (Chen et al., 2018; Poleksic et al., 2021; Xu et al., 2018). Na nivou ponašanja, prijavljeni su brojni kognitivni deficiti, poput učvršćivanja memorija straha, povećane osjetljivosti na stres i aksioznost (Miragaia et al., 2018).

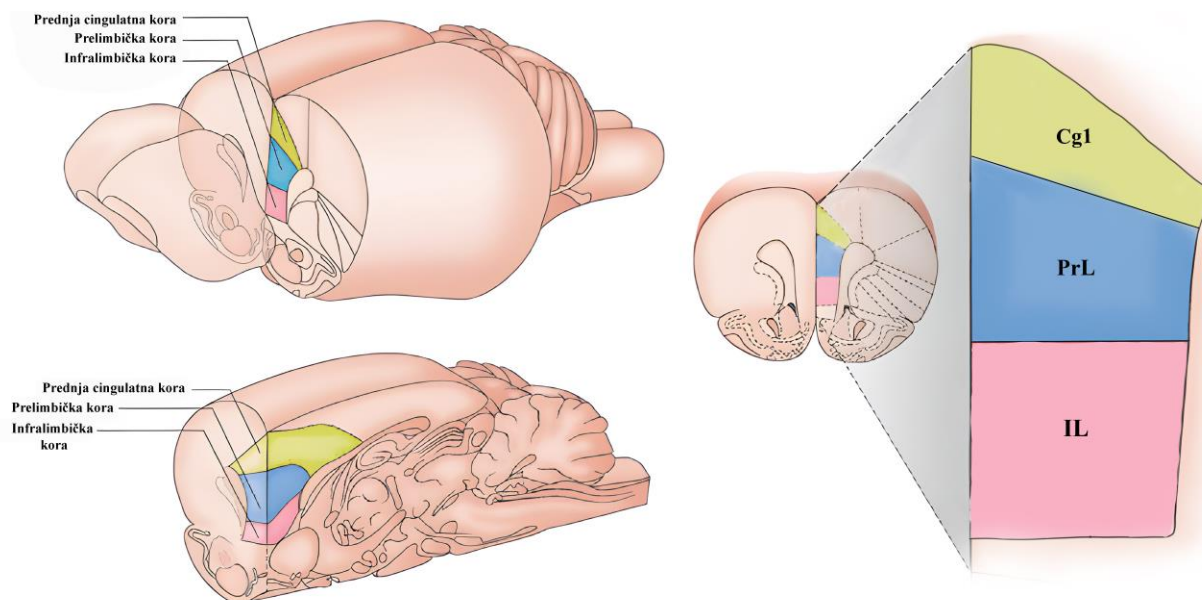


## 1.8. Funkcionalna anatomija prefrontalne kore

### 1.8.1. Struktura, projekcije i funkcija prefrontalne kore

Prefrontalna kora velikog mozga (PFK) je moždana struktura koja prekriva prednji dio frontalnog režnja. Objedinjuje informacije sa svih ostalih kortikalnih struktura i glavna joj je funkcija da isplanira i upravlja motornim, kognitivnim, afektivnim i socijalnim ponašanjem tokom vremena (Kolb et al., 2012). Citoarhitektura se koristi kao glavni kriterijum za definisanje ovog regiona, budući da PFK miševa i pacova se sastoji isključivo od agranularnih slojeva, dok se PFK ljudi i primata odlikuje granularnim četvrtim slojem. Druge anatomske i neurofiziološke homologije sugerišu da pacovi predstavljaju dobar životinjski model za istraživanje osnovnih funkcija PFK (Uylings et al., 2003). Kao kod primata, PFK pacova je snažno povezana sa bazalnom ganglijom preko medijalnog dorzalnog talamusa (Uylings et al., 1990). Iako je pitanje homologije PFK primata i glodara upitno, osnovne funkcije mogu biti fundamentalne i kao takve homologe između vrsta (Carlén, 2017).

Prefrontalna kora velikog mozga pacova je podjeljena na medijalni, orbitalni i lateralni dio. Medijalna prefrontalna kora (mPFC) se dalje funkcionalno dijeli na prednju cingulatnu (Cg1), prelimbičku (PrL) i infralimbičku (IL) koru (Slika 9) (Hoover and Vertes, 2007).



**Slika 9. Anatomija medijalne prefrontalne kore pacova.** U lijevom gornjem uglu je prikazan koronalni, a ispod njega sagitalni presjek prefrontalne kore. Uvećani dio pokazuje prednju cingulatnu (Cg1), prelimbičku (PrL) i infralimbičku (IL) koru.

Modifikovano iz Tynan et al., 2013.

Medijalna prefrontalna kora (mPFK) pacova je povezana sa brojnim funkcijama koje uključuju okulomotornu kontrolu, pažnju, visceromotornu aktivnost, donošenje odluka, usmjerenost ka cilju i radnu memoriju (Kolb, 1984). Dorzalni regioni mPFK, agranularna i cingulatna kora su uključeni u motorne funkcije, dok su ventralni regioni, prelimbička i infralimbička kora, asocirani sa raznim emocionalnim i kognitivnim procesima (Heidbreder and Groenewegen, 2003). Infralimbička kora ima značajan uticaj na automatsku viscelarnu aktivnost, jer njena stimulacija dovodi do promjena u disanju, pokretljivosti gastro-intestinalnog trakta, otkucaja srca i krvnog pritiska (Terreberry and Neafsey, 1983). Sa druge strane, prelimbička kora je neophodna za kognitivne procese, posebno za donošenje odluka (Sieveritz et al., 2022).

### 1.8.2. Prefrontalna kora i hipokampus

PFK i hipokampus su međusobno povezani preko kortikalnih i subkortikalnih puteva. Tako se medijalna PFK zajedno sa orbitofrontalnom korom direktno projektuje na entorinalnu koru i CA1 region hipokampusa kroz *nucleus reuniens*, talamično jezgro koje je značajno povezano sa oba regiona. Takođe, CA1, entorinalna kora i subikulum inerviraju PFK direktno i indirektno preko pomenutog jezgra talamusa (Hoover and Vertes, 2007). Utvrđen je direktni ekscitatorni glutamatergički put koji povezuje CA1 region i subikulum sa PFK (Jay et al., 1996). Prostorno učenje i pamćenje se javlja kod eksperimentalnih životinja kada navigiraju ka određenim ciljevima koji su definisani lokacijom, i za to im je potrebno pravilno funkcionisanje hipokampusa i PFK. Oba regiona doprinose memoriji recipročnim konekcijama sa ostalim regionima kore velikog mozga, ali sa različitim ulogama u obrađivanju informacija. Hipokampus pohranjuje jedinstvene epizode tako što povezuje osobine događaja, dok PFK učestvuje u pamćenju sličnosti između tih epizoda tako što povezuje ishode u pravila i očekivanja (Shapiro et al., 2014).

### 1.8.3. Čelijska organizacija i neurotransmiteri

U kori velikog mozga postoje dva primarna tipa neurona: ekscitatorni piramidalni neuroni koji luče glutamat i inhibitorni interneuroni koji luče GABA. Neuronska mreža koja bi se sastojala od isključivo ekscitatornih konekcija bi pružala nedovoljno složenosti, zbog čega postojanje GABA interneurona unosi fleksibilnost u nervni sistem koji je kompleksniji od odgovora sve-ili-ništa (Klausberger et al., 2003). Inhibirajući okolne piramidalne neurone, GABA-ergički interneuroni djeluju kao važne kočnice ekscitatorne signalizacije, kontrolišući generisanje i dalje prenošenje akcionog potencijala (Pouille and Scanziani, 2001). GABA-ergički interneuroni se mogu klasifikovati na osnovi njihove morfologije, elektrofizioloških osobina ili histoloških markera, pri čemu je najčešća podjela na interneurone koji esprimiraju parvalbumin (PV+), somatostatin (SST+) i jonotropni receptor za serotonin, 5HT3 (Rudy et al., 2011). Najčešći tip interneurona, PV, su poznati i kao brzo-ispaljujući neuroni, imaju sposobnost da generišu akcione potencijale visokom frekvencijom (Kawaguchi et al., 1987). PV interneuroni se dalje mogu podijeliti na dva tipa, „basket“ ćelije koje inervišu tijelo i proksimalne dentrite, i „chandelier“ ćelije koje prave sinapsu sa inicijalnim segmentom aksona ekscitatornog neurona (Kawaguchi and



Kubota, 1997). Budući da su piramidalni neuroni stalno aktivirani sinaptičkim ulazima odn. ekscitatornim-post-sinaptičkim potencijalima (EPSP), za dalju propagacije akcionog potencijala ključna je aktivnost PV interneurona koji obavljaju finu modulaciju aktivnosti ekscitatornih neurona, tako što inhibiraju aktivnost pojedinih piramidarnih ćelija. Ovo je od posebnog značaja u PFK, koja procesuirala kompleksne multimodalne informacije. Na taj način PV interneuroni učestvuju u održavanu osjetljive ravnoteže ekscitacije i inhibicije (E/I), za koju je pokazano da je odnos od 80% inhibicije naspram 20% ekscitacije, ilustrujući značaj interneuronske kontrole ekscitacije u mPFK (Le Roux et al., 2008). Ova ravnoteža nije statična i zahtjeva stalna prilagođavanja inhibitornih odgovora na fluktuacije u nivou ekscitatornih ulaza. Zajedno sa održavanjem balansa, sistem mora posjedovati i kapacitet za promjenu, tj. plastičnost. Pokazano je da E/I balans pomaže pri indukovanju LTP, koji može biti ključan mehanizam za adaptaciju PFK na nove stimuluse (Ferguson and Gao, 2018).

#### 1.8.4. Prefrontalna kora i materinska deprivacija

Za razvoj PFK je potrebno više vremena u poređenju sa ostatkom mozga, što ga čini podložnim za faktore koje mogu dovesti do poremećaja u razvoju i manifestovati se kao neuropsihijatrijske bolesti. Kada je jedinka izložena različitim događajima u svojoj okolini, kao što su senzorni stimuli, stres, hemijske supstance, hormoni i socijalna iskustva, to može uticati da se PFK razvije drugačije (Kolb et al., 2012). Postoje dva aspekta razvića mozga koji su vrlo važni za razumjevanje kako iskustva oblikuju organizaciju kore velikog mozga. Prvo, gustina dendritskih trnova, koja predstavlja aproksimaciju za broj ekscitatornih sinapsi neurona, je dva do tri puta veća u djetinjstvu nego tokom odraslog života. Ovakva prevelika produkcija sinapsi se usporava nakon djetinjstva jer dolazi do specijalizacije sinapsi. Međutim, taj proces se u PFK nastavlja do treće decenije života, što je pokazano u studiji koja je koristila uzorke PFK od novorođenčadi do 91 godine života (Petanjek et al., 2011). Drugo, ova hiper-produkcija dendritskih trnova je najveća u PFK, i najmanjom brzinom se eliminiše (Elston et al., 2009). Netipično dug period eliminacije sinapsi u PFK djelom objašnjava veliki uticaj okoline na kognitivne sposobnosti ljudi u pubertetu. Zato rana životna iskustva mogu postaviti osnove za neuronske mreže koje se kasnije modifikuju u adolescenciji. Tako bi pozitivna ili negativna rana životna iskustva oblikovala PFK i imala cjeloživotne posljedice na regulaciju ponašanja (Kolb et al., 2012).

Priroda odnosa roditelja i mladunčadi može da inicira dugotrajne efekte na razvoj mladih koji se zadržava tokom odraslog života. Ovakve promjene su proučavane u hipokampusu, amigdali i PFK (Fenoglio et al., 2006). U životinjskom svijetu, osim u slučajevima gdje su oba roditelja neophodna za brigu o mladunčadima, kao kod glodara degua (*Octodon degus*), briga majke o potomstvu je apsolutno neohodna za njihovo preživljavanje (Seidel et al., 2011). U proučavanju efekta kratkoročnog razdvajanja majke od mladunčadi pacova, 3h na dan, tokom dojenja, pokazano je da su imali povećanu gustinu sinaptičkih trnova u odraslom dobu (Muhammad and Kolb, 2011).

Promjene u PFK su dokumentovane u slučajevima poremećaja pažnje, šizofrenije, depresije i post-traumatskog poremećaja. Ovaj region se pokazao posebno osjetljivim na stres,

starenje, i Alzhajmerovu bolest. Na životinjskim modelima je pokazano da stresni događaji ispoljavaju dvofazne, vremenski zavisne efekte na PFK (McEwen and Morrison, 2013). Na PFK poseban efekat ima prenatalni stres i postnatalno odvajanje od majke. Pacovi koji su bili izloženi prenatalnom stresu u vidu premještanja majke tokom posljednje sedmice graviditeta, a potom izloženi hroničnom i akutnom stresu kao adulti, pokazali su poremećaje u iščezavanju straha (Green et al., 2011). Rani traumatski stres u vidu odvajanja od majke drugog do dvanaestog dana nakon rođenja je doveo do povećane anksioznosti kao odgovora na hronični stres u adultnom dobu (Eiland and McEwen, 2012).

## 2. Ciljevi istraživanja

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje uloge tenascina-C savremenim metodama fluorescentne mikroskopije u strukturnoj plastičnosti hipokampusa, nakon gajenja  $TnC^{+/+}$  i  $TnC^{-/-}$  miševa 8 sedmica u standardnoj i obogaćenoj sredini. Pored toga, cilj je ispitivanje strukturne plastičnosti prefrontalne kore i hipokampusa pacova koji su bili izloženi ranom traumatskom iskustvu u vidu 24-časovnog odvajanja od majke. Iz navedenih ciljeva proističu sljedeći pojedinačni eksperimentalni zadaci:

1. Ispitivanje uloge tenascina-C i obogaćene sredine u regulaciji broja i ekspresije PNM oko PV+ i PV- interneurona u hipokampusu miša.
2. Ispitivanje uticaja tenascina-C i obogaćene sredine na topološke parametre koji opisuju ultrastrukturu PNM.
3. Istraživanje kako tenascin-C i obogaćena sredina mijenjaju ekspresiju presinaptičkih ekscitatornih i inhibitornih završetaka na neurone obavijene PNM u hipokampusu miša.
4. Ispitivanje uticaja materinske deprivacije na ekspresiju PNM i PV+ interneurona u prefrontalnoj kori i hipokampusu pacova.
5. Ispitivanje efekta materinske deprivacije na zapreminu prefrontalne kore i hipokampusa pacova.
6. Istraživanje kako materinska deprivacija utiče na presinaptičke inhibitorne završetke koji se projektuju na PV+ interneurone obavijene PNM.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Upotrebene hemikalije, puferi, rastvori i antitijela

**Tabela 1.** Nazivi i proizvođači hemikalija upotrebljenih u istraživanju.

Naziv hemikalije	Proizvođač
NaCl – natrijum hlorid	Sigma-Aldrich, Njemačka
NaOH – natrijum hidroksid	
HCl – hlorovodonična kiselina	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – dinatrijum hidrogen fosfat	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – natrijum dihidrogen fosfat	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> – borna kiselina	
SDS - natrijum dodecil sulfat	
EDTA - etilen diamin tetra sirćetna kiselina	
PFA - paraformaldehid	
Mowiol	
Glicerol	
Brom-fenol plavo	
Triton™ X-100	
Magareći serum	
Krezil-violet	
C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O – etanol	SANI-HEM, Srbija
Albumin iz goveđeg seruma – BSA	Merck, Njemačka
Tris baza – Tris (hidroksimetil) – metilamin	Fisher Scientific, VB
Tween 20	Fisher Bioreagents, SAD
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> – saharoza	Carl Roth GmbH, Njemačka
DAPI (4,6-diamidin-2-fenilindol)	Molecular Probes, SAD
Ketamin	Richter Pharma, Austrija
Ksilazin	Provet, Srbija
Streptavidin-biotin kit	Vector Laboratories, SAD
Natrijum citrat	Carlo Erba, Njemačka
PCR Master Mix	Fermentas, Njemačka
Prajmeri za TnC	Bio Cat, Njemačka

**Tabela 2.** Sastav i koncentracija rastvora upotrebljenih u navedenim metodama.

<b>Metoda</b>	<b>Rastvor i pH vrijednost</b>	<b>Sastav i koncentracije</b>
PCR	TDB, pufer za digestiju pH 8,4	50 mM Tris pH 8,0 50 mM EDTA pH 8,0 0,5% SDS
	PCR smješa	12,5 µl Master Mix: 0,4 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP i dTTP), 4 mM MgCl <sub>2</sub> i 0,05 U/µl Taq DNK polimeraze 8,5 µl sterilne dH <sub>2</sub> O 1 µl 0,4 µM Primer 1 ES <i>delete new</i> 1 µl 0,4 µM Primer 2 ES <i>TnC (pos) RV+1</i> 1 µl 0,4 µM Primer 3 ES <i>WT new 59</i>
	TBE, Tris-boratni-EDTA pufer	0,45 M Tris 0,45 M Borna kiselina 50 mM EDTA pH 8,0
	Brom-fenil plavo	0,25 % brom-fenil plavo 65% glicerol 34,75% dH <sub>2</sub> O
Immunohistohemija	0,2 M PB, fosfatni pufer pH 7,4	0,16 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,04 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> dH <sub>2</sub> O
	NaCl fiziološki rastvor	9 g NaCl 1000 ml dH <sub>2</sub> O
	4% PFA, paraformaldehid pH 7,4	40 g PFA 500 ml dH <sub>2</sub> O 500 ml 0,1M PB 1M NaOH
	Rastvor saharoze	30% saharoza 0,1 M PB
	0,01 M PBS, fosfatni pufer, pH 7,4	0,2 M PB 20x 147 mM NaCl dH <sub>2</sub> O
	Mowiol medijum za pokrivanje	9,6% Mowiol 24% Glicerol 48% 0,2 M Tris pufer pH 8,5 24% ddH <sub>2</sub> O
	0,01 M Natrijum citratni pufer, pH 6	10 ml 0,1 M Na citrat 50 µl Tween 90 ml dH <sub>2</sub> O

	Serum za blokiranje	5 i 20% normalni magareći serum 0,2% TritonX-100 PBS
Anestezija za miševe	0,01 ml/kg životinje	100 mg/kg ketamin 10 mg/kg ksilazin fiziološki rastvor NaCl
Anestezija za pacove	0,01 ml/kg životinje	100 mg/kg ketamin 33 mg/kg ksilazin fiziološki rastvor NaCl

**Tablela 3.** Antitijela korištena u ovom istraživanju.

<b>Antitijelo</b>	<b>Porijeklo</b>	<b>Razblaženje</b>	<b>Proizvođač</b>
Biotinizovani lektin	<i>Wisteria floribunda</i>	1:100 konfokalna mikroskopija 1:200 super-rezoluciona mikroskopija	MilliporeSigma, SAD
PV	miš, monoklonalno	1:1500	MilliporeSigma, SAD
VGAT	zec, poliklonalno	1:200	Synaptic Systems, Njemačka
VGlut1	zamorče, poliklonalno	1:600	
Streptavidin Alexa Fluor 488	<i>Streptomyces avidinii</i>	1:200	Thermo Fisher Scientific, SAD
Anti- mišije Alexa Flour 555	magarac	1:200	Thermo Fisher Scientific, SAD
Anti- zečije Alexa Flour 555			
Anti- zamorče Alexa Flour 647			

## 3.2. Životinje

U eksperimentima ove doktorske disertacije su korišteni dva tipa laboratorijskih miševa genetičke pozadine inbrednog soja C57BL/6, kao i pacovi soja Wistar. Genetički modifikovani miševi, koji u cijelom organizmu ne ekspimiraju funkcionalan protein tenascin-C, označeni su kao TnC<sup>-/-</sup> miševi (Evers et al., 2002). Miševi divljeg soja sa fiziološkom ekspresijom tenascina-C su označeni kao TnC<sup>+/+</sup> miševi. Kolonija genetski modifikovanih miševa je održavana ukrštanjem ženki divljeg soja sa mužjakom deficijentnim za TnC. Homozigotne jedinke koje su upotrebljene u eksperimentu su dobijene heterozigotnim ukrštanjem TnC<sup>+/+</sup> miševa. Genotip svih životinja je potvrđen metodom lančane reakcije polimerizacije (eng. *Polimerase Chain Reaction, PCR*). Wistar pacovi koji su upotrebljeni u ovim eksperimentima su dobijeni sparivanjem jednog mužjaka sa dvije ženke iz istog legla. U oba tipa eksperimenta su korišteni samo mužjaci. Miševi soja C57BL/6 su uzgajani na Institutu za fiziologiju i biohemiju, Biološkog fakulteta, dok su pacovi soja Wistar uzgajani na Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Maksimalan napor je učinjen da bi se smanjila patnja i broj eksperimentalnih životinja. Svi navedeni eksperimenti i briga o životinjama su sprovedeni u skladu sa NIH Direktivom za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja, u skladu sa Evropskom direktivom (86/609/EEC), i odobreni od strane Etičkog komiteta Biološkog (broj dozvole: 323-07-08318/2021-05) i Medicinskog fakulteta (broj dozvole: 323-07-01,245/ 2014-05/2), Univerziteta u Beogradu i Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije.

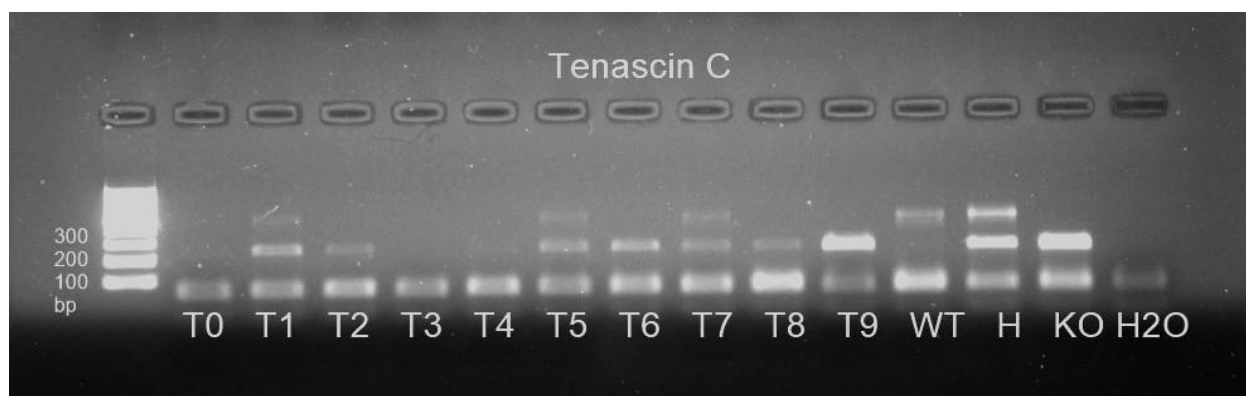
### 3.2.1. Genotipizacija miševa PCR reakcijom

Da bi se odredio genotip životinja koje su korištene za održavanje kolonije i eksperiment, urađena je PCR reakcija na DNK uzorke. Miševima starim do 2 sedmice su uzeti odsječci uha, prečnika 3 mm, prilikom obilježavanja uha životinja sa alatom koji ostavlja rupice, *ear puncher*-om. Svaki uzorak je smješten u 200 µl TDB pufera za digestiju sa 10 µl proteinaze K, radi enzimskog razlaganja tkiva. Uzorci su inkubirani na 65 °C, 3 sata na termo bloku ili vodenom kupatilu. Sljedeći korak podrazumjeva centrifugiranje digestovanog uzorka na 12300 rpm, 5 minuta. 10 µl DNK iz uzorka, koja se nakon centrifugiranja u vidu bijeličastih niti nalazi ispod površine tečnosti, pažljivo se pokupi pipetom i razblaži 20x u 190 µl sterilne H<sub>2</sub>O. Pravi se PCR smješa koja sadrži potrebne enzime, nukleotide, jone magnezijuma i prajmere i dodaje se 1 µl razblaženog uzorka DNK. Uzorci se smještaju u PCR mašinu gdje se proces umnožavanja DNK dešava po sljedećim fazama:

**Tabela 4.** Protokol PCR reakcije.

Faza	Temperatura °C	Trajanje (sec)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	150	1
Denaturacija	94	30	30
Hibridizacija	65	45	
Elongacija	72	50	
Finalna elongacija	72	300	1

Nakon završetka umnožavanja DNK, uzorci se nalivaju u bunariće 1,5 % agaroznog gela, koji se sastoji od 10% TBE pufera i 6  $\mu$ l etidijum bromida koji se veže za DNK i omogućava vizualizaciju pomoću UV svjetlosti. Horizontalnom elektroforezom od 100 V u trajanju od 30 minuta se razdvajaju fragmenti DNK. TnC<sup>-/-</sup> homozigoti imaju DNK fragment od 225 baznih parova i potvrđuju se trakom koja najudaljenija od mjesta nalivanja uzorka. DNK fragment TnC<sup>+/+</sup> homozigota posjeduje 461 baznih parova, najsporije se razdvaja elektroforezom, dok se TnC<sup>+/-</sup> heterozigoti identifikuju prisustvom obje trake (Slika 10).



**Slika 10. Gel sa DNK uzorcima miševa.** Uslikano kamerom transiluminatora koji prikazuje 10 DNK uzoraka (T0-T9), od kojih su 3 TnC<sup>+/-</sup> heterozigota (T1, T5 i T7) potvrđena prisustvom dvije trake, i 4 TnC<sup>-/-</sup> homozigota (T2, T6, T8 i T9) koje odlikuje prisustvo jedne trake. Odsustvo traka kod uzoraka T0, T3 i T4 ukazuju na nisku koncentraciju umnožene DNK. Kontrolni uzorci su označeni sa WT (TnC<sup>+/+</sup>), H (TnC<sup>+/-</sup>) i KO (TnC<sup>-/-</sup>), a lijevo je naliven marker koji obilježava dužine trake DNK uzorka, bazni parovi (bp).

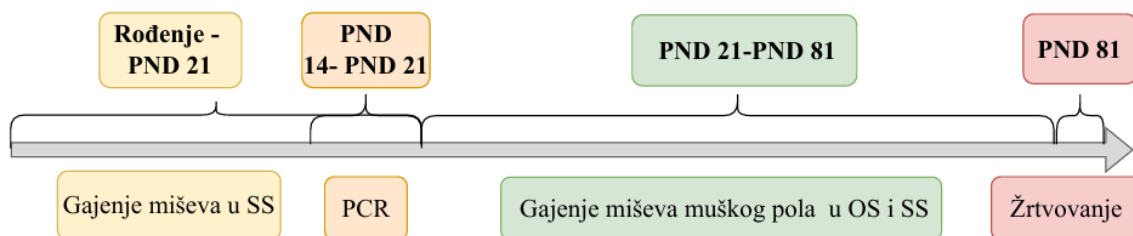
### 3.3. Eksperiment obogaćene sredine

Od rođenja do 21 PND, miševi oba genotipa su gajeni u standardnim kavezima zajedno sa majkom. Nakon genotipizacije, na PND 21, TnC<sup>+/+</sup> i TnC<sup>-/-</sup> miševi muškog pola su nasumično raspoređeni u standarne kaveze (standardna sredina, SS) ili u kaveze koji omogućavaju obogaćenu sredinu (OS). Minimalno 4, a maksimalno 6 životinja je gajeno u jednoj eksperimentalnog grupi. Eksperiment obogaćene sredine je trajao 8 sedmica, i za to vrijeme su kontrolne životinje gajene u standardnim kavezima (Slika 11). Ukupno su gajene 4 grupe životinja na sljedeći način:

1. TnC<sup>+/+</sup> SS grupa – miševi divljeg soja u standardnoj sredini
2. TnC<sup>+/+</sup> OS grupa – miševi divljeg soja u obogaćenoj sredini
3. TnC<sup>-/-</sup> SS grupa – TnC<sup>-/-</sup> miševi u standardnoj sredini
4. TnC<sup>-/-</sup> OS grupa – TnC<sup>-/-</sup> miševi u obogaćenoj sredini



## EKSPERIMENT OBOGAĆENE SREDINE



**Slika 11. Šematski prikaz eksperimentalnog postupka sa istaknutim vremenskim tačkama.** Od rođenja do treće sedmice života (postnatalni dan 21, PND 21), miševi oba pola se gaje sa majkom u standardnim kavezima. Nakon genotipizacije,  $TnC^{+/+}$  i  $TnC^{-/-}$  mužjaci se raspoređuju u obogaćenu i standardnu sredinu. Nakon 2 mjeseca se žrtvuju i počinje postupak pripreme tkiva.

Obogaćena sredina je postignuta gajenjem životinja u kavezima većih dimezija: 54 x 39 x 27 cm, koji sadrže tunele, skrovišta, merdevine, lavirinte, loptice i točkove za trčanje (Slika 12). Da bi se eksperimentalne životinje motorno, senzitivno i kognitivno stimulisale, raspored predmeta u kavezu OS se mjenjao svaki dan a sastav je mjenjan sedmično. Na taj način su životinje razvijale prostornu memoriju, navigacijske sposobnosti i procesuiranje novih senzornih informacija. Takođe, fizički su bile aktivnije i socijalno više angažovane, zbog većeg broja životinja, u poređenju sa kontrolnim grupama u standardnim kavezima dimenzija 32 x 20 x 13 cm, koji ne posjeduju predmete za fizičku aktivnost, igru i istraživanje prostora. U svim eksperimentalnim grupama, hrana i voda su bile dostupne *ad libitum*, temperatura sobe je iznosila  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , i osvetljenost  $\sim 100$  lx sa automatski podešenim ciklusom od 12-h dan/noć.

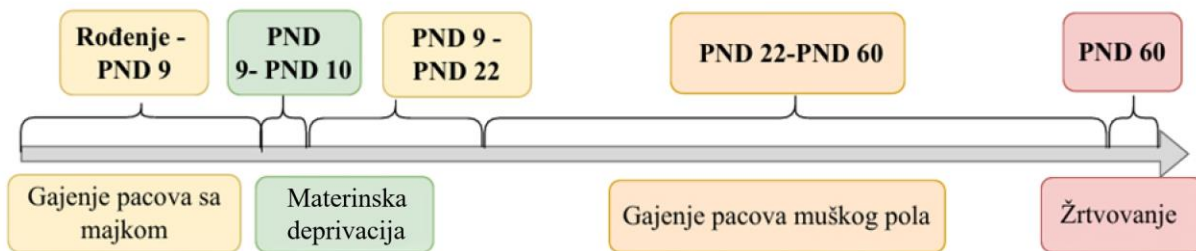


**Slika 12. Kavezi za gajenje koji podržavaju obogaćenu sredinu.** Pristupstvo tunela, točka za trčanje, mjesta za skrivanje i istraživanje prostora, kao i za socijalnu interakciju, omogućava istraživačku, motornu, socijalnu i kognitivnu stimulaciju eksperimentalnih životinja.

### 3.4. Eksperiment materinske deprivacije

Za potrebe ovog eksperimenta, jedan mužjak je sparivan sa dvije ženke iz istog legla. 14 dana nakon sparivanja, ukoliko su ženke skotne, odvajaju se u posebne kaveze i kontroliše se dan okota. Neposredno nakon okota, nasumično se određuje koje će leglo biti izloženu ranom traumatskom iskustvu materinske deprivacije. 9-tog postnatalnog dana (PND 9), u 10:00 časova, majke se odvajaju od okota i smještaju u drugi kavez u odvojenoj sobi radi eliminacije zvukova koji ukazuju na njeno prisustvo. Okot se ne uznemirava tokom 24h, i sljedećeg 10-tog PND, u isto vrijeme se majke vraćaju svojim leglima. U kontrolnim grupama se majka ne odvaja od okota na deveti postnatalni dan. Životinje iz obje grupe se odvajaju od majki nakon završetka sisanja na PND 22, razvrstavaju po polovima i tako gaje do žrtvovanja na PND 60 (Slika 13). Majke i okoti su gajeni u standarnim kavezima dimenzija 26 x 42 x 15 cm, u prostorijama temperature  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , sa automatski podešenim ciklusom od 12-h dan/noć. Voda i hrana su bile dostupne *ad libitum*, osim za legla koja nisu sisala za vrijeme 24-časovne maternalne deprivacije.

#### EKSPERIMENT MATERINSKE DEPRIVACIJE



**Slika 13. Šematski prikaz eksperimentalnog postupka sa istaknutim vremenskim tačkama.** Od rođenja do devetog dana života (postnatalni dan 9, PND 9), pacovi oba pola se gaje sa majkom. Od PND 9 do PND 10 se cijelo leglo odvoja od majke na 24h. Nakon toga se majka vraća u kavez do PND 22, od kojeg se raspoređuju po polovima. Mužjaci pacova se gaje do 2 mjeseca starosti, žrtvuju na PND 90 i i počinje postupak pripreme tkiva.

### 3.5. Priprema tkiva

Nakon eksperimenta obogaćene sredine i materinske deprivacije, životinje su žrtvovane transkardijalnom perfuzijom. Prvo su anestetizirane rastvorom ketamina i ksilazina (100 mg/kg ketamina i 10 mg/kg ksilazina za miševе, i 100 mg/kg ketamina i 33 mg/kg za pacove), intraperitonealnom injekcijom u donji lijevi kvadrant prednjeg trbušnog zida. Kada je kod životinja potvrđena duboka anestezija odsustvom refleksa povlačenja donjih ekstremiteta, pažljivo su pričvršćene na podlogu od stiropora. Grudni koš je otvoren jednim vertikalnim rezom ka vratu i dva reza ka prednjim ekstremitetima životinja, kako bi se oslobodio pristup srcu. U lijevu komoru je uvedena igla, dok je presječen zid desne pretkomore, čime je početa perfuzija sa 150-200 ml fiziološkog rastvora (0,9 % NaCl) za pacove i 50-100 ml za miševе. Nakon što je bilo primjećeno obezbojavanje jetre, koje ukazuje na to da je većina krvi iz cirkulatornog sistema uklonjena, protok je preusmjeren na 4% PFA iste zapremine kao i fiziološkog rastvora. Potvrda uspješne fiksacije tkiva je primjetno grčenje i ukočenost repa. Životinje se dekapituju i vrši se izolacija mozga, koji se dodatno fiksira u 4% PFA rastvoru na temperaturi od 4 °C tokom 24h. Sljedeće se vrši dehidratacija tkiva u 30% rastvoru saharoze na temperaturi od + 4 °C, dok tkiva ne potonu na dno posude, što je signal uspješne dehidratacije u cilju sprječavanja nastanka kristala leda u moždanom tkivu. Slijedi dvostruko obilježavanje omota u kojima se mozgovі čuvaju i prenose dalje na duboko smrzavanje na – 80 °C, do sječenja uzoraka. Uzorci mozga se sjeku na kriotomu (Leica CM1850, Nussloch, Nemačka) na -25 °C, debljine 25 µm za pacovske uzorke, 30 i 10 µm za uzorke mišjeg mozga. Presjeci pacovskog mozga se skupljaju na Super Frost Ultra Plus predmetna stakla pozitivno naelektrisane površine (Menzel Glaser, Braunschweig, Njemačka), stereološkim načinom prikupljanja uzoraka tako se na svakom predmetnom staklu nalazi 5-6 moždanih presjeka koji su prikupljeni iz tkiva koje je odvojeno 250 µm. Presjeci mišjeg mozga se takođe skupljaju Super Frost Ultra Plus predmetna stakla (Menzel Glaser, Braunschweig, Njemačka), sa razlikom što se na svakom predmetnom staklu nalazi 3-4 presjeka koji su sekvencionalno prikupljeni jedan za drugim. Mišji presjeci koji su korišteni za super-rezolucionu mikroskopiju se prikupljaju na pokrovnim staklima debljine 1.5 H (Marienfeld, Njemačka), sekvencionalnim pristupom. Svi uzorci se čuvaju na – 20 °C do upotrebe.

### 3.6. Imunohistohemija

Imunohistohemijsko obilježavanje tkiva i ćelija koristi u cilju određivanja mjesta ekspresije proteina od interesa i njegove distribucije. Postiže se vezivanjem visoko specifičnih primarnih antitijela za antigene proteina od interesa. Za primarna antitijela se vezuju sekundarna antitijela konjugovana sa fluorescentnim bojama, i taj signal se može detektovati fluorescentnim mikroskopom, nakon ekscitacije svjetlošću određene talasne dužine. Da bi se tkivo pripremilo za fluorescentno obilježavanje, moždani presjeci su ostavljeni da se adaptiraju na sobnu temperaturu, a zatim su rehidratirani u 0,01 M rastvoru PBS-a u trajanju od 30 minuta. Za obilježavanje mišjih presjeka markerom za PNM, PV neurone i sinapse, pristupljeno je protokolu demaskiranja antigena od interesa, tako što su presjeci potopljeni 10 minuta u rastvor natrijum citratnog pufera, zagrijanog na 75 °C. Nakon hlađenja presjeka i ispiranja 2 puta u 0,01 M PBS-u, presjeci su inkubirani 40 minuta u rastvoru za blokiranje, koji sadrži 5% normalni magareći serum, za obilježavanje PNM i PV neurona, dok je 20% serum korišten u protokolu obilježavanja sinaptičkih terminala, da bi se spriječilo nespecifično vezivanje antitijela. Da bi se blokirao endogeni biotin, biotinski receptori i omogućilo specifično vezivanje markera za PNM, presjeci su inkubirani u streptavidin-biotin kitu za blokiranje. Slijedilo je inkubiranje moždanih presjeka u rastvoru primarnih antitijela u trajanju od 24h za markere PNM i PV neurone, i 48h za obilježavanje sinaptičkih markera, na temperaturi od + 4 °C. Za fluorescentno obilježavanje perineuronskih mreža, u rastvoru primarnih antitijela, korišten je biotinizovan lektin iz biljke *Wisteria floribunda* (*Wisteria floribunda agglutinin*- WFA), koji se nespecifično veže za N-acetilglikozaminske ostatke na bočnim lancima proteoglikana koji većinski čine PNM. WFA predstavlja standardni marker za vizualizaciju PNM i praćenje promjena u njihovoj ekspresiji. Za obilježavanje interneurona koji ekspimiraju parvalbumin, korišteno je mišije antitijelo na parvalbumin. Presinaptički terminali su obilježeni antitijelom zamorca na vezikularni glutamatni transporter – VGlut1 za ekscitatorne sinapse, i zečijim antitijelom na vezikularni GABA transporter – VGAT, za inhibitorne sinapse. Za obilježavanje sinaptičkih terminala je korišten protokol za imunohistohemijsko bojenje koje omogućava kvantifikaciju sinaptičkih klastera (Ippolito and Eroglu, 2010). Inkubaciji primarnim antitijelima je slijedilo ispiranje nevezanih primarnih antitijela u 0,01 M PBS-u i inkubiranje rastvorom sekundarnih antitijela. Tako se za vizualizaciju WFA koristio streptavidin konjugovan sa fluorescentnom bojom Alexa Fluor 488, a za mišje antitijelo na parvalbumin je vezano magareće antitijelo na proteine miša, konjugovano sa Alexa Fluor 555. Magareće antitijelo na proteine zamorca, konjugovano sa Alexa Fluor 647 je vezano za zamorče-anti VGlut1, dok je magareće antitijelo na proteine zeca, konjugovano sa Alexa Fluor 555, vezano za zečje-anti VGAT. Presjeci su inkubirani sekundarnim antitijelima u trajanju od 2h, u mraku na sobnoj temperaturi, radi ubrzanja kinetike vezivanja antitijela i očuvanja fluorescencije. Presjeci su detaljno isprani u 0,01 M PBS da bi se odstranila nevezana sekundarna antitijela i tako umanjila pozadinska fluorescencija koja ne potiče od proteina od interesa. Posljednja inkubacija je obavljena u rastvoru DAPI boje koja obilježava jedra i detektuje se UV svjetlošću, nakon čega je slijedio set ispiranja u PBS. Nanesen je medijum za pokrivanje Mowiol za konfokalnu i 90% glicerol za super-rezolucijsku mikroskopiju. Presjeci su pokriveni pokrovnim staklima i ostavljeni da se osuše na sobnoj temperaturi u mraku do dugotrajnog skladištenja na -

20 °C. U svakoj seriji imunohistohemijskog bojenja su korišteni presjeci iz svih eksperimentalnih grupa i negativna kontrola u vidu izostavljenog primarnog antitijela. Detaljni protokoli za obilježavanje pacovskih i mišijih tkiva su dati u Tabeli 5 i 6.

### **3.7. Histološko bojenje**

Za određivanje volumena prefrontalne kore i hipokampusa pacova, korištena je boja krezil-violet koja se vezuje za Nislovu supstancu u neuronima. Presjeci mozga su inkubirani 5 minuta u ksilenu, 3 minuta u 95% i 70% etanolu i isprani u destilovanoj vodi. Boja krezil violet je aplicirana na presjeke u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 60 °C, zatim su presjeci isprani u destilovanoj vodi i inkubirani u rastućim koncentracijama etanola (70, 95 i 100%) po 3 minuta. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi, i finalne inkubacije od 5 minuta u ksilenu, presjeci su ostavljeni da se suše i apliciran je medijum za pokrivanje *Mowiol*.

**Tabela 5.** Protokoli imunohistohemijskog obilježavanja presjeka mišijeg mozga za različite vrste mikroskopije.

Vrsta presjeka	Presjeci mišijeg mozga					
Vrsta mikroskopije	<i>Konfokalna mikroskopija</i>			<i>Super - rezoluciona mikroskopija</i>		
Debljina tkiva	30 µm			10 µm		
Markeri od interesa i protokol bojenja	<b>WFA/PV</b>		<b>WFA/Vglut 1/VGAT</b>		<b>WFA</b>	
	Temperiranje 30 min na sobnoj temperaturi. Rehidratacija u 0,01 M PBS 30 minuta.					
	Otkrivanje antigena u Na-citratom puferu na 75 °C 10 minuta. Hlađenje i ispiranje 2 puta po 5 minuta u 0,01 M PBS.					
	Inkubacija u 5% magarećem serumu sa 0,2 % Triton X-100 u 0,01 M PBS, 40 minuta na sobnoj temperaturi.		Inkubacija u 20% magarećem serumu u 0,01 M PBS, 1h na sobnoj temperaturi.		Inkubacija u 5% magarećem serumu sa 0,2 % Triton X-100 u 0,01 M PBS, 40 minuta na sobnoj temperaturi.	
	Inkubacija u rastvoru streptavidina 15 minuta, kratko ispiranje u PBS i inkubacija u rastvoru biotina 15 minuta.					
	Inkubiranje u rastvoru primarnih antitijela 24h na + 4 °C:		Inkubiranje u rastvoru primarnih antitijela 48h na + 4 °C:		Inkubiranje u rastvoru primarnih antitijela 24h na + 4 °C:	
	<b>WFA</b>	1:100	<b>WFA</b>	1:100	<b>WFA</b>	1:200
	<b>zečje anti- PV</b>	1: 1500	<b>zečje anti-VGAT</b>	1:200		
			<b>zamorče-anti VGlut1</b>	1:600		
	Magareći serum	1%	Magareći serum	10%	Magareći serum	1%
	Triton X	0,04%	Triton X	0,3%	Triton X	0,04%
	PBS	0,01 M	PBS	0,01 M	PBS	0,01 M
	Ispiranje u 0,01 PBS 3 puta po 15 minuta.					
	Inkubiranje u rastvoru sekundarnih antitijela 2,5 h na sobnoj temperaturi:					
	Streptavidin AF 488	1:200	Streptavidin AF 488	1:200	Streptavidin AF 488	1:200
	Magareće anti-zečje AF 555	1:200	Magareće anti-zečje AF 555	1:200		
			Magareće anti-zamorče AF 647	1:200		
			Magareći serum	10%		
			Triton X	0,3%		
	PBS	0,01 M	PBS	0,01 M	PBS	0,01 M
Ispiranje u 0,01 PBS 4 puta po 15 minuta.						
Inkubiranje u rastvoru DAPI markera 1: 4000 u 0,01 M PBS 10 minuta. Ispiranje u 0,01 PBS 3 puta po 10 minuta.						
Nanošenje Mowiol medijuma i pokrovnih stakala.				Nanošenje 90% glicerola i lijepljenje pokrovnih stakala.		

**Tabela 6.** Protokoli imunohistohemijskog obilježavanja presjeka pacovskog mozga za različite vrste mikroskopije.

Vrsta presjeka	<b>Presjeci pacovskog mozga</b>			
Vrsta mikroskopije	<i>Konfokalna mikroskopija</i>			
Debljina tkiva	25 µm			
Markeri od interesa i protokol bojenja	<b>WFA/PV</b>		<b>WFA/PV/VGAT</b>	
	Temperiranje 30 min na sobnoj temperaturi. Rehidracija u 0,01 M PBS 3 puta po 10 minuta.			
			Otkrivanje antigena u Na-citratom puferu na 75 °C 10 minuta. Hlađenje i ispiranje 2 puta po 5 minuta u 0,01 M PBS.	
	Inkubacija u 10% magarećem i 1% goveđem serumu sa 0,3 % Tritonom X-100 u 0,01 M PBS, 1 sat na sobnoj temperaturi.		Inkubacija u 20% magarećem u 0,01 M PBS, 1 sat na sobnoj temperaturi.	
	Inkubacija u rastvoru streptavidina 15 minuta, kratko ispiranje u PBS i inkubacija u rastvoru biotina 15 minuta.			
	Inkubiranje u rastvoru primarnih antitijela 24h na + 4 °C:		Inkubiranje u rastvoru primarnih antitijela 48h na + 4 °C:	
	<b>WFA</b>	1:100	<b>WFA</b>	1:100
	<b>mišje anti- PV</b>	1: 1000	<b>mišje anti- PV</b>	1: 1000
			<b>zečje anti-VGAT</b>	1:200
	Magareći serum	2%	Magareći serum	10%
	Goveđi serum	1%		
	Triton X	0,3%	Triton X	0,3%
	PBS	0,01 M	PBS	0,01 M
	Ispiranje u 0,01 PBS 3 puta po 15 minuta.			
	Inkubiranje u rastvoru sekundarnih antitijela 2 h na sobnoj temperaturi:			
	Streptavidin AF 488	1:200	Streptavidin AF 488	1:200
	Magareće anti-zečje AF 555	1:200	Magareće anti-zečje AF 555	1:200
	Goveđi serum	2%	Magareće anti- mišje AF 647	1:200
			Magareći serum	10%
			Triton X	0,3%
PBS	0,01 M	PBS	0,01 M	
Ispiranje u 0,01 PBS 4 puta po 15 minuta.				
Nanošenje Mowiol medijuma i pokrovnih stakala.				

## 3.8. Mikroskopija

### 3.8.1. Konfokalna mikroskopija

Imunofluorescentno obilježeni presjeci prefrontalne kore i hipokampusa pacova kao i hipokampusa miša su snimljeni na LSM 510 Axioskop konfokalnom laserskom skenirajućem mikroskopu ( Carl Zeiss GmbH, Njemačka). Uspravni mikroskop Axioskop 2 FS čini konfokalnu komponentu sistema, dok laserska jedinica sadrži argonski laser na 488 nm talasne dužine i dvije linije helijum-neonskog lasera, na 543 i 633 nm talasne dužine. Laserska emisiona svjetlost se razdvaja u različite kanale dihroičnim ogledalom NFT 545 koji propušta svjetlost talasnih dužina većim od 545 nm, a reflektuje svjetlost talasne dužine manje od 545 nm. Uskopojasnim filterom BP 505-530 se razdvaja svjetlost zelenog dijela spektra, širokopojasnim filterom LP 585 crveni dio spektra, a širokopropusnim filterom 650 se razdvaja daleki crveni dio svjetlosti. Tokom snimanja su korišteni objektivni Plan-Neofluar 40X numeričke aperture 1.3 i Plan—Achromat 63X numeričke aperture 1.4, sa uljem refraktivnog indeksa 1.518 kao imerzionim medijumom. Podešavanja koja utiču na intenzitet signala kao što su intenzitet lasera, debljina optičkog presjeka i osetljivost detektora su održavana konstantnim tokom snimanja.

Da bi se ispitala ekspresija perineuronskih mreža i parvalbumin pozitivnih interneurona, hipokampus  $TnC^{+/+}$  i  $TnC^{-/-}$  miševa, kao i prefrontalna kora i hipokampus MD i kontrolnih pacova, su snimljeni u koristeći objektiv 40X, u 2D dvokanalnom režimu, slika veličine 1024 x 1024 piksela. Trostruko bojenje PNM, VGlut1 i VGAT markera u mišjem tkivu, kao i PNM, PV i VGAT u pacovskom tkivu je snimano 63X objektivom, digitalnim zumom od 1.5, koristeći opciju *Z-stack*. U tom režimu snimanja, 7 optičkih presjeka debljine 1  $\mu$ m se povezuje u trodimenzionalnu sliku i omogućuje detaljnu analizu sinaptičkih markera u odnosu na perineuronske mreže.

PNM, PV+ neuroni i sinaptički markeri su snimljeni sa 3-4 sukcesivnih presjeka sa jedne hemisfere dorzalnog hipokampusa miša. Sa DG, CA1 i CA3 hipokampalnog podregiona su usnimljene i analizirane 2 slike po eksperimentalnoj životinji, dok je sa CA2 regiona usnimljena i analizirana po 1 slika.

Isti markeri su snimljeni sa 5-12 stereoloških presjeka jedne hemisfere prefrontalne kore i dorzalnog hipokampusa pacova. Iz svake eksperimentalne životinje su snimljene po 2 slike iz svakog podregiona prefrontalne kore (Cg1, PrL, IL) i hipokampusa (DG, CA1, CA3), jedna slika iz površinskog a druga iz dubokog sloja prefrontalne kore.

### 3.8.2. Svjetlosna mikroskopija

Radi procjene volumena prefrontalne kore i hipokampusa pacova, presjeci obojeni sa krezil violet bojom, koja obilježava neurone, su snimljeni koristeći digitalni mikroskop Leica EC3, objektivom koji uveličava 2x.



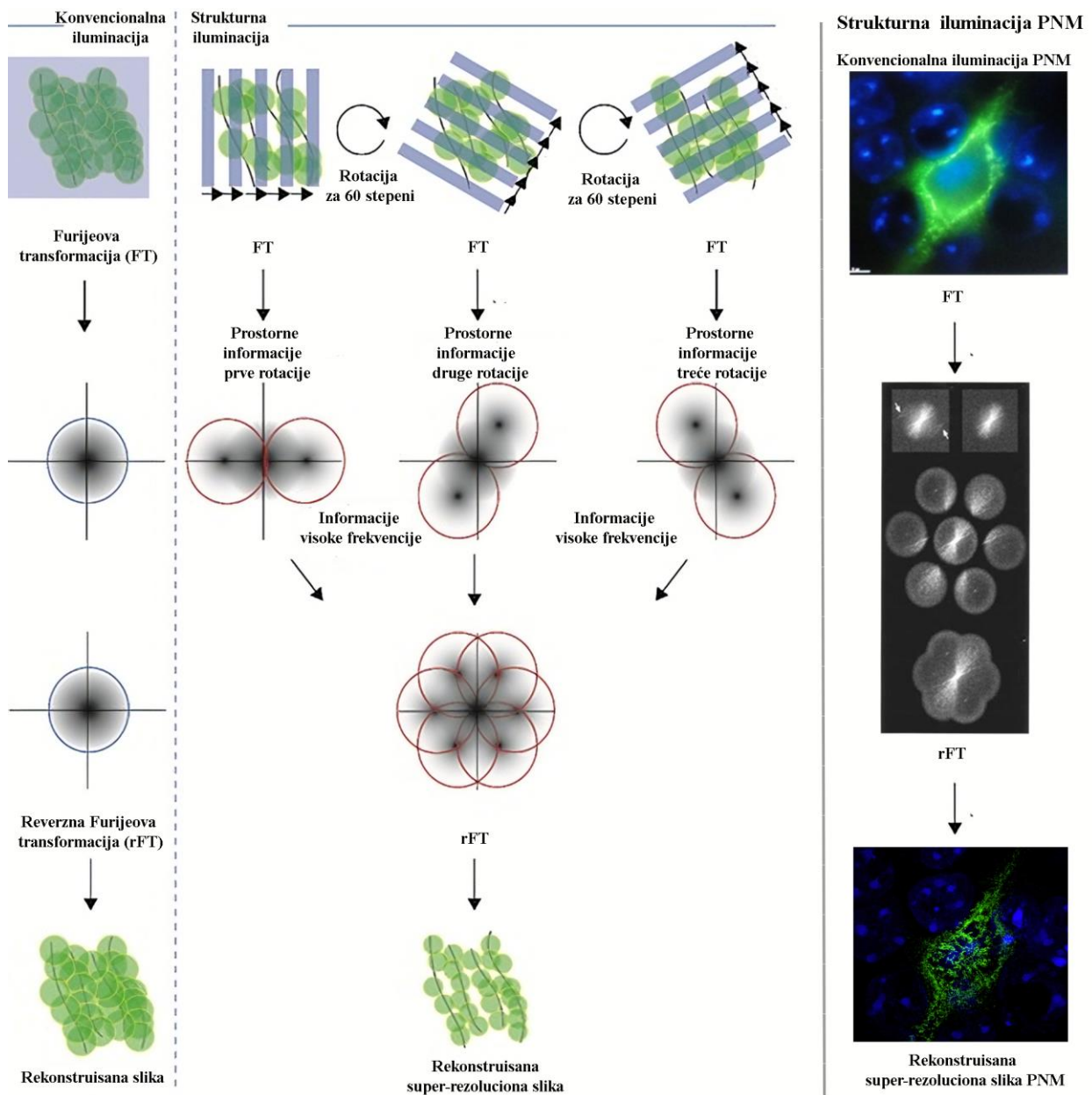
### 3.8.3. Super-rezoluciona mikroskopija

Prostorna rezolucija je ograničena efektima difrakcije koju je opisao Ernst Abbe. Prema njegovoj formuli efekat difrakcije ograničava rezoluciju optičkog mikroskopa na približno polovinu talasne dužine korištene svjetlosti. U praksi, najviša rezolucija svjetlosne mikroskopije je bila oko 200 nm prije pojave super-rezolucionih mikroskopija (Schermelleh et al., 2010).

Super-rezolucionu mikroskopiju od drugih vrsta svjetlosne mikroskopije odvaja način zaobilaznja grance rezolucije, koji omogućava preko 10 puta bolju rezoluciju od svjetlosne mikroskopije. Za razvoj ovih tehnika trojica naučnika su 2014. godine dobili Nobelovu nagradu za hemiju: Erik Becig i Vilijam Merner za razvoj fotoaktivirane lokalizacijske mikroskopije (eng. *Photoactivated localization microscopy*-PALM), a Štefan Hel za metodu deplecije stimulisanom emisijom (eng. *Stimulated emission depletion*- STED). Iste godine kada je razvijen PALM, 2006. godine, druga grupa naučnika je izumila sličnu metodu- stohastičnu optičku rekonstrukcijsku mikroskopiju (eng. *Stochastic optical reconstruction microscopy*-STORM) (Schermelleh et al., 2010).

Super-rezoluciona tehnika koja je bila korištena u ovoj studiji je Mikroskopija Strukturirane Iluminacije (eng. *Structured Illumination Microscopy*, SIM ). SIM je fluorescentna mikroskopija širokog polja, koja omogućava snimanje slika sa većom prostornom rezolucijom u poređenju sa konvencionalnim fluorescentnim mikroskopima, poput konfokalnog. Princip koji omogućava snimanje slika poboljšane rezolucije je difrakciona rešetka kroz koju prolazi laserska svjetlost i ekscitira fluorofore u uzorku. Difrakciona rešetka se pomjera i snima sliku pod tri različita ugla. Tako snimljene slike nose informacije visokih frekvencija koje nakon rekonstrukcije otkrivaju detalje ćelijskih struktura. Matematička rekonstrukcija se zasniva na brzim Furijeovim transformacijama slika snimljenim iz različitih uglova, ekstrakcijom informacija visoke frekvencije, dok se reverznom Furijeovom transformacijom konstruiše slika visoke rezolucije (Slika 14). Za razliku od konfokalnog mikroskopa, SIM prikuplja svu svjetlost koja fluorescira sa uzorka, ne samo onu koja prolazi kroz konfokalni otvor, i na taj način poboljšava kvalitet slike i detalja (Gustafsson, 2000). U ovoj studiji, za snimanje perineuronskih mreža, korišten je SIM mikroskop (Delta Vision OMX V4, SAD), opremljen sa diodnim laserom od 405 nm, i semikonduktorskim laserom (OPSL) od 488 nm talasne dužine. Koristeći uljani objektiv uveličanja 60X (Plan ApoN, NA =1.42) i *Z-stack* opciju, snimljeno je 50-55 optičkih presjeka debljine 125 nm, koji su rekonstruisani u trodimenzionalni snimak. Postignuta prostorna rezolucija je iznosila 150 nm u lateralnoj i 300 nm u aksijalnoj osi.

Da bi se ispitala ultrastruktura PNM u dorzalnom hipokampusu TnC<sup>+/+</sup> i TnC<sup>-/-</sup> miševa, iz svakog podregiona hipokampusa su snimljene PNM pod istim uslovima za svaku eksperimentalnu grupu. Iz mozga svake životinje je usnimljeno 5-6 snimaka DG regiona, 9 snimaka CA1, 5-6 snimaka CA2 i 3-4 snimka CA3 regiona hipokampusa, koji su upotrebljeni za analizu ultrastrukture PNM.



**Slika 14. Princip i primjer strukturane iluminacije.** SIM koristi rotirajuću difrakcionu rešetku za osvetljavanje uzorka iz tri različita ugla, pri čemu se za svaku orijentaciju rešetke uzima pet slika sa različitim fazama pomaka rešetke, što ukupno daje 15 slika za jednu Z-poziciju uzorka. Sve slike se transformišu u Fourierov prostor, gde se informacije visoke frekvencije iz svih uglova kombinuju, a povratna Fourierova transformacija (rFT) koristi kombinovane informacije visoke frekvencije da rekonstruiše super-rezolucionu sliku. Desno je prikazana strukturana iluminacija perineuronske mreže (PNM) i njena rekonstrukcija. Modifikovano iz: [https://www.eurobioimaging.eu/service/Structured-illumination-microscopy-SIM\\*](https://www.eurobioimaging.eu/service/Structured-illumination-microscopy-SIM*)

## 3.9. Analiza slika

### 3.9.1. Analiza ekspresije PNM i sinaptičkih terminala

Slike koje su usnimljene konfokalnim mikroskopom su analizirane koristeći Fiji ImageJ (Schindelin et al., 2012), softver za analizu slika otvorenog pristupa. Sa svake slike je analiziran broj i intezitet signala PNM, koje obuhvataju populaciju PNM koje okružuju PV+ neurone (PNM+PV+ ćelije) i PNM koje okružuju druge tipove neurona (PNN+PV- ćelije), kao i broj PV+ interneurona. Prije analize signala WFA, markera PNM, pozadinski signal sa slike je uklonjen koristeći *rolling ball radius* opciju u ImageJ. Svaka PNM sa slike je prebrojana i ocrтана u region od interesa (ROI) u kojem je izmjerena srednja vrijednost inteziteta piksela WFA signala, koji se kreće u rasponu od 0-255. Intezitet fluorescentnog signala na konfokalnim slikama se tumači kao aproksimacija ekspresije proteina od interesa, gdje je jači intezitet fluorescentnog signala proporcionalan većoj količini proteina. Prosječna vrijednost broja i inteziteta signala PNM u svakom podregionu hipokampusa miša i pacova je korištena za statističku analizu. Gustina PNM i PV+ interneurona je izmjerena u prefrontalnoj kori i hipokampusu pacova tako što su sa svake slike izbrojane PNM i PV+ neuroni i taj broj je podjeljen sa površinom slike i izražen kao broj po kvadratnom milimetru (broj/mm<sup>2</sup>).

Analiza sinaptičkih terminala je urađena koristeći funkciju *Analyze particles* u ImageJ programu. Nakon uklanjanja pozadinskog signala, oko PNM je ocrтан ROI, u kojem su kvantifikovani broj, veličina (površina fluorescentnog signala) i intezitet VGAT i VGlut1 pozitivnih sinaptičkih terminala koji prolaze kroz PNM. Broj inhibitornih i ekscitatornih sinaptičkih terminala u ROI je ručno izbrojan, a prosječna gustina je izračunata djeljenjem broja sa površinom ROI, koristeći *Analyze particles* opciju u kojoj je zadata veličina analiziranih terminala. Prosječna veličina sinaptičkih terminala je izračunata koristeći isti alat, tako što je izmjerena veličina svih terminala u ROI i podjeljena sa ukupnim brojem. Veličina sinaptičkih terminala je izražena u  $\mu\text{m}^2$ , a gustina kao broj sinaptičkih terminala po kvadratnom mikrometru (broj/ $\mu\text{m}^2$ ). Posljednji izmjereni parametar je prosječan intezitet piksela sinaptičkih terminala u ROI, koji je takođe izračunat koristeći funkciju *Mean Gray Value* u alatu *Analyze particles*. Mjerenje veličine i gustine sinaptičkih terminala omogućava dublji uvid u morfologiju presinaptičkih završetaka, dok mjerenje inteziteta signala ukazuje na veću koncentraciju eksprimiranog proteina.

### 3.9.2. Analiza zapremine mozga

Volumetrijska analiza prefrontalne kore i hipokampusa pacova je urađena koristeći ImageJ softver, tako što je svaki podregion prefrontalne kore (Cg1, PrL i IL) i hipokampusa (DG, CA1 i CA3) ocrтан u region od interesa i izračunata njegova površina opcijom *Area* u programu za analizu slika. Računanje zapremine mozga je postignuto stereološkom metodom Kavalijerijevog principa. Prema Kavalijeriju, zapremina trodimenzionalnog objekta, kakav je mozak, se može odrediti sumiranjem površina njegovih dvodimenzionalnih presjeka, pod uslovom da su oni

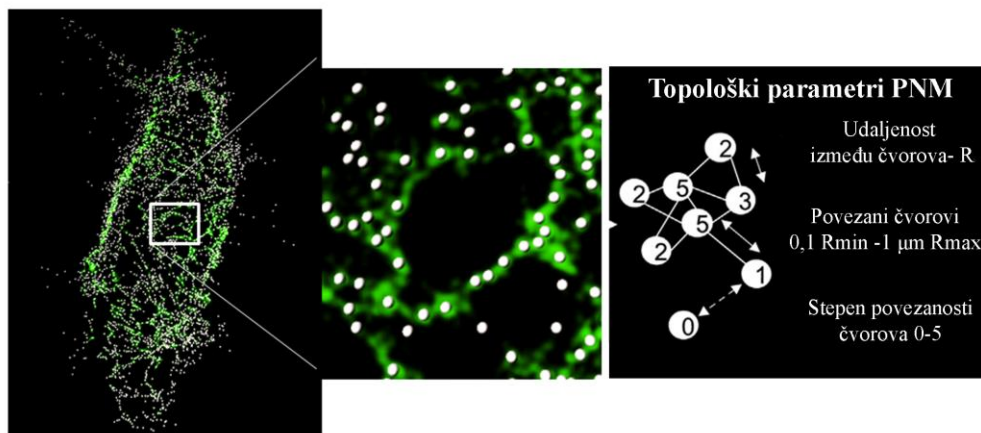
paralelni i jednako udaljeni jedan od drugog (Prakash et al., 1994). Budući da su presjeci mozga pacova jednako udaljeni jedan od drugog, bilo je moguće precizno izmjeriti volumen podregiona prefrontalne kore i hipokampusa i izraziti ga u  $\text{mm}^3$ .

### 3.9.3. Analiza ultrastrukture PNM

Super-rezolucione slike PNM koje su dobijene snimanjem tehnikom SIM mikroskopije, su analizirane u programu IMARIS (9.3. Oxford Instruments, UK). Obrada slike je podrazumjevala uklanjanje pozadine i generisanje tačaka koje se preklapaju sa fluorescentnim signalom WFA. Tačke veličine 150 nm u lateralnom i 300 nm u aksijalnom smjeru su generisane upotrebom opcije *Spots* i njihove koordinate u 3D prostoru su izvedene iz programa IMARIS. Uzevši u obzir da su generisane tačke čvorovi perineuronske mreže koji opisuju njenu ultrastrukturu, za analizu je korišten poseban program za analizu topografije PNM, koji su napravili Dzyubenko i saradnici (Dzyubenko et al., 2018). Za pokretanje programa je korišten MatLab softver (2019a, SAD), koji koristi koordinate čvorova PNM kako bi izračunao sljedeće topološke parametre:

1. Ukupan broj čvorova u PNM.
2. Procenat povezanih čvorova u PNM.
3. Prosječnu udaljenost između čvorova.
4. Prosječan stepen povezanosti čvorova.
5. Maksimalnu udaljenost između čvorova (R95).

Da bi parametri bili izračunati, podešena je minimalna ( $R_{\min} = 0,1 \mu\text{m}$ ) i maksimalna udaljenost ( $R_{\max} = 1 \mu\text{m}$ ) između čvorova. Ukoliko je udaljenost između čvorova manja od maksimalne, smatraju se povezanim i računa se procenat povezanih čvorova od njihovog ukupnog broja. Takođe, računat je prosječan stepen povezanosti čvorova u jednoj PNM, tako što se sabira broj susjeda koji jedan čvor ostvaruje, npr. ukoliko je čvor povezan do maksimalne udaljenosti sa još 3 čvora, stepen povezanosti tog čvora iznosi 3. Maksimalna udaljenost (parametar R95) je mjera koja pokazuje koliko čvorova, od 95% povezanih, je udaljeno od  $0,7 - 1 \mu\text{m}$ . Navedeni topološki parametri su analizirani kako bi se kvantifikovala ultrastruktura PNM kao mjera njene kondenzovanosti i povezanosti (Slika 15). Analizirana i kvantifikovana je ultrastruktura 96 PNM iz svih podregiona hipokampusa (DG, CA1-3)  $\text{TnC}^{+/+}$  i  $\text{TnC}^{-/-}$  miševa koji su odgajani u OS i SS.



**Slika 15. Postupak analize ulstrastrukture PNM.** U programu IMARIS su generisane tačke koje predstavljaju čvorove PNM i njihova povezanost je izačunata koristeći program u MatLab-u koji je analizirao topološke parametre PNM. Modifikovano iz Dzyubenko et al., 2018.

### 3.10. Statistička analiza

Za statističku analizu podataka dobijenih iz TnC modela je korišten JASP softver (JASP Team, 0.12). Testiranje normalnosti raspodjele podataka je urađeno Kolmogorov-Smirnovim testom, dok je homogenost varijanse ispitivana Levensovim testom. Podaci koji su imali normalnu raspodjelu su analizirani dvo-faktorskom analizom varijanse (eng. *two-way ANOVA*) sa *Tukey post-hoc* testom, gdje su genotip i sredina označeni kao dva nezavisna faktora. Podaci koji nisu imali normalnu raspodjelu su analizirani ne-parametrijskim *Kruskal-Wallis H* testom sa *Dunn post-hoc* korekcijom. Podaci koji su imali vrijednost  $p < 0.05$  su smatrani statističkim značajnim. Za grafičko prikazivanje rezultata je korišten softver R (Rstudio, 4.3.3., SAD) i podaci iz svakog eksperimenta su prikazani kao „*box-whisker*“.

Statistička analiza podataka koji su dobijeni iz modela MD su analizirani koristeći SPSS softver (Release 22, SPSS, SAD). Normalnost raspodjele podataka je testirana sa Kolmogorov-Smirnovim i Shapiro-Wilk testom, a homogenost varijanse koristeći Levensov test. Podaci koji su imali normalnu raspodjelu su analizirani koristeći *GLM* (eng. *Generalized Linear Model*) i *GEE* (eng. *Generalized Estimating Equation*), sa tretmanom MD kao prediktorskim faktorom i leglom kao ugnježdenim prediktorskim faktorom. Ovi statistički testovi su izabrani jer uzimaju u obzir specifične efekte legla. Podaci koji nisu imali normalnu raspodjelu su analizirani *Mann-Whitney* testom. Podaci koji su imali vrijednost  $p \leq 0,001$  ( $p = 0.05/54$ , za ukupan broj poređenja) su smatrani statistički značajnim. Korigovan nivo statističke značajnosti je korišten radi smanjenja mogućnosti greške prvog tipa. Za grafičko prikazivanje rezultata je korišten softver R (Rstudio, 4.3.3., SAD) i podaci iz svakog eksperimenta su prikazani kao „*box-whisker*“.

Na svakoj slici i u opisima slika je prikazan korišten statistički test, nivo značajnosti i veličina uzorka.

## 4. Rezultati

Prvi dio rezultata ove doktorske disertacije prikazuje ulogu TnC i obogaćene sredine u strukturnoj plastičnosti PNM, PV+ interneurona, ekscitatornih i inhibitornih sinapsi dorzalnog hipokampusa miša. Drugi dio rezultata je fokusiran na uticaj materinske deprivacije (MD) na PNM, PV+ interneurone i inhibitorne sinapse u prefrontalnoj kori i hipokampusu pacova. Ispitali smo broj i intezitet PNM koje obavijaju PV+ interneurone (PNM+PV+), PNM koje ne obavijaju PV+ interneurone (PNM+PV-), kao i broj PV+ interneurona koji ne eksprimiraju PNM (PV+PNM-). Značajne razlike između grupa u TnC modelu su pronađene samo kod PNM+PV-, dok su u MD modelu bile pogođene samo PNM+PV+.

### 4.1. Uloga TnC i obogaćene sredine u ekspresiji PNM u hipokampusu miša

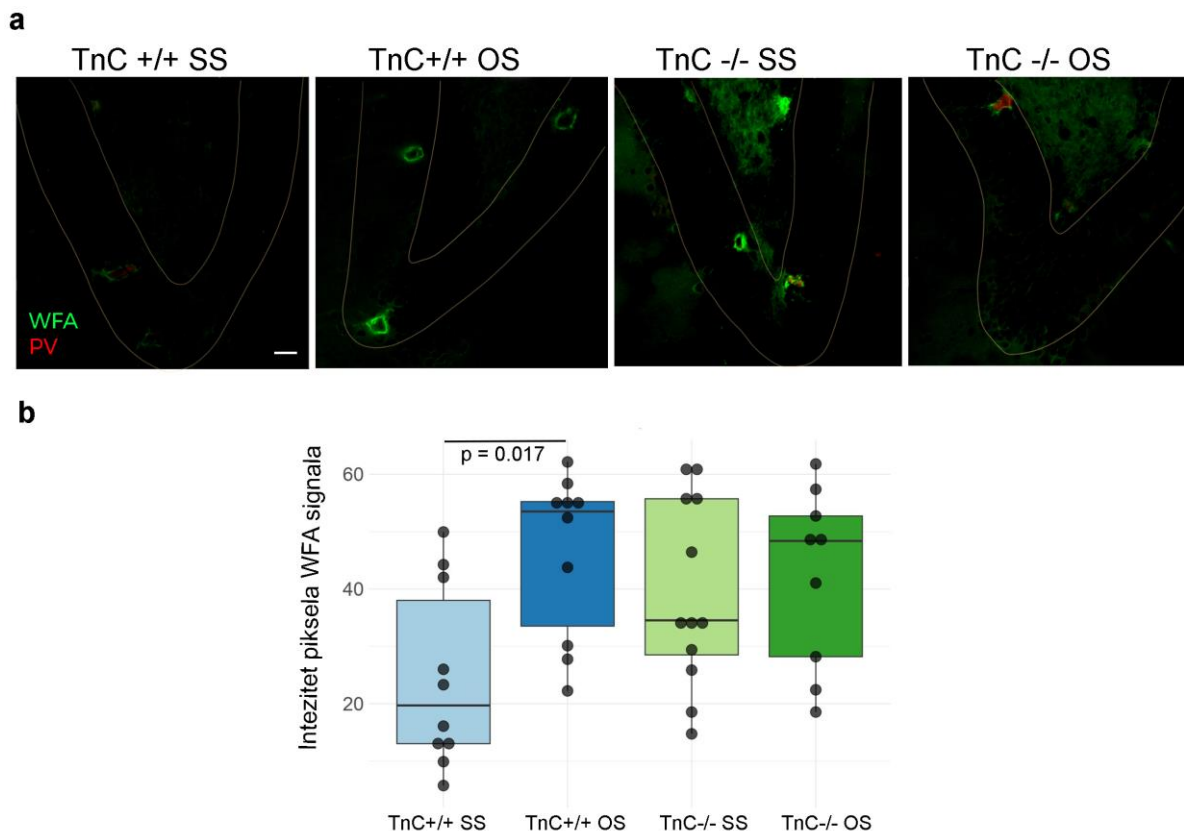
Kako bi povećali neuronsku plastičnost, miševi divljeg soja (TnC<sup>+/+</sup>) i TnC- deficijentni miševi (TnC<sup>-/-</sup>) su gajeni u obogaćenoj sredini 8 sedmica i standardnoj sredini kao kontroli. Nakon snimanja svih podregiona dorzalnog hipokampusa konfokalnom mikroskopijom, urađena je kvantifikacija srednje vrijednosti piksela WFA signala. U tabeli 7 su prikazani rezultati za svaki od hipokampalnih podregiona.

**Tabela 7.** Rezultati dvofaktorske analize varijanse (ANOVA sa Tukey *post hoc* testom) za parametre ekspresije PNM i PV neurona u svim regionima hipokampusa. Navedene su vrijednosti samo statistički značajnih razlika između eksperimentalnih grupa i porijeklo efekta razlika (genotip, sredina ili njihova interakcija).

	<i>DG</i>	<i>CA1</i>	<i>CA2</i>	<i>CA3</i>
<i>Intezitet PNM</i>	-	-	-	-
<i>Broj PNM</i>	-	-	Genotip: $F_{1,45} = 8,694, p = 0,005$ TnC <sup>+/+</sup> SS vs. TnC <sup>-/-</sup> SS $p = 0,002$	
<i>Intezitet PNM+PV+</i>	-	-	-	-
<i>Broj PNM+PV+</i>	-	-	-	-
<i>Intezitet PNM+PV-</i>	Sredina: $F_{1,40} = 6,408, p = 0,016$ TnC <sup>+/+</sup> OS vs. TnC <sup>+/+</sup> SS $p = 0,017$	-	-	-
<i>Broj PNM PV-</i>	-	-	Genotip: $F_{1,45} = 9,612, p = 0,003$ TnC <sup>+/+</sup> SS vs. TnC <sup>-/-</sup> SS $p < 0,001$ Interakcija: $F_{1,45} = 11,356, p = 0,002$ TnC <sup>-/-</sup> OS vs. TnC <sup>-/-</sup> SS $p = 0,023$	
<i>Broj PV+ neurona</i>	-	-	-	-



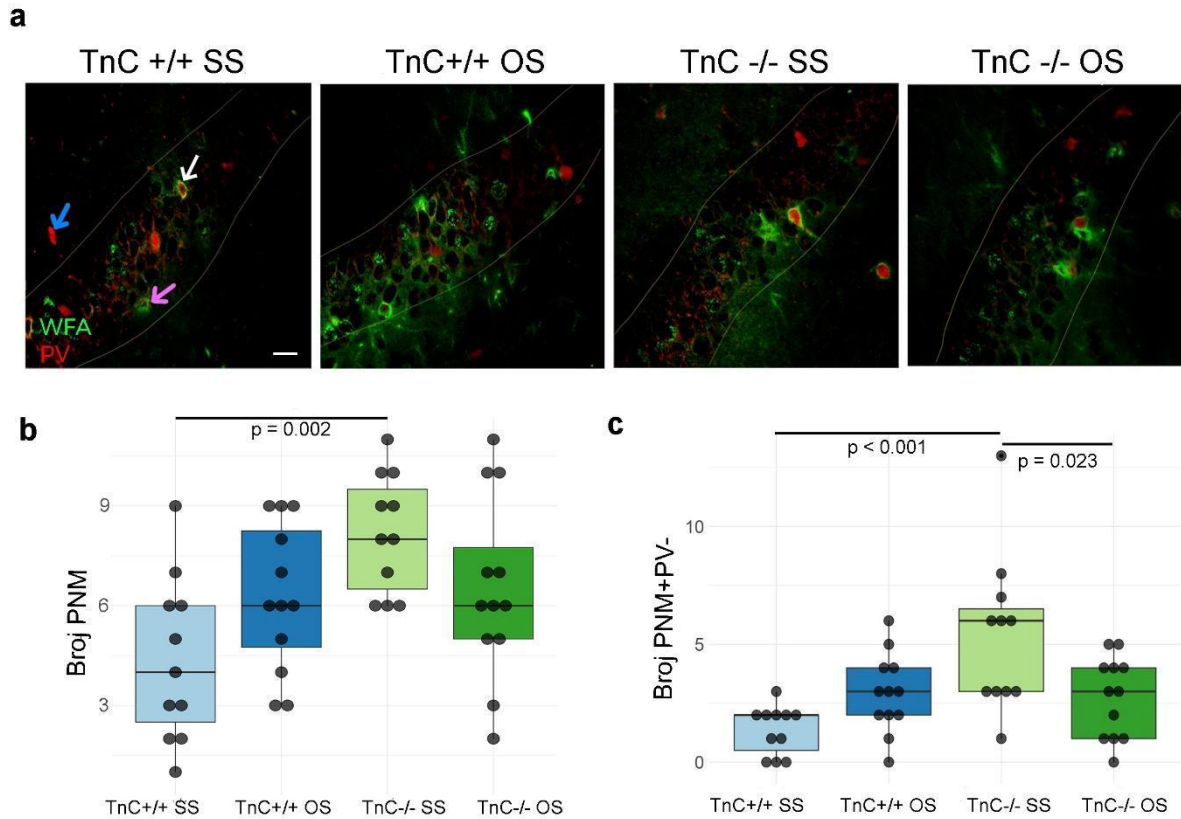
Za region DG je pokazano da TnC<sup>+/+</sup> miševi, koji su odgajani u OS imaju značajno jači intezitet WFA signala u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> miševima koji su rasli u SS (Slika 16). Ovakav rezultat ističe da povećanje neuronske plastičnosti, u vidu izlaganja OS, može kod miševa divljeg soja dovesti do povećane sinteze komponenata PNM u DG, ili do smanjene aktivnosti enzima koji ove komponente razgrađuju. Kod ostalih podregiona hipokampusa nisu uočene promjene u ekspresiji PNM nakon OS kod TnC<sup>+/+</sup> miša.



**Slika 16. Ekspresija PNM i PV+ interneurona u DG hipokampusa TnC<sup>+/+</sup> i TnC<sup>-/-</sup> miševa nakon izlaganja životinja SS i OS. a)** Konfokalne slike pokazuju dvostruko fluorescentno obilježene PNM (WFA marker, zeleno) i PV+ interneurone (crveno). Granularni sloj DG je oivičen (slobodnom rukom) svijetlo žutom linijom. Kalibracija: 50  $\mu$ m. **b)** Box plot grafikon prikazuje srednji intezitet piksela WFA signala, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartalnog opsega uvećane za 1,5. Dvo-faktorska analiza varijanse ANOVA i Tukey *post hoc* test je otkrio značajno povećanje vrijednosti inteziteta WFA signala kod TnC<sup>+/+</sup> OS grupe, u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> SS grupom:  $p = 0,017$ .

U CA podregionima, podjeljenim na CA1, CA2 i CA3, promjene u ekspresiji PNM su zabilježene samo u CA2 regionu, gdje je dvofaktorskom ANOVA analizom pokazano da na ukupan broj PNM i PNM+PV- utiče genotip i interakcija genotipa i sredine (Tabela 7). Ukupan broj PNM i PNM+PV- je značajno povišen kod TnC deficijentnih miševa koji su odgajani u standardnim uslovima (TnC<sup>-/-</sup> SS) u poređenju sa miševima divljeg soja gajenim u istoj sredini (TnC<sup>+/+</sup> SS) (Slika 17a,b). Ovakav rezultat ukazuje da tenascin-C igra važnu ulogu u očuvanju

broja PNM u CA2 regionu, kao i to da njegova uloga nije vezana za PNM koje eksprimiraju parvalbuminski interneuroni. Daljom analizom broja PNM+PV- otkriven je značajan efekat interakcije genotipa i okoline. Gajenje  $TnC^{-/-}$  miševa u OS je dovelo do značajnog smanjenja broja PNM+PV- u poređenju sa  $TnC^{-/-}$  SS grupom (Slika 17a,c). Ovaj rezultat ukazuje na mogućnost da se, u  $TnC$  deficijenciji, povećanjem neuronske plastičnosti putem OS aktiviraju kompezatorni mehanizmi za očuvanje broja PNM u CA2 regionu.



**Slika 17. Ekspresija PNM i PV+ interneurona u CA2 hipokampusu  $TnC^{+/+}$  i  $TnC^{-/-}$  miševa nakon izlaganja životinja SS i OS. a)** Konfokalne slike pokazuju dvostruko fluorescentno obilježene PNM (zeleno) i PV+ interneurone (crveno). Piramidalni sloj ćelija je oivičen svijetlo žutom linijom. Bijela strelica pokazuje PNM+PV+ ćelije, roze strelica PNM+PV-, a plava PV+PNM- neurone. Kalibracija: 50  $\mu$ m. **b)** *Box plot* grafikon prikazuje ukupan broj PNM, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartilnog opsega uvećane za 1,5. Dvofaktorska analiza varijanse ANOVA i Tukey *post hoc* testom je otkriveno značajno ( $p = 0,002$ ) povećanje ukupnog broja PNM kod  $TnC^{-/-}$  SS grupe, u poređenju sa  $TnC^{+/+}$  SS grupom. **c)** *Box plot* grafikon prikazuje broj PNM+PV- ćelija, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartilnog opsega uvećane za 1,5. Značajno povećanje ( $p < 0,001$ ) broja PNM+PV- je pronađeno kod  $TnC^{-/-}$  SS miševa u poređenju sa  $TnC^{+/+}$  SS grupom, dok je značajno smanjenje broja ( $p = 0,023$ ) zabilježeno kod  $TnC^{-/-}$  u OS, poređeno sa  $TnC^{-/-}$  miševima u SS.



U CA1 i CA3 regionu nisu pronađene značajne promjene u broju i ekspresiji PNM i PV+ neurona, usljed nedostatka TnC molekula i izlaganja obogaćenoj sredini. Izostanak promjena ukazuje da je uticaj TnC na ekspresiju PNM zavisao od ispitivanog regiona.

## 4.2. Uloga TnC i obogaćene sredine u strukturnoj sinaptičkoj plastičnosti hipokampusa miša

Da bi se ispitala uloga PNM u regulaciji sinaptičke plastičnosti, analizirani su morfološki parametri presinaptičkih terminala koji se projektuju na neurone koji su obuhvaćeni sa PNM, tako što penetriraju kroz njene otvore. Ispitani parametri kod TnC<sup>+/+</sup> i TnC<sup>-/-</sup> miševa nakon izlaganja OS i SS 8 sedmica su gustina, broj i intezitet piksela za VGlut1 i VGAT presinaptičke markere ekscitatornih i inhibitornih završetaka. Promjene u navedenim parametrima primjećene su u svim regionima hipokampusa osim u CA1 (Tabela 8).

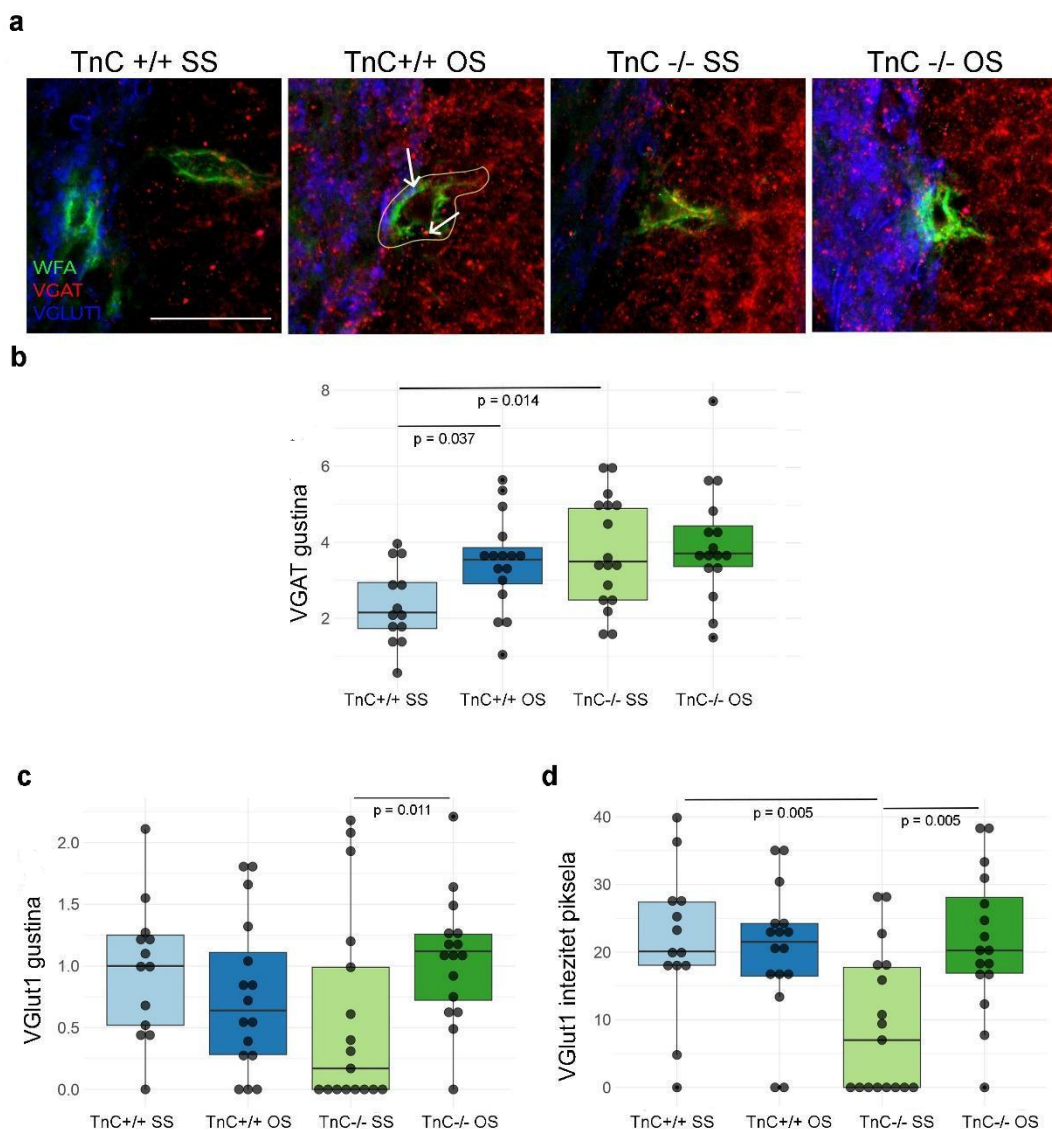
**Tabela 8.** Statistički značajni rezultati *Kruskal-Wallis* testa sa *Dunn post-hoc* analizom za parametre sinaptičkih markera u hipokampusu.

	<i>DG</i>	<i>CA1</i>	<i>CA2</i>	<i>CA3</i>
<i>Gustina VGAT terminala</i>	H <sub>3</sub> = 9,436, <i>p</i> = 0,024 TnC <sup>+/+</sup> SE vs. TnC <sup>-/-</sup> SE <i>p</i> = 0,014 TnC <sup>+/+</sup> SE vs. TnC <sup>+/+</sup> EE <i>p</i> = 0,037	-	H <sub>3</sub> = 9,597, <i>p</i> = 0,022 TnC <sup>+/+</sup> SE vs. TnC <sup>+/+</sup> EE <i>p</i> = 0,004 TnC <sup>+/+</sup> EE vs. TnC <sup>-/-</sup> EE <i>p</i> = 0,017	H <sub>3</sub> = 8,012, <i>p</i> = 0,046 TnC <sup>+/+</sup> SE vs. TnC <sup>+/+</sup> EE <i>p</i> = 0,016 TnC <sup>+/+</sup> EE vs. TnC <sup>-/-</sup> EE <i>p</i> = 0,016
<i>Veličina VGAT terminala</i>	-	-	-	-
<i>Intezitet piksela VGAT terminala</i>	-	-	H <sub>3</sub> = 10,605, <i>p</i> = 0,014 TnC <sup>+/+</sup> SE vs. TnC <sup>-/-</sup> SE <i>p</i> = 0,015 TnC <sup>+/+</sup> EE vs. TnC <sup>-/-</sup> EE <i>p</i> = 0,044	-
<i>Gustina VGlut1 terminala</i>	H <sub>3</sub> = 7,569, <i>p</i> = 0,056 TnC <sup>-/-</sup> SE vs. TnC <sup>-/-</sup> EE <i>p</i> = 0,011	-	-	-
<i>Veličina VGlut1 terminala</i>	-	-	-	-
<i>Intezitet piksela VGlut1 terminala</i>	H <sub>3</sub> = 11,646, <i>p</i> = 0,009 TnC <sup>-/-</sup> SE vs. TnC <sup>-/-</sup> EE <i>p</i> = 0,005 TnC <sup>+/+</sup> SE vs. TnC <sup>-/-</sup> SE <i>p</i> = 0,005	-	-	-

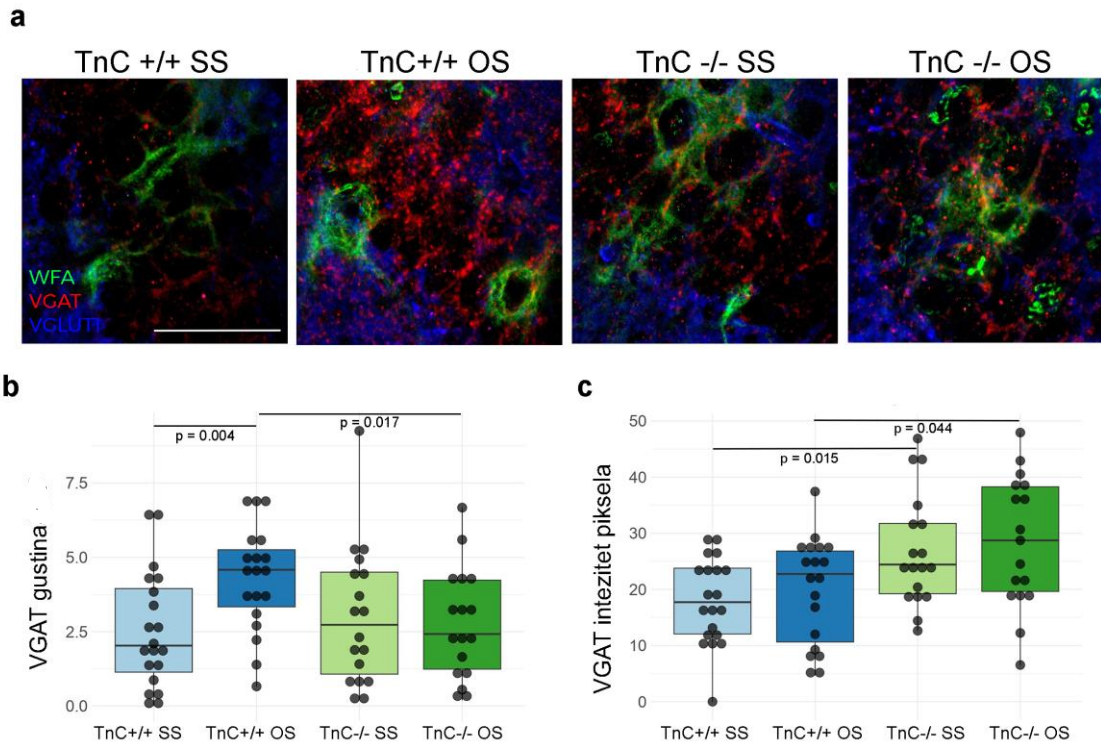
Opsežno remodelovanje ekscitatornih i inhibitornih sinaptičkih završetaka je pronađeno u DG kod TnC deficijentnog miša, gdje su rezultati pokazali značajno povećanje gustine VGAT markera i smanjenje inteziteta piksela VGlut1 markera kod TnC<sup>-/-</sup> u SS, u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> SS grupom (Slika 18a,b,d). Ovi rezultati otkrivaju važnu ulogu molekula TnC u strukturnoj sinaptičkoj plastičnosti DG, koja se ogleda u održavanju ravnoteže ekspresije ekscitatornih i inhibitornih sinaptičkih završetaka. Izlaganje OS je uticalo na ekspresiju inhibitornih završetaka u DG miša divljeg soja (TnC<sup>+/+</sup> OS), koji je imao značajno veću gustinu VGAT terminala u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> u standardnoj sredini. Kada su TnC<sup>-/-</sup> miševi gajeni u OS, gustina i intezitet piksela VGlut1 terminala je značajno povišena u odnosu na miševe istog genotipa u SS i nivoi ekspresije su se povratili na nivo približan kontrolnoj grupi (Slika 18a,c,d). Ovakav efekat naglašava mogući reparacijski uticaj OS na ekspresiju sinaptičkih markera u uslovima kada izostaje ekspresija molekula TnC.

U regionima CA2 i CA3 su promjene u sinaptičkoj ekspresiji obuhvatile samo inhibitorne presinaptičke završetke. Ustanovljeno je da kod TnC<sup>-/-</sup> miša u standardnoj sredini dolazi do značajnog povećanja inteziteta piksela VGAT završetaka, u poređenju sa kontrolnom TnC<sup>+/+</sup> SS grupom (Slika 19a,c). Obogaćena sredina je u CA2 i CA3 regionu kod TnC<sup>+/+</sup> miševa dovela do povećane gustine VGAT završetaka, dok je kod TnC<sup>-/-</sup> taj efekat neutralizovan, jer dolazi do značajnog smanjenja gustine inhibitornih terminala (Slika 19a,b, Slika 20a,b). Dodatno se kod TnC<sup>-/-</sup> OS grupe u CA2 regionu primjećuje značajno povišen intezitet VGAT završetaka u odnosu na TnC<sup>+/+</sup> OS grupu (Slika 19a,c). Ova analiza demonstrira da TnC ima ulogu u očuvanju inhibitorne sinaptičke plastičnosti u CA2 i CA3 regionu sa naglašenim reverzibilnim uticajem OS u slučajevima nedostatka ekspresije TnC.

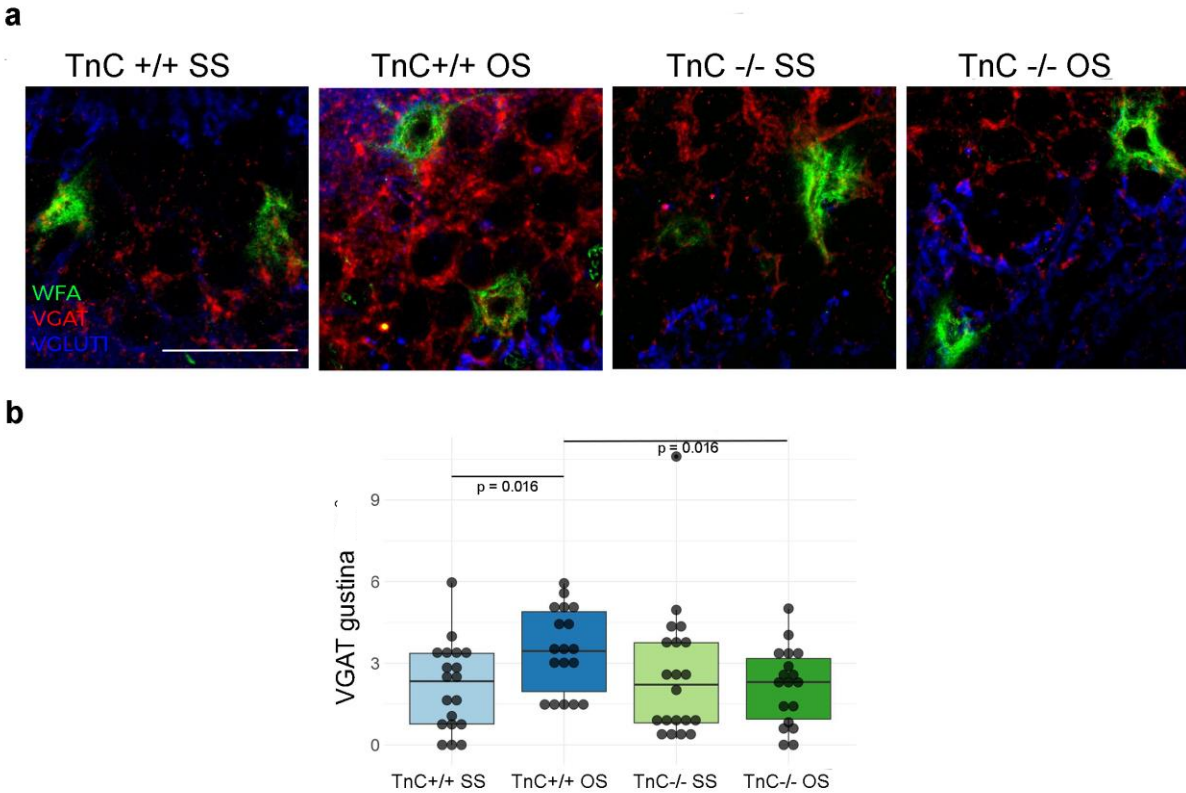
U CA1 regionu nisu registrovane značajne promjene u ekspresiji sinaptičkih markera, kao što ni u jednom od regiona nisu uočene razlike u veličini sinaptičkih završetaka, kao jednog od važnih morfoloških parametara strukturne sinaptičke plastičnosti.



**Slika 18. Ekspresija inhibitornih i ekscitatornih sinaptičkih markera u DG hipokampusa TnC<sup>+/+</sup> i TnC<sup>-/-</sup> miševa nakon izlaganja životinja SS i OS. a)** Konfokalne slike pokazuju trostruko fluorescentno obilježavanje PNM (zeleno), VGAT (crveno) i VGlut1 (plavo). Bijele strelice ukazuju na VGAT i VGlut1 sinaptičke završetke koji su kvantifikovani u regionu od interesa koji ocrta PNM (rukom ucrtana žuta linija). Kalibracija: 50  $\mu\text{m}$ . **b)** *Kruskal-Wallis* sa *Dunn post hoc* testom je otkrio značajno povećanje gustine VGAT terminala u TnC<sup>-/-</sup> SS i TnC<sup>+/+</sup> OS grupi, u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> SS grupom,  $p = 0,037$  odn.  $p = 0,014$ . **c)** Značajno povećanje gustine ( $p = 0,011$ ) VGlut1 terminala je pronađeno kod TnC<sup>-/-</sup> OS miševa u poređenju sa TnC<sup>-/-</sup> SS grupom. **d)** Značajno smanjenje inteziteta piksela ( $p = 0,005$ ) VGlut1 završetaka zabilježeno je kod TnC<sup>-/-</sup> u SS, dok je značajno povećanje istog parametra ( $p = 0,005$ ) pronađeno kod TnC<sup>-/-</sup> OS miševa, u oba slučaja poređeno sa TnC<sup>+/+</sup> u SS. Gustina je izražena kao broj sinaptičkih terminala po kvadratnom mikrometru (broj/ $\mu\text{m}^2$ ). *Box plot* grafikoni prikazuju podatke za sinaptičke parametre, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartilnog opsega uvećane za 1,5.



**Slika 19. Ekspresija inhibitornih i ekscitatornih sinaptičkih markera u CA2 regionu hipokampusa TnC<sup>+/+</sup> i TnC<sup>-/-</sup> miševa nakon izlaganja životinja SS i OS. a)** Konfokalne slike pokazuju trostruko fluorescentno obilježavanje PNM markerom WFA (zeleno), markerom inhibitornih presinaptičkih završetaka VGAT (crveno) i markerom ekscitatornih presinaptičkih završetaka VGLut1 (plavo). Kalibracija: 50  $\mu\text{m}$  **b)** *Kruskal-Wallis* sa *Dunn post hoc* testom je otkrio značajno povećanje gustine ( $p = 0,004$ ) VGAT terminala u TnC<sup>+/+</sup> OS grupi u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> SS grupom, sa značajnim smanjenjem gustine ( $p = 0,017$ ) kod TnC<sup>-/-</sup> OS u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> OS miševima. **c)** Značajno povećanje inteziteta piksela ( $p = 0,015$ ) VGAT terminala je pronađeno kod TnC<sup>-/-</sup> SS miševa u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> SS grupom, kao i kod TnC<sup>-/-</sup> OS miševa ( $p = 0,044$ ), poređeno sa TnC<sup>+/+</sup> OS grupom. Gustina je izražena kao broj sinaptičkih terminala po kvadratnom mikrometru (broj/ $\mu\text{m}^2$ ). *Box plot* grafikoni prikazuju podatke za sinaptičke parametre, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartalnog opsega uvećane za 1,5.

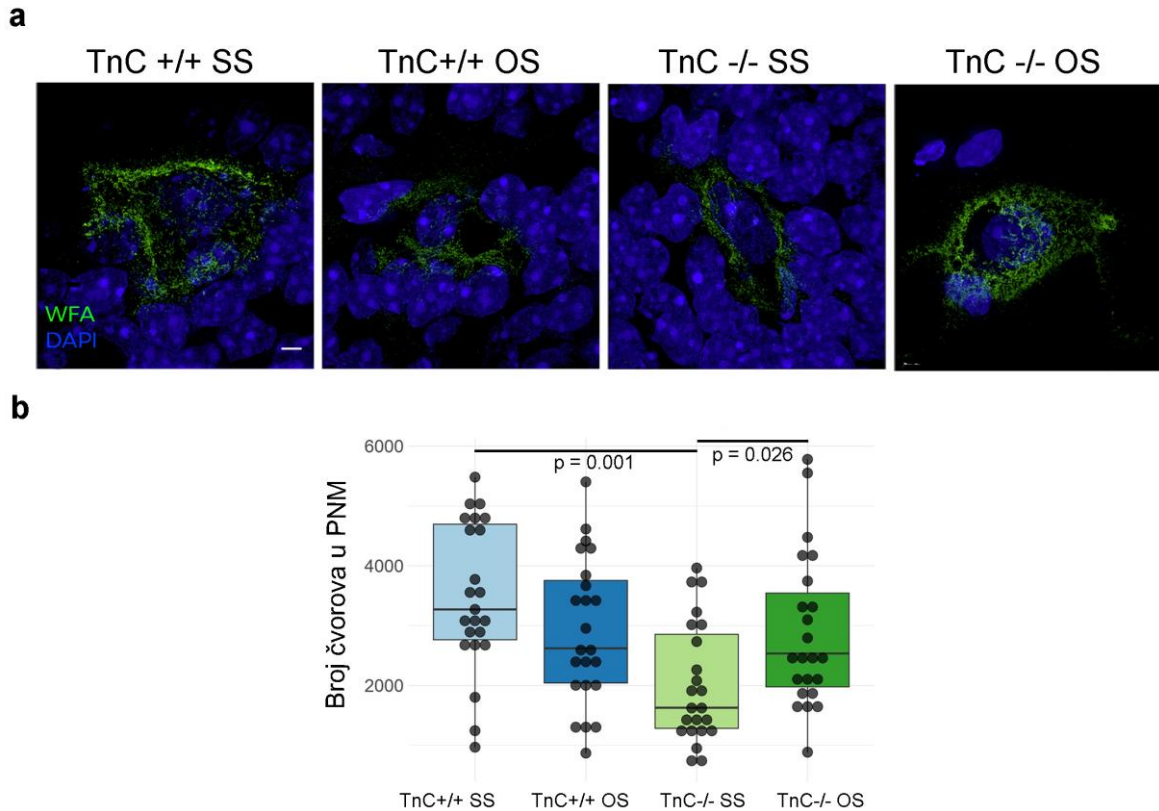


**Slika 20. Ekspresija inhibitornih i ekscitatornih sinaptičkih markera u CA3 regionu hipokampusa TnC<sup>+/+</sup> i TnC<sup>-/-</sup> miševa nakon izlaganja životinja SS i OS. a)** Konfokalne slike pokazuju trostruko fluorescentno obilježavanje PNM markerom WFA (zeleno), markerom inhibitornih presinaptičkih završetaka VGAT (crveno) i markerom ekscitatornih presinaptičkih završetaka VGLut1 (plavo). Kalibracija: 50  $\mu\text{m}$  **b)** *Kruskal-Wallis* sa *Dunn post hoc* testom je otkrio značajno povećanje gustine ( $p = 0,016$ ) VGAT terminala u TnC<sup>+/+</sup> OS grupi u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> SS grupom, i značajnim smanjenjem gustine ( $p = 0,016$ ) kod TnC<sup>-/-</sup> OS u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> OS miševima. Gustina je izražena kao broj sinaptičkih terminala po kvadratnom mikrometru (broj/ $\mu\text{m}^2$ ). **b)** *Box plot* grafikon prikazuje podatke za sinaptičke parametre, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartalnog opsega uvećane za 1,5.

### 4.3. Uloga TnC i obogaćene sredine u formiranju ultrastrukture PNM u hipokampusu miša

Da bi se ispitala detaljnija struktura PNM, nakon gajenja u SS i OS, hipokampusi TnC<sup>+/+</sup> i TnC<sup>-/-</sup> miševa su usnimljeni koristeći super-rezoluciju tehniku strukturirane iluminacije (SIM). Ova tehnika, zajedno sa naprednom analizom slika, je omogućila da se kvantifikuje stanje kondenzovanosti i fine granulacije PNM. Pri tome su korišteni topološki parametri: ukupan broj čvorova, procenat povezanih čvorova, prosječna udaljenost između čvorova, prosječan stepen povezanosti i maksimalna udaljenost između čvorova. Rezultati statističke analize su pokazali da je došlo do promjena samo u ukupnom broju čvorova u PNM dentatnog girusa (*Kruskal-Wallis* test:  $H_3 = 15,761$ ,  $p = 0,001$ , *Dunn post hoc*: TnC<sup>+/+</sup> SE vs. TnC<sup>-/-</sup> SE,  $p = 0,001$ ; TnC<sup>-/-</sup> SE vs. TnC<sup>-/-</sup> EE,  $p = 0,026$ ). Tu je nedostatak TnC u SS doveo do značajnog smanjenja broja čvorova u odnosu na miševе divljeg soja u istoj sredini, dok je gajenje TnC<sup>-/-</sup> miševa u OS dovelo do značajnog povećanja tog broja (Slika 21a,b). Drugi topološki parametri: procenat povezanih čvorova u PNM, njihova prosječna i maksimalna udaljenost, kao i stepen povezanosti čvorova nisu bili značajno promjenjeni usljed nedostatka TnC i izlaganja OS u DG i u ostalim podregionima hipokampusa. Ovakav podatak pokazuje da TnC utiče na ultrastrukturno remodelovanje PNM samo u DG, kroz smanjenje čvorova koji predstavljaju središta WFA signala. Nedostatak TnC ima uticaj na finu granulaciju PNM, dok veći efekat, u vidu pomjena u intezitetu WFA signala ili broju PNM, nije zabilježen u DG TnC<sup>-/-</sup> miša.





**Slika 21. Ultrastruktura PNM u DG TnC<sup>+/+</sup> i TnC<sup>-/-</sup> miševa nakon izlaganja životinja SS i OS. a)** Super-rezolucione SIM slike pokazuju dvostruko fluorescentno obilježavanje PNM (zeleno), i ćelijskog jedra (DAPI; plavo). Kalibracija: 3  $\mu$ m. **b)** *Kruskal-Wallis* i *Dunn post hoc* test je otkrio značajno smanjenje broja čvorova ( $p = 0,001$ ) u PNM kod TnC<sup>-/-</sup> SS grupe u poređenju sa TnC<sup>+/+</sup> SS grupom, koje je povećano ( $p = 0,026$ ) uvođenjem OS kod TnC<sup>-/-</sup> miševa i značajno povišeno u odnosu na TnC<sup>-/-</sup> SS. *Box plot* grafikon prikazuje podatke za broj čvorova u PNM, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartalnog opsega uvećane za 1,5.

#### 4.4. Uticaj MD na ekspresiju PNM i PV neurona u mPFK i hipokampusu pacova

U ovom dijelu doktorske disertacije će biti prikazani rezultati o dugoročnom efektu 24-časovne materinske deprivacije (MD) na strukturnu i sinaptičku plastičnost medijalne prefrontalne kore (mPFK) i hipokampusa pacova. Životinje su bile izložene MD od devetog do desetog postnatalnog dana, dok su efekti ispitani kod odraslih mužjaka starih 2 mjeseca. U prefrontalnoj kori i hipokampusu je ispitana gustina i intezitet ekspresije PNM oko PV+ i PV- interneurona, kao i gustina PV+ interneurona. Zatim je samo u prefrontalnoj kori analizirana ekspresija inhibitornih završetaka koji se projektuju na PV+ interneurone koji imaju PNM. Posljednje je izmjeren volumen mPFK i hipokampusa kod kontrolnih i MD životinja. Kako bismo ispitali specifične promene u podregionima, u mPFK ispitani su rostralna cingulatna kora 1 (roCg1), prelimbička kora (PrL) i infralimbička kora (IL), a u hipokampusu DG, CA3 i CA1 podregioni.

Primjenom *GLM* statističkog teksta koji koristi tretman (MD i kontrolu) kao prediktorski faktor, a leglo kao ugniježđeni prediktorski faktor, analizirana je gustina i intezitet PNM, kao i gustina PV neurona u prefrontalnoj kori i hipokampusu. *GEE* je korišćen za analizu gustine i inteziteta VGAT inhibitornih sinaptičkih završetaka u prefrontalnoj kori, ispitujući efekte MD uzimajući u obzir korelaciju između mjerenja unutar istog legla (Tabela 9).

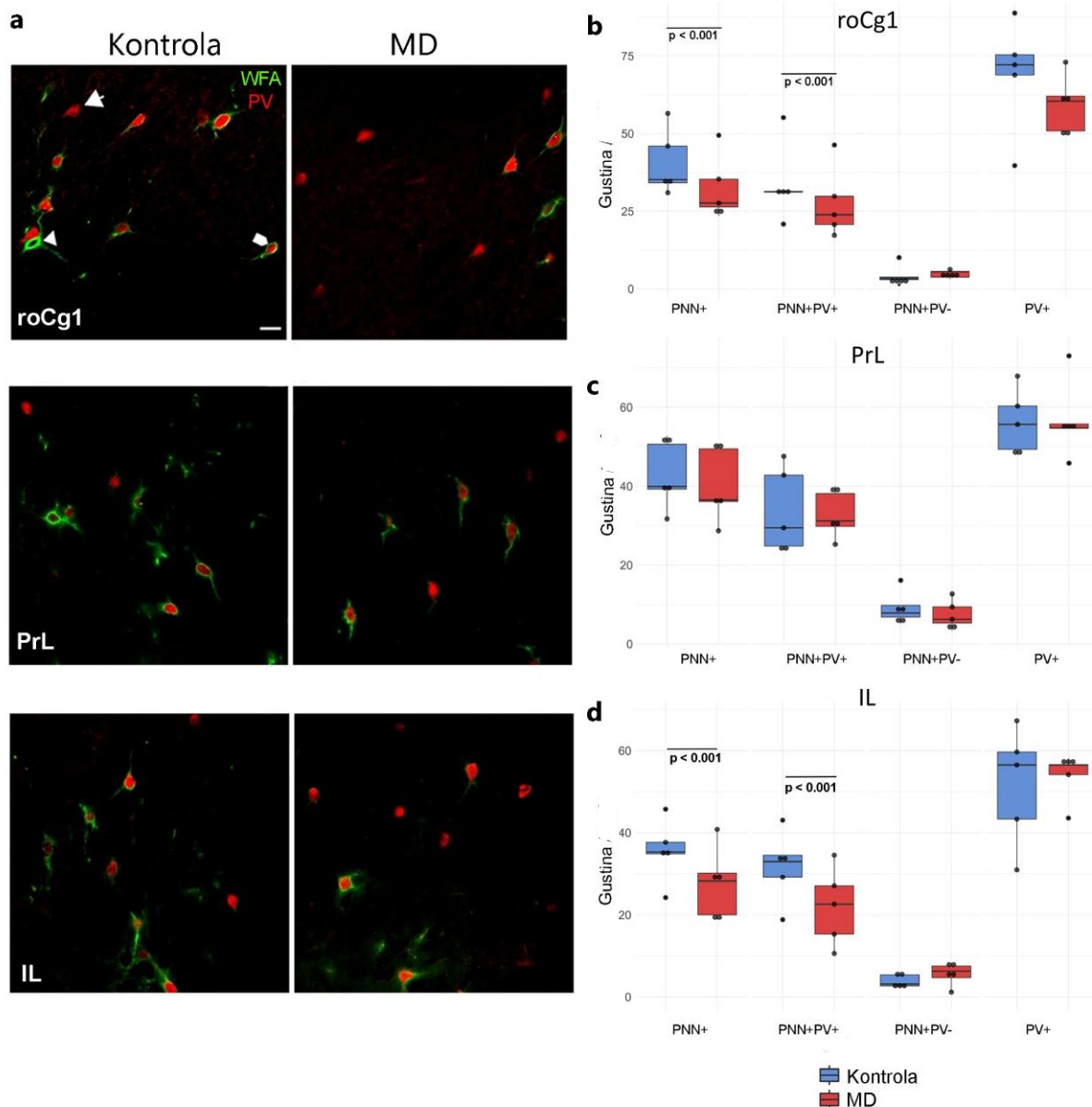
Rezultati pokazuju da je MD dovela do promjena samo u određenim podregionima mPFK. Gustina ukupnih PNM i onih koje obavijaju PV+ interneurone (PNM+PV+) su bili značajno smanjene u roCg1 i IL kod pacova izloženim MD u poređenju sa kontrolnom grupom, dok u PrL nisu zabilježene značajne promjene (Slika 22a-d). Gustina PNM koje obavijaju PV- ćelije, kao i gustina PV+ ćelija nisu bile pogođene u bilo kojem od ispitivanih mPFK podregiona kod MD pacova. Takođe, nisu primjećene promene u gustini PNM u CA1, CA3 i DG podregionima hipokampusa kod MD pacova u poređenju sa kontrolom (Slika 23b-e). Kao i u mPFK, MD nije izazvala promene u gustini PV+ ćelija u hipokampusu (Slika 23b-e). Iz navedenih rezultata se uočava da materinska deprivacija smanjuje gustinu PNM specifično oko interneurona koji eksprimiraju parvalbumin u mPFK, i da ne utiče na PNM u hipokampusu.

Kako je gustina PNM bila smanjena u mPFK, postavili smo pitanje da li je intenzitet bojenja PNM takođe promenjen. Slično promjenama u gustini, MD je uticala na intenzitet PNM u specifičnim podregionima mPFK. Dovala je do značajnog smanjenja inteziteta ukupnih PNM i PNM+PV+ subpopulacije u PrL i IL (Slika 24b,c). Intenzitet bojenja PNM+PV- nije bio promenjen nakon MD u bilo kojem od ispitivanih podregiona mPFK, i promene u ostalim parametrima nisu uočene u roCg1 nakon MD (Slika 24a,b,c). Takođe, intezitet PNM nije promenjen u hipokampusu, potvrđujući da MD ne uzrokuje promjene u PNM i PV neuronima u ovom regionu mozga (Slika 24d,e,f).

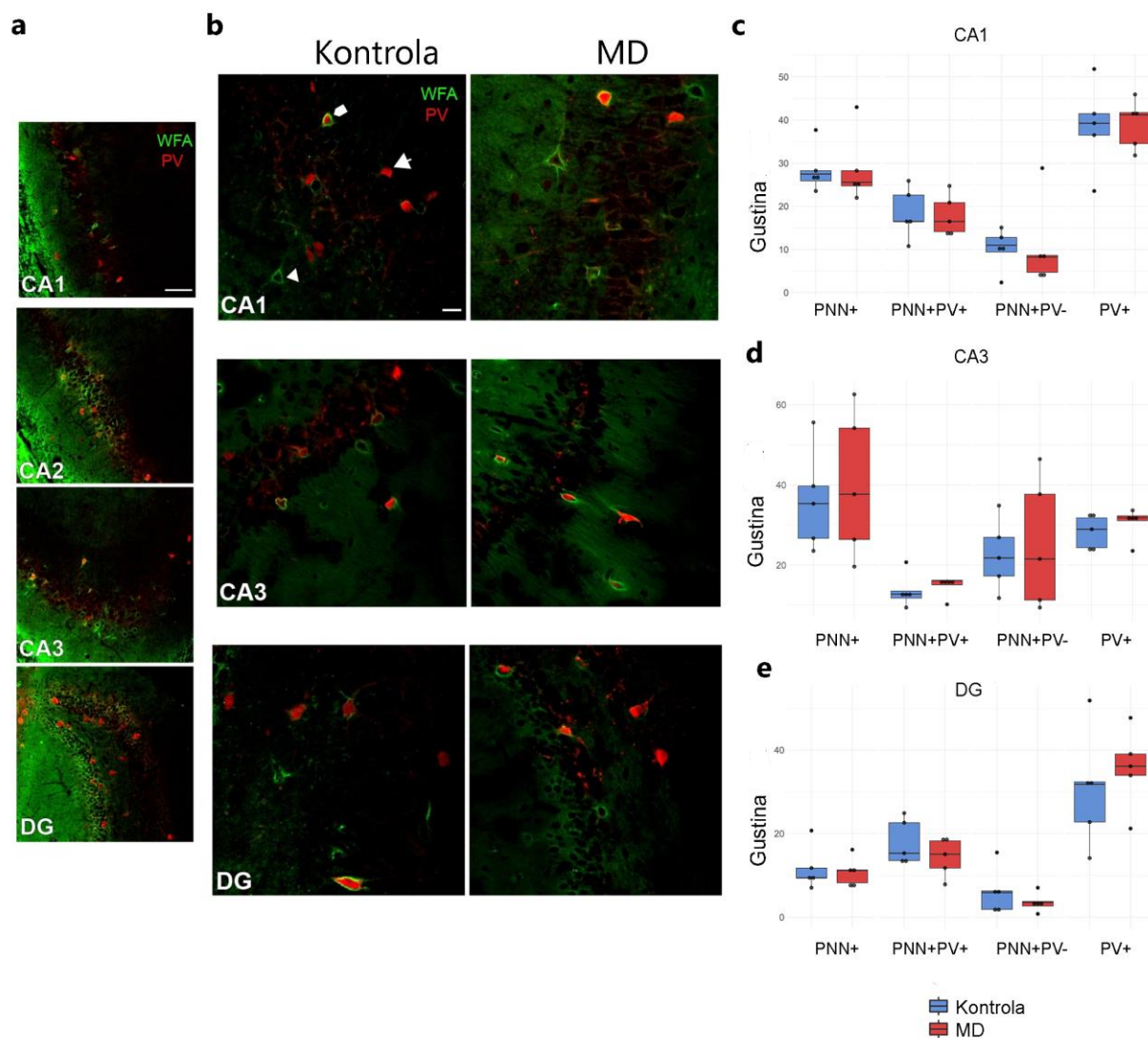


**Tabela 9.** Statistički značajni rezultati *GLM* i *GEE* testa za ekspresiju PNM, PV interneurone, VGAT marker i zapreminu mPFK, podjeljenoj na rostralnu cingulatnu koru 1 (roCg1), prelimbičku koru (PrL) i infralimbičku koru (IL).

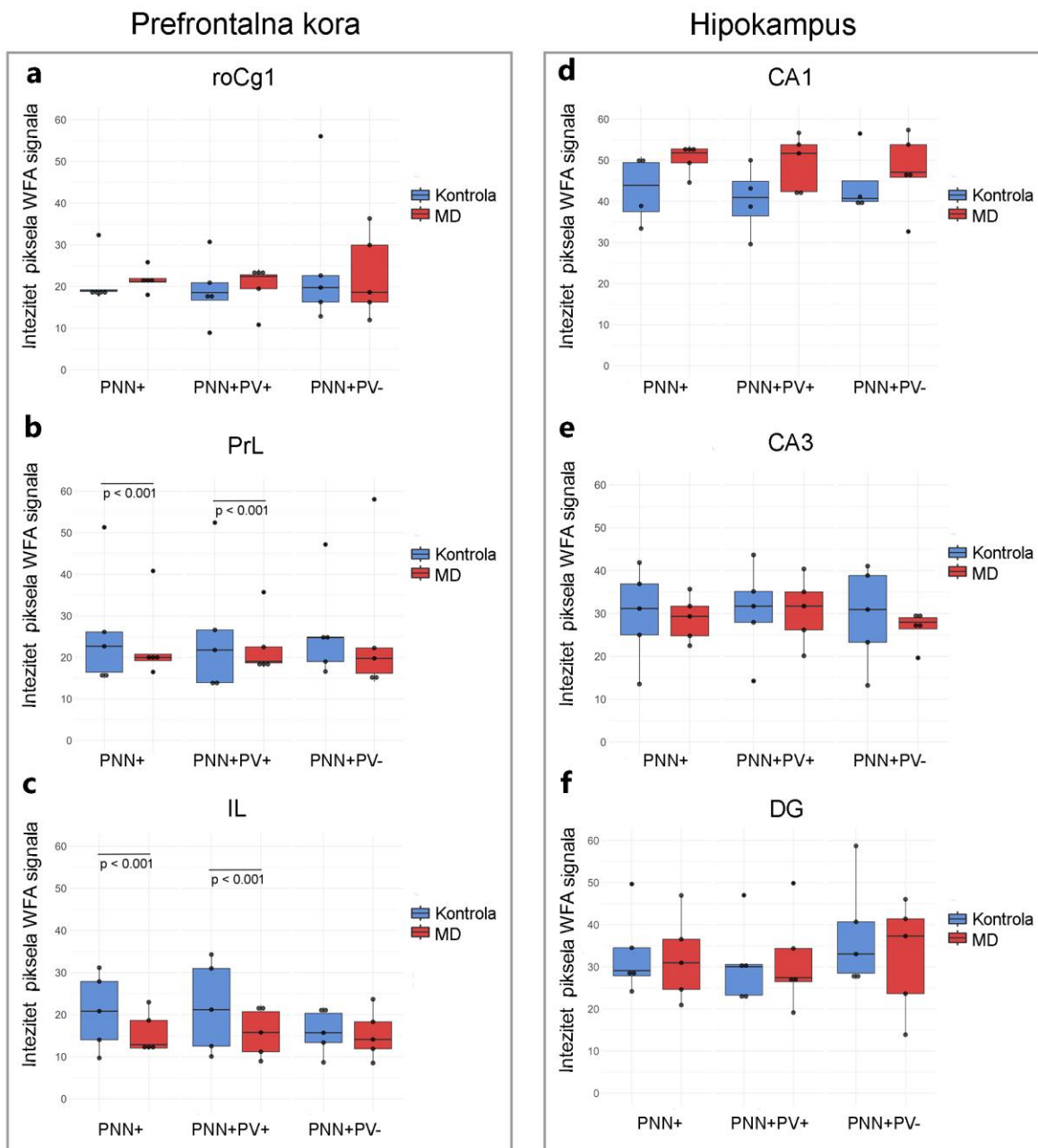
	<i>roCg1</i>	<i>PrL</i>	<i>IL</i>
<i>Ukupna gustina PNM</i>	$W_{1,9} = 18,904$ $p < 0,001$	-	$W_{1,9} = 17,820$ $p < 0,001$
<i>Gustina PNM+PV+</i>	$W_{1,9} = 12,373$ $p < 0,001$	-	$W_{1,9} = 15,965$ $p < 0,001$
<i>Gustina PNM+PV-</i>	-	-	-
<i>Gustina PV+ neurona</i>	-	-	-
<i>Ukupan intezitet PNM</i>	-	$W_{1,9} = 23,280$ $p < 0,001$	$W_{1,9} = 14,552$ $p < 0,001$
<i>Intezitet PNM+PV+</i>	-	$W_{1,9} = 26,872$ $p < 0,001$	$W_{1,9} = 16,891$ $p < 0,001$
<i>Intezitet PNM+PV-</i>	-	-	-
<i>Gustina VGAT</i>	-	-	-
<i>Intezitet VGAT</i>	-	-	$W_{1,9} = 46,650$ $p < 0,001$
<i>Volumen</i>	-	$W_{1,9} = 17,246$ $p < 0,001$	-



**Slika 22. Efekti MD na gustinu PNM i PV+ interneurona u mPFK pacova (PND 60).** **a)** Konfokalne slike dvostruke fluorescencije, PNM (zeleno) i PV (crveno), prikazuju PNM+PV+ (pentagonalna strelica), PNM+PV- (glava strelice) i PV+ ćelije (strelica) u tri podregiona mPFK, roCg1, PrL i IL kod kontrolnih i MD životinja. Kalibracija: 25  $\mu\text{m}$ . **b)** *GLM* test je otkrio značajno smanjenje gustine ukupnih PNM+ i PNM+PV+ populacije kod MD pacova u roCg1 u poređenju sa kontrolom,  $p < 0,001$  za oba parametra. **c)** Značajne promjene u gustini PNM i PV+ neurona nisu zabilježene u PrL kod MD pacova. **d)** *GLM* test je otkrio značajno smanjenje gustine ukupnih PNM+ i PNM+PV+ populacija kod MD pacova u IL u poređenju sa kontrolom,  $p < 0,001$  za oba parametra. Gustina je izražena kao broj PNM i PV+ neurona po kvadratnom milimetru (broj/ $\text{mm}^2$ ). *Box plot* grafikoni prikazuju podatke za gustinu PNM i PV neurona, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartilnog opsega uvećane za 1,5.



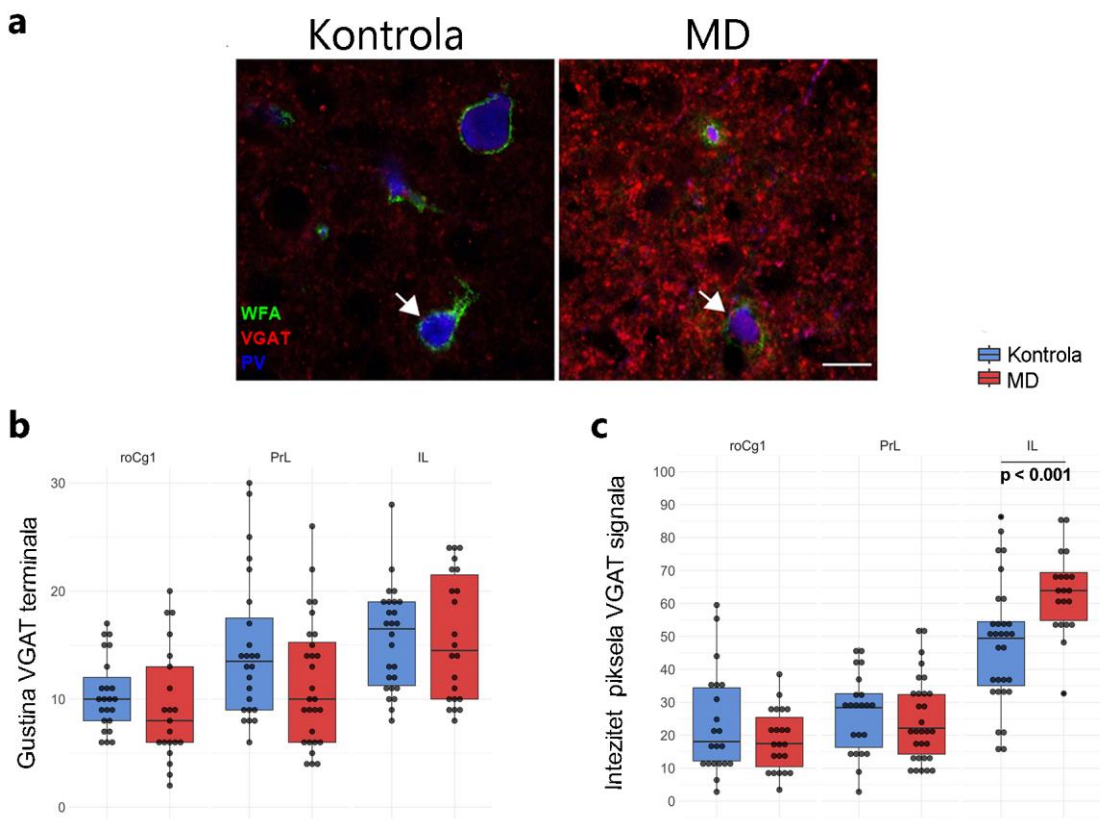
**Slika 23. Efekti MD na gustinu PNM i PV+ interneurona u hipokampusu pacova (PND 60).** **a)** Konfokalne slike manjeg uvećanja prikazuju dvostruku fluorescenciju, WFA (zeleno) i PV (crveno) u CA1, CA2, CA3 i DG hipokampusu kontrolnih životinja. PNM u CA2 se razlikuju specifičnom morfologijom u odnosu na druge regione. **b)** Konfokalne slike dvostruke fluorescencije, WFA (zeleno) i PV (crveno), prikazuju PNM+PV+ (pentagonalna strelica), PNM+PV- (glava strelice) i PV+ ćelije (strelica) u CA1, CA3 i DG kod kontrolnih i MD životinja. **c, d, e)** *GLM* test nije otkrio značajne promjene gustine PNM i PV+ neurona u hipokampusu MD pacova u poređenju sa kontrolom. Gustina je izražena kao broj PNM i PV+ neurona po kvadratnom milimetru (broj/mm<sup>2</sup>). *Box plot* grafikoni prikazuju podatke za gustinu PNM i PV neurona, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartilnog opsega uvećane za 1,5. Kalibracione oznake odgovaraju dužini od **a)** 100  $\mu$ m i **b)** 25  $\mu$ m.



**Slika 24. Intezitet piksela WFA signala, kao markera PNM u medijalnoj prefrontalnoj kori i hipokampusu pacova nakon MD (PND 60).** a) Ukupne PNM (PNN+), PNM+PV+ i PNM+PV-, nisu značajno promjenjene u roCg1 podregionu mPFK pacova u poređenju sa kontrolom. b, c) *GLM* test je otkrio značajno smanjenje inteziteta ukupnih PNN+ i PNN+PV+ populacije kod MD pacova u PrL i IL podregionima mPFK u poređenju sa kontrolom,  $p < 0,001$  za oba parametra i podregiona. d, e, f) Značajne promjene u intezitetu PNM nisu zabilježene u CA1, CA3 i DG hipokampusu kod MD pacova. *Box plot* grafikoni prikazuju podatke za intezitet piksela WFA signala sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartilnog opsega uvećane za 1,5.

## 4.5. Uticaj MD na strukturnu sinaptičku plastičnost u mPFK pacova

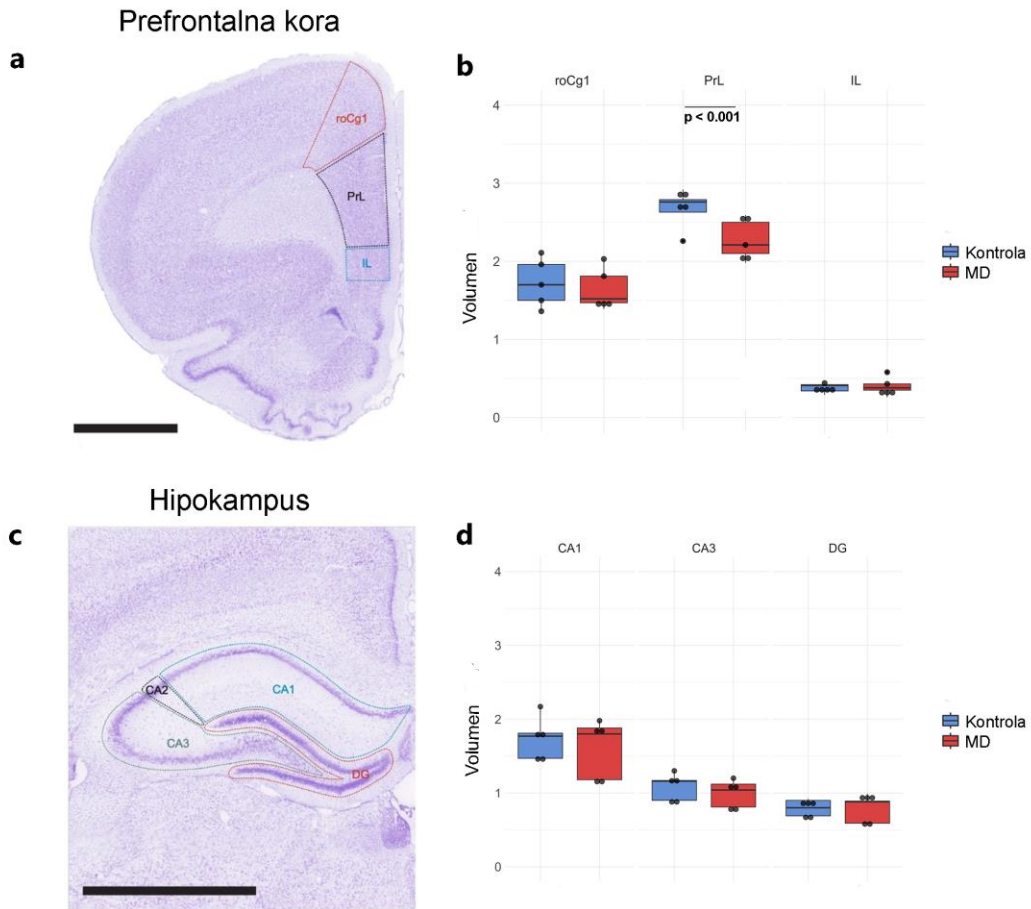
Budući da su promjene u PNM usko povezane sa promjenama u sinaptičkoj ekspresiji, pristupili smo analizi perisomatskih inhibitornih terminala koji se projektuju na PV+ interneurone obavijene PNM u mPFK. Analizirana je gustina i intezitet signala VGAT markera, koji obilježava presinaptičke inhibitorne završetke. Rezultati su pokazali da je intezitet VGAT terminala značajno povećan samo u IL kod MD pacova u poređenju sa kontrolnim životinjama (Tabela 9, Slika 25a,c). Nisu pronađene značajne razlike u gustini i intenzitetu VGAT markera između MD i kontrolnih pacova u drugim mPFK podregionima (Slika 25b,c).



**Slika 25. Gustina i intezitet VGAT inhibitornih sinaptičkih terminala u mPFK pacova nakon MD (PND 60).** a) Konfokalne slike trostruke fluorescencije, WFA (zeleno) i VGAT (crveno) i PV (plavo), prikazuju analizirane VGAT terminale koji se projektuju na PV+ interneurone koji ekspiriraju PNM (strelica) kod kontrolnih i MD životinja. Kalibracija: 15  $\mu\text{m}$  b) Promjene u gustini VGAT terminala nisu zabilježene mPFK kod MD pacova. c) GEE test je otkrio značajno povećanje ( $p < 0,001$ ) inteziteta piksela VGAT signala kod MD pacova u IL u poređenju sa kontrolom. U ostalim regionima mPFK promjene u intezitetu VGAT signala nisu pronađene. Gustina je izražena kao broj sinaptičkih terminala po kvadratnom mikrometru (broj/ $\mu\text{m}^2$ ). Box plot grafikoni prikazuju podatke za gustinu i intezitet VGAT terminala na PNM+PV+, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartalnog opsega uvećane za 1,5.

#### 4.6. Efekat MD na volumen mPFK i hipokampusa pacova

Kao jedan od važnih globalnih parametara strukturne plastičnosti ispitan je i uticaj materinske deprivacije na volumen mPFK i hipokampusa. Značajno smanjenje volumena kod pacova nakon MD je pronađeno samo u PrL, dok drugi regioni mPFK nisu izmjenjeni (Slika 26,a,b). Takođe, promjene u volumenu hipokampusnih podregiona CA1, CA3 i DG, kod MD pacova nisu zabilježene (Slika 26c,d).



**Slika 26. Efekti MD na ukupni volumen medijalne prefrontalne kore i hipokampusa pacova (PND 60).** Reprezentativne mikrografije **a**) medijalne prefrontalne kore (roCg1, PrL i IL), i **c**) hipokampusa (CA1, CA2, CA3 i DG), sa neuronima obilježenim krezil-violet bojom. **b**) *GLM* test je otkrio značajno smanjenje ( $p < 0,001$ ) volumena PrL podregiona kod MD pacova u poređenju sa kontrolom. roCg1 i IL nisu pokazali značajne promjene volumena nakon MD. **c**) U CA1, CA3 i DG podregionima hipokampusa nisu pronađene značajne promjene u volumenu kod MD pacova. Volumen regiona je izražen u  $\text{mm}^3$ . *Box plot* grafikoni prikazuju podatke za volumen mPFK i hipokampusa, sa linijama koje obuhvataju vrijednosti interkvartilnog opsega uvećane za 1,5. Kalibracione oznake **a**, **c**) odgovaraju dužini od 2 mm.



## 5. Diskusija

Rezultati ove doktorske disertacije otkrivaju ulogu TnC u strukturnoj plastičnosti hipokampusa, i pokazuju regionalnu zavisnost ove funkcije TnC. Demonstrirana je potencijalna uloga PNM u stabilizaciji inhibitornih sinapsi dentatnog girusa miševa divljeg soja u uslovima povišene plastičnosti, budući da njihovo gajenje u OS dovodi do povećanja inteziteta WFA signala i gustine inhibitornih završetaka. Efekat OS na ekspresiju PNM i njen uticaj na sinaptogenezu bi mogao biti posredovan tenascinom-C, s obzirom da promjene u intenzitetu WFA signala nisu zapažene kod TnC<sup>-/-</sup> miševa. Sljedeće je pokazano da TnC održava ultrastrukturu PNM u DG, i da sa smanjenjem kondenzacije PNM kod TnC<sup>-/-</sup> miša, ujedno dolazi i do povećanja gustine inhibitornih i smanjenja inteziteta ekscitatornih sinaptičkih završetaka. Takvo opsežno sinaptičko remodelovanje ukazuje na važnost TnC u regulaciji sinaptičke plastičnosti DG, kroz regulaciju stanja PNM. Međutim, izlaganjem životinja OS, moguće je obnoviti ultrastrukturu PNM i sinaptičku ekspresiju kod TnC<sup>-/-</sup> miševa, povećanjem smanjenog broja čvorova u PNM, gustine i inteziteta ekscitatornih VGlu1 završetaka. Pored DG, najistaknutije promene u ekspresiji PNM i sinaptičkih markera su zabilježene u CA2 podregionu. TnC reguliše broj PNM i ekspresiju inhibitornih završetaka u CA2, budući da je u njegovom nedostatku broj PNM povišen, kao i intezitet VGAT signala. Moguće je da sa povećanjem broja PNM kod TnC<sup>-/-</sup> miševa dolazi i do sinaptogeneze inhibitornih sinapsi na tijela neurona koji su obavijeni PNM u CA2 regionu. Kao i u DG, kod miševa divljeg soja zabilježeno je povećanje gustine VGAT završetaka nakon gajenja u OS, što ukazuje na efekat povišene plastičnosti na strukturnu plastičnost hipokampusa. Izostanak promjena u ekspresiji PNM, PV+ interneurona i sinaptičkih završetaka u CA1 regionu ukazuje da se uloga TnC u hipokampusu manifestuje isključivo u određenim podregionima.

Ova studija je takođe ispitala uticaj materinske deprivacije na strukturnu plastičnost prefrontalne kore mozga i hipokampusa. Pokazali smo da su promjene u gustini i intezitetu PNM okolo PV+ neurona, ekspresiji inhibitornih sinapsi i zapremini specifične za prefrontalnu koru, bez uticaja na hipokampus. Analizom podregiona mPFK je otkriveno da ova vrsta stresa u ranom životnom dobu smanjuje gustinu PNM okolo PV+ neurona u rostralnoj cingulatnoj kori. Takođe, u prelimbičkoj kori, MD dovodi do smanjenja inteziteta PNM koje obavijaju PV+ neurone, kao i do smanjenja volumena ovog podregiona. MD je najviše promjena prouzrokovala u infralimbičkoj kori, u kojoj je došlo do smanjenja gustine i inteziteta PNM okolo PV+ neurona, dok je istovremeno intezitet inhibitornih završetaka koje se projektuju na ove neurone bio povišen, ukazujući na poremećaj sinaptičke ekspresije usljed promjena u ekspresiji PNM.

## 5.1. Uloga TnC i obogaćene sredine u strukturnoj plastičnosti DG

Poznato je da stimulacija obogaćenom sredinom dovodi do mnoštva plastičnih modifikacija u mozgu adulta, kao što su promjene u sinaptičkoj ekspresiji i PNM (Nithianantharajah and Hannan, 2006; Trévia et al., 2011). Naši rezultati pokazuju da gajenje miševa divljeg tipa u OS u trajanju od 8 sedmica vodi ka porastu inteziteta PNM i gustine inhibitornih presinaptičkih završetaka koji se projektuju na ove neurone u DG. Ovakvi rezultati se mogu objasniti stabilizirajućom ulogom PNM u povezivanju novih sinaptičkih projekcija, što je od posebnog značaja u kreiranju dugotrajne memorije (Reichelt et al., 2019). Tako bi povećana sinteza komponenata PNM, koja je interpretirana kao porast inteziteta WFA signala, mogla da omogući stabilizaciju novonastalih inhibitornih sinapsi, budući da promjene u morfološkim parametrima ekscitatornih sinapsi nisu pronađene. Istraživanja sinaptogeneze nakon OS u hipokampusu su skoro isključivo fokusirana na ispitivanje ekscitatornih sinapsi (Hosseiny et al., 2015; Nithianantharajah and Hannan, 2006). Izuzetak je studija Stamenkovića i saradnika (2017), koji su pokazali da miševi divljeg soja, gajeni 8 sedmica u OS, imaju u cerebelumu smanjen intezitet PNM i veličinu inhibitornih završetaka, obilježenim markerom inhibitornih sinapsi, VGAT, kao i kalbindinom (Stamenkovic et al., 2017a). Budući da su trajanje OS i genetička pozadina životinja bile iste u predhodnoj i našoj studiji, razlika u rezultatima ukazuje da PNM i inhibitorne sinapse u malom mozgu potencijalno različito reaguju na OS u poređenju sa onima u hipokampusu, što je povezano sa različitim funkcijama ovih struktura. U višim moždanim strukturama, poput vizuelne kore, zabilježeno je da povećanje broja PNM nakon 9 sedmica OS, doprinosi oporavku od oštećenja izazvanog mono-okularnom deprivacijom (Trévia et al., 2011). Ovi rezultati impliciraju da intenzivna vizuelna i prostorna stimulacija, tokom OS, može dovesti do povećane sinteze komponenti PNM i na taj način stvoriti uslove za stabilizaciju novih sinapsi. Osim na sinaptogenezu, obogaćena sredina ima pozitivan uticaj na neurogenezu, koja se dešava u subgranularnom sloju DG, gdje smo primjetili da je distribucija PNM najgušća (Praag et al., 2000). Otkriće studije koju su sproveli Yamada i saradnici, 2018. godine, demonstrira da HSPG (lektikani), glavne građivne molekule PNM, imaju važnu ulogu u neurogenezi u DG koja je podstaknuta gajenjem životinja u OS. Protokol OS je trajao 2 sedmice nakon čega su utvrdili da je sinteza lektikana povećana samo okolo novonastalih granularnih ćelija, i da HSPG, kao i PNM u cjelosti, imaju važnu ulogu u stvaranju potporne sredine i integracije novih neurona u postojeća neuronska kola (Yamada et al., 2018). Slično pomenutoj studiji, naši rezultati su pokazali povećanje inteziteta PNM nakon 8 sedmica OS kod miševa koji su imali fiziološku ekspresiju TnC. Imunoreaktivnost tenascina-C je potvrđena u molekularnom sloju i hilusu DG, i efekat povećanja inteziteta PNM nakon OS bi potencijalno mogao biti povezan sa ekspresijom TnC (Ferhat et al., 1996a). Populacija PNM u DG, koja je imala značajno povećanje inteziteta nakon OS, nije eksprimirala parvalbumin, stoga pretpostavljamo da ovdje PNM eksprimiraju druge populacije interneurona u hipokampusu, kao što su neuroni koji eksprimiraju holecistokinin, kalretinin, vazoaktivni intestinalni peptid, somatostatin, relin, neuropeptid Y, ili kalretinin (Booker and Vida, 2018).



## 5.2. Osvrt na upotrebu mikroskopskih tehnika sa super rezolucijom

Struktura i funkcija PNM su se do pojave super-rezolucioničkih tehnika proučavale upotrebom konfokalne mikroskopije i izolacijom tkiva u svrhu kvantifikacije GAG molekula (Kwok et al., 2015). Nakon što je otkriveno koje gradivne jedinice ulaze u sastav PNM, njihova distribucija u mozgu je utvrđena tako što je mjereno intezitet fluorescentnog signala komponenti PNM (Brückner et al., 1993; Härtig et al., 1992; Seeger et al., 1994). Već od prvog opisa PNM 1898. godine u crtežima Kamila Goldžija, ističe se jedinstvena geometrija PNM, koju odlikuje sklop od više poligonalnih jedinica, većinom pentagona i heksagona (Celio et al., 1998). Prvu studiju PNM geometrije su uradili Arnst i saradnici, 2016. godine u kojoj su ispitivali mikrostrukturu PNM u somatosenzornoj kori glodara. Prikazali su da obilježavanje WFA markerom odgovara poligonalnim jedinicama PNM, koje su klasifikovane u dvije grupe, one koje imaju ravnomjernu distribuciju WFA signala i onu koja teži praviljenju uglova sa većim intezitetom WFA signala (Arnst et al., 2016). Zbog ograničenja prostorne rezolucije, dalja detaljna analiza nije bila moguća, međutim postavila je osnov za dalja ispitivanja ultrastrukture PNM.

Budući da su dimenzije poligonalnih strukturnih jedinica PNM blizu ili ispod difrakcione granice svjetlosne mikroskopije, efikasnija analiza je omogućena tek primjenom super-rezolucione mikroskopije. Dzyubenko i saradnici su 2018. godine, primijenili super-rezolucionu mikroskopiju struktuirane iluminacije (SIM) koja je prvi put omogućila kvantitativnu analizu topologije PNM. Eksperimentalni model koji su odabrali za proučavanje topologije PNM je hipoperfuzija i fokalna cerebralna ishemija u mozgu pacova. Studija je kombinovala 3D snimanje pomoću SIM-a sa matematičkom rekonstrukcijom i analizom PNM čvorova kao centara WFA signala (Dzyubenko et al., 2018).

Super-rezoluciona mikroskopska tehnika koja koristi struktuiranu iluminaciju (SIM) nudi nekoliko prednosti u odnosu na konfokalnu mikroskopiju prilikom istraživanja perineuronskih mreža, što značajno unapređuje naše razumjevanje njihove strukture i funkcije. Osnovna prednost je što SIM obezbjeđuje veću prostornu rezoluciju od 120 nm u lateralnom i 300 nm u aksijalnom pravcu, koliko smo postigli u našem istraživanju, u poređenju sa prostornom rezolucijom konfokalne mikroskopije koja postiže 400 nm u lateralnom i 800 nm u aksijalnom pravcu. Ovo povećanje u rezoluciji omogućava detaljno prikazivanje topografije PNM i geometrije složenih poligonalnih jedinica koje je čine. Koristeći SIM mikroskopiju u istraživanju plastičnih promjena PNM u modelu TnC<sup>-/-</sup> miševa, bilo je moguće detektovati suptilne promjene koje nisu uočene konfokalnom mikroskopijom. Zbog toga, analizom konfokalnih slika PNM u hipokampusu TnC<sup>-/-</sup> miševa nisu prijavljene promjene u ekspresiji PNM, dok je kod iste grupe pronađena značajna redukcija broja čvorova (središta inteziteta WFA) u PNM. Veću prostornu rezoluciju SIM mikroskopije omogućava snimanje sa pomjerajućim obrascima osvjeljenja kojoj slijedi rekonstrukcija slika upotrebom Furijeove transformacije. Rekonstruisane slike PNM su visoke rezolucije i moguće ih je analizirati naprednim programima poput IMARIS-a koji ima opciju za kvantifikaciju cijele strukture lokalizirajući njene najmanje sastavne dijelove, kao što su gore opisana središta inteziteta WFA signala ili čvorovi PNM. Dok su informacije koje nam pruža konfokalna mikroskopija u istraživanju PNM limitirane na broj PNM i intezitet piksela WFA

signala, analizom slika dobijenih SIM tehnikom možemo kvantifikovati stanje ultrastrukture PNM, pročavajući prostornu organizaciju čvorova koji je čine. Tako dobijamo veći uvid u kondenzovanost mreže i finu granularnost, informacije koje ne bi bile moguće saznati u ovim detaljima iz analize konfokalnih slika. Kao što je pokazano u istraživanju od Dzyubenko et al., (2018), često su promjene u PNM, usljed patoloških stanja poput hipoperfuzije i ishemije, diskretne i detektuju se upravo primjenom SIM mikroskopije kombinovanom sa naprednom analizom dobijenih slika (Dzyubenko et al., 2018).

Od svog pojavljivanja prije više od dvije decenije (Gustafsson, 2000), SIM je višestruko napredovala kao tehnika snimanja, sa više metoda za generisanje strukturnih obrazaca osjvetljenja (Gao et al., 2012; Gustafsson et al., 2008; Kner et al., 2009), kao i za rekonstrukciju slika (Wen et al., 2023; Zhang et al., 2023). U poređenju sa drugim super-rezolucionim tehnikama, brzina, visok odnos signala i šuma, kao i nizak intezitet ekscitacijskog svjetla čine SIM dobrim izborom za snimanje različitih uzoraka u tri dimenzije (Paul et al., 2023). Jedna od novih metoda za rekonstrukciju SIM slika je super-rezolucionna radijalna fluktuacija (Augmented Super-Resolution Radial Fluctuations – aSRRF, eng.) kojom je moguće povećati rezoluciju na 50 nm u svim pravcima, bez modifikacija postavke optičkog sistema (Zhang et al., 2023). Sljedeće je razvijen program za direktnu rekonstrukciju SIM slika (*direct-SIM*, eng.) usmjeren ka popravci čestih artefakta (Wen et al., 2023). Takođe, dolazi do razvoja novih konfiguracija SIM sistema, poput konstrukcije uspravnog SIM mikroskopa kojim je njegova upotreba proširena na snimanja uporedo sa manipulacijom uzorka (Wang et al., 2023). U toj studiji, Wang i saradnici (2023) su razvili DeepSIM sistem u kojem su koristili adaptivnu optiku za korekciju svjetlosnih aberacija i fokusiranje na daljinu, što je smanjilo artefakte i omogućilo snimanje duboko u tkivu živog uzorka. Jedna od limitirajućih svojstava SIM mikroskopije je njena osjetljivost na svjetlosne aberacije koje potiču od različitog sastava tkiva (Wang et al., 2023). Zato su predhodno snimani uzorci morali biti debljine do 10  $\mu\text{m}$ , zbog čega smo i u našoj studiji pristupili pažljivom sječenju hipokampusa  $\text{TnC}^{+/+}$  i  $\text{TnC}^{-/-}$  miševa do pomenute debljine tkiva. Međutim, ovo ograničenje u debljini uzorka za posljedicu ima izostanak snimanja cjele strukture PNM, budući da je njena veličina oko 20-30  $\mu\text{m}$ , u zavisnosti od veličine neurona koji obavija. Korištenjem novih metoda poput DeepSIM, biće moguće snimanje kompletne strukture PNM a time i njena detaljnija analiza.

Pored SIM mikroskopije za utvrđivanje ultrastrukture PNM, super-rezolucionom tehnikom stohastičke optičke rekonstrukcijske (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy – STORM*, eng.) su kvantifikovane promjene u PNM na mišijem modelu Ret sindroma, razvojnog neurološkog poremećaja (Sigal et al., 2019). PNM na PV+ interneuronima u kori velikog mozga su snimljene u 2D režimu i od snimaka je napravljena 3D rekonstrukcija površine PNM koja je omogućila detaljniju analizu njene topografije. Pokazali su da PNM sa jačim WFA signalom imaju manje šupljina koje su uniformnije veličine, i kroz koje prolaze dendriti ekscitatornih sinapsi, projektujući se na neuronsko tijelo PV interneurona (Sigal et al., 2019). Osim pomenutih tehnika koje su ispitivale ultrastrukturu PNM snimajući fiksirano tkivo, razvijen je pristup obilježavanja i oslikavanja E $\text{C}\text{M}$  u živom tkivu koristeći super-rezolucionu tehniku oslikavanja sjenom (*Super-resolution Shadow Imaging - SUSHI*, eng.), koja je bazirana na 3D STED mikroskopiji (*Stimulated Emission Depletion - STED*, eng.) (Tønnesen et al., 2018). Ovom tehnikom je bilo moguće obilježiti cjelokupan E $\text{C}\text{M}$  u moždanom tkivu, stvarajući jak kontrast između neobilježenih

neurona, dendritskih trnova i E $\dot{C}$ M (Hrabetova et al., 2018; Tønnesen et al., 2018). SUSHI tehnika je omogućila detektovanje remodelovanja E $\dot{C}$ M izazvanog aktivnošću eksperimentalnog modela (Tønnesen et al., 2018).

Pomenuti tehnički napreci u super-rezolucionalnoj mikroskopiji, sa posebnim naglaskom na SIM omogućavaju sveobuhvatniju analizu PNM, otkrivajući njihovu ultrastrukturu na nivou nanometarske skale što je ključno za razumjevanje uloge ovih struktura u neuronalnoj plastičnosti.

### **5.3. Uloga TnC i obogaćene sredine u ultrastrukturi PNM i sinaptičkoj ekspresiji DG**

U našem istraživanju smo primjenili SIM mikroskopiju kako bi po prvi put istražili ultrastrukturu PNM u hipokampusu TnC-deficijentnih i TnC<sup>+/+</sup> miševa nakon gajenja u standardnoj i obogaćenoj sredini. Analizirajući topografiju PNM, identifikovali smo smanjen broj čvorova u perineuronalnim mrežama u DG regionu, kod TnC<sup>-/-</sup> miševa gajenih u standardnoj sredini. Ovakva promjena u finoj granulaciji PNM je potvrdila ulogu TnC u održavanju stanja kondenzovanosti PNM. U analizi topografskih parametara je korišten pristup Dzyubenko i saradnika iz 2018. godine, koji su pokazali da PNM ne prelaze u stanje razgradnje tokom ishemije, već da se mijenja obrazac međusobnog povezivanja čvorova koji čine PNM. Tako bi PNM pri blagoj hipoperfuziji i ishemiji mogle biti u specijalizovanom stanju disocijacije čvorova, sa mogućnošću vraćanja u originalan sklop, što bi održalo ravnotežu između plastičnosti i zaštite funkcija u patološkim slučajevima (Dzyubenko et al., 2018). Za razliku od invazivnosti ishemije koja dovodi do reorganizacije čvorova u PNM, naši rezultati pokazuju da nedostatak samog TnC utiče na ultrastrukturu PNM redukovanjem broja čvorova. Zajedno sa regulacijom kondenzacije PNM, ističe se važna uloga TnC kao modulatora strukturne sinaptičke plastičnosti u DG. Naime, kod TnC<sup>-/-</sup> miševa smo ustanovili sinaptičko remodelovanje inhibitornih i ekscitatornih sinapsi, u vidu povećanja gustine inhibitornih, a smanjenja inteziteta ekscitatornih završetaka. Pomenuti rezultati su u skladu sa ulogom PNM u očuvanju sinaptičke ekspresije, gdje se smatra da manje kondenzovane PNM omogućavaju više sinaptičkih projekcija na tijelo neurona kojeg obavijaju (Reichelt et al., 2019). Dakle, uloga TnC u održavanju stabilnosti neuronskih kola u DG se ogleda u očuvanju pravilne sinaptičke ekspresije, što se ostvaruje održavanjem kondenzovanog stanja ultrastrukture PNM.

Interakcija TnC-deficijentnog miša sa OS je kao posljedicu imala promjene u PNM i sinaptičkoj ekspresiji u DG. OS je dovela do obnove broja čvorova u PNM, gustine i inteziteta ekscitatornih završetaka kod TnC<sup>-/-</sup> miševa. U ovom slučaju, primjećuje se da OS može imati kompenzatorni efekat u uslovima deficijencije TnC, mogućom aktivacijom drugih mehanizama za očuvanje stanja PNM i sinaptičke ekspresije. Ovi rezultati potvrđuju zavisnost dinamične uloge TnC od sredinskih faktora. U malom mozgu TnC<sup>-/-</sup> miševa je prijavljen sličan efekat OS na intezitet signala PNM, u vidu oporavka inteziteta fluorescencije koji je smanjen u SS, međutim promjene u sinaptičkoj ekspresiji nisu pratile obrazac promjena koje smo demonstrirali u DG (Stamenkovic et al., 2017a). Regenerativni uticaj OS na GABA-ergički i glutamatergički sistem

hipokampusa je potvrđen kod miševa koji su se oporavljali od cerebralne ishemije, pokazujući da gajenje u uslovima koji vode do povišene plastičnosti vodi oporavku viših moždanih funkcija (Y. Wang et al., 2020).

#### 5.4. Uloga TnC u strukturnoj plastičnosti CA1-3 regiona

Analizom *Cornu ammonis* (CA) podregiona hipokampusa, utvrdili smo da TnC ima ključnu ulogu u očuvanju ekspresije PNM i sinaptičke plastičnosti u CA2 regionu, u kojem su TnC<sup>-/-</sup> miševi imali povećan broj PNM i gustinu inhibitornih završetaka nakon gajenja u standardnim uslovima. Istovremeno povećanje broja PNM i inhibitornih projekcija u CA2 podregionu može oslikavati ulogu PNM u stabilizaciji novih sinaptičkih veza (Reichelt et al., 2019). Budući da promjene u broju PNM kod TnC-deficijentnog miša potiču od neurona koji nisu pozitivni na parvalbumin, pitanje je oko kojih neurona u CA2 podregionu je povišen broj PNM. U poređenju sa drugim podregionima hipokampusa, potvrdili smo da se CA2 razlikuje po većoj gustini PNM (Carstens et al., 2016) i PV+ inhibitornih interneurona (Domínguez et al., 2019), kao i da se odlikuje posebnom morfologijom PNM. Neuron koji PNM obavijaju u CA2 podregionu su pozitivni na ekscitatorni neuronalni marker PCP4 (Lensjø et al., 2017a) i imaju važnu ulogu u socijalnoj memoriji (Cope et al., 2022). Poremećaji u formiranju PNM, u vidu smanjenja procenta neurona obuhvaćenih PNM kao i veličinom PNM, su pronađeni kod primarnih hipokampusnih neurona miševa deficijentnih u ekspresiji četiri molekule ECM: TnC, TnR, brevikana, i neurokana (Geissler et al., 2013). Druga studija istog genetičkog modela je pokazala da sazrijevanje PNM značajno kasni u CA2 podregionu, s tim da dostiže fiziološku ekspresiju nakon 30-tog postnatalnog dana i ostaje nepromjenjena u odraslom dobu (Gottschling et al., 2019). Suprotno rezultatima pomenute studije, mi smo pokazali da dolazi do promjene u broju PNM u CA2 regionu kod miševa u odraslom dobu, što može ukazivati na specifičan doprinos TnC u održavanju PNM u odraslom dobu.

CA podregioni hipokampusa nisu pokazali nikakve promjene u parametrima PNM kao odgovor na OS. Carstens i saradnici su pokazali da rano gajenje miševa u OS, koje počinje od neonatalnog perioda do 21. i 45. postnatalnog dana, dovodi do povećanja inteziteta PNM u CA2 regionu (Carstens et al., 2016). Najvjerojatnije objašnjenje za nepodudaranje sa našim rezultatima je kasnije uvođenje i različito trajanje OS. Izloženost OS može imati uticaj na PNM u CA2 podregionu samo ako se desi prije zatvaranja vremenskog prozora plastičnosti (Travaglia et al., 2018). U suprotnom, PNM ostaju nepromjenjene, dok je moguće da se efekat OS na sinapse zadržava dugotrajnije, u vidu povećanja gustine inhibitornih završetaka u CA2 i CA3 podregionima. Funkcija TnC kao regulatora sinaptičkog integriteta u tim regionima bi mogla postati izraženija u uslovima povećane neuronske stimulacije u OS.

Prvo istraživanje PNM u hipokampusu TnC-deficijentnog miša su sproveli Evers i saradnici, kada su kontruizali mišiji model sa nefunkcionalnim TnC proteinom (Evers et al., 2002).

U toj studiji nisu pronađene nikakve promjene u ekspresiji PNM u CA1 regionu kod TnC<sup>-/-</sup> miševa koji su bili stari 7 sedmica, međutim, pronađeni su deficiti u sinaptičkoj plastičnosti, u vidu poremećaja LTP kod TnC<sup>-/-</sup>. U našem istraživanju smo koristili životinje koje potiču od TnC<sup>-/-</sup> modela iz studije Evers et al., (2002), i naša otkrića su potvrdila nedostatak promjena u ekspresiji PNM u CA1 regiji kod miševa starih 11 sedmica, s tim da razlike u strukturnoj sinaptičkoj plastičnosti nismo pronašli. Mogući razlog tome je što su miševi starosti 7 sedmice bliži prozoru plastičnosti i da se zadržavaju određene forme sinaptičke plastičnosti. Osim toga, broj PV+ neurona nije promjenjen kod TnC<sup>-/-</sup> miševa u CA1 regionu, što se slaže sa rezultatima u Gurevicius et al., 2009, i ukazuje na to da TnC nema ulogu u ekspresiji PV+ interneurona. Smanjena gustina PV+ neurona i odnos ekscitatornih prema inhibitornim neuronima su pronađeni u senzornoj kori TnC<sup>-/-</sup> miševa, ukazujući na važnost TnC za normalan kortikalni razvoj (Irintchev et al., 2005). Nedostatak efekta TnC u CA1 podregionu je mogući odraz odsustva uloge ovog molekula u asocijativnoj memoriji i prostornoj navigaciji, primarnim funkcijama CA1 podregiona. Ova pretpostavka je podržana prethodnom studijom koja je pokazala da prostorno učenje i memorija nisu bili promijenjeni kod TnC<sup>-/-</sup> miševa (Evers et al., 2002).

Mjerenje VGlut1 parametara se pokazalo kao izazov u CA1 podregionu, jer je visoka ekspresija ovog proteina u slojevima *stratum oriens* i *stratum radiatum*, a niska u *stratum pyramidale*, dovela do visokog pozadinskog signala i otežala kvantifikaciju morfoloških parametara ekscitatornih sinapsi. Takođe, distribucija PNM varira u različitim slojevima hipokampusa, i one se većinski nalaze u piramidalnom sloju CA1 regiona, gdje je ekspresija VGlut1 niska. CA3 regija je najmanje istražena hipokampusna regija u TnC-deficijentnom modelu, bez prethodnih podataka o ekspresiji PNM, i bez pronađenih promjena u njihovoj ekspresiji u našoj studiji.

Naši rezultati sugerišu da u uslovima deficijencije TnC i stimulirajuće okoline, promjene plastičnosti mogu nastati s različitim manifestacijama u različitim podregionima dorzalnog hipokampusa. Važno je napomenuti da su promjene u sinaptičkoj ekspresiji pod različitim genetskim i okolinskim uslovima uglavnom bile u skladu s promjenama u ekspresiji PNM. TnC bi mogao biti specifično uključen u modulaciju strukturne i sinaptičke plastičnosti unutar funkcionalnih mreža u DG i CA2 podregionima, koji su odgovorne za odvajanje obrazaca i socijalnu memoriju, a bez uticaja na primarne funkcije CA1 i CA3 podregiona.

## 5.5. Uticaj MD na PNM u prefrontalnoj kori pacova

Postnatalni razvoj prefrontalne kore se nastavlja kroz neonatalni period, djetinjstvo i adolescenciju jedinke, jer je u poređenju sa drugim kortikalnim regionima okarakterisan većim intezitetom modulacije sinaptogeneze uz uklanjanje neintegrisanih sinapsi (Elston et al., 2009). Zbog toga, neuroni u mPFK su posebno osjetljivi na stres, ne samo u ranom životnom dobu, već i u adolescenciji (Arnsten, 2009; Koseki et al., 2009; Teicher et al., 2016). Kada rani traumatski događaj poput odvajanja od majke, poremeti normalni fiziološki razvoj mPFK tokom odrastanja i formiranja, to može dovesti do poremećaju u PNM koje obavijaju PV neurone, važne za pravilno funkcionisanje prefrontalne kore.

Naša studija prikazuje da jednokratna materinska deprivacija u trajanju od 24h za PND9, dugotrajno utiče na gustinu i intezitet PNM, ekspresiju inhibitornih završetaka i zapreminu različitih podregiona medijalne prefrontalne kore, ali bez uticaja na pomenute parametre u hipokampusu. Izlaganje MD je dovelo do smanjenja gustine ukupnih PNM u IL i roCgl, što je u skladu sa rezultatima studije Gildawie et al., iz 2020. godine, gdje su mužjaci i ženke imali smanjenje gustine PNM u IL nakon MD od 4h na dan u periodu PND2-20. Suprotno našim rezultatima, u kojima nisu pronađene promjene u gustini PNM u PrL podregionu, pomenuta studija je pokazala smanjenje gustine PNM u tom regionu kod pacova oba pola koji su bili izloženi MD (Gildawie et al., 2020). Takođe, gustina PNN+/PV+ neurona je smanjena u IL kod odraslih ženki pacova, dok su naši rezultati pokazali smanjenje gustine ovih neurona u IL i roCgl mladih odraslih mužjaka (Gildawie et al., 2020). Korišćenjem drugačijeg protokola MD, nedavna studija je pokazala da odvajanje od majke u trajanju od 3h na dan od PND2-14, nije imalo uticaja na broj PV+ ćelija i broj PNM u PrL i IL regionima prelimbičke kore (Richardson et al., 2021). U našem istraživanju smo potvrdili smanjenje intenziteta perineuralnih mreža oko PV+ neurona nakon MD, u PrL i IL. Ove promjene su u skladu sa radom Ueno et al., 2018., gdje je 50 dana fizičkog i socijalnog stresa, od PND21-71, dovelo do smanjenja intenziteta WFA signala u PrL i IL kori.

Smanjenje gustine PNM u roCgl i IL, i smanjenje intenziteta PNM u PrL i IL, može ukazati na različitu osjetljivost regiona mPFK na izloženost MD. Uzrok smanjenja gustine ili intenziteta PNM može biti povezan sa povećanjem aktivnosti proteolitičkih enzima, poput MMP-9, koji razgrađuju komponente PNM (Stamenkovic et al., 2017a). Tako bi potpuni gubitak PNM, mjereno kroz smanjenje gustine, ukazivao na visok nivo aktivnosti proteolitičkih enzima, dok smanjenje intenziteta PNM može značiti da je proteolitička degradacija PNM na nižem nivou. Eksperimentalni protokoli iz naših i gorepomenutih studija MD su se razlikovali u tipu, periodu i trajanju stresa, ali imajući u vidu da je ekspresija PNM zavisna od iskustva životinja, izloženost bilo kojim stresnim uslovima može dovesti do posljedičnog smanjenja gustine i intenziteta WFA signala. Sa druge strane, različiti protokoli materinske deprivacije i polno-specifični odgovor na stres, mogu dovesti do razlika u pogođenim populacijama neurona okruženim PNM. Pretpostavljamo da takve razlike mogu biti uzrokovane različitim protokolima odvajanja od majke korišćenim u studijama, gdje

smo koristili 24-časovnu MD na PND9 u odnosu na dugotrajni protokol MD na 4 h od PND2-20 (Gildawie et al., 2020).

Primjenom istog protokola ranog traumatskog iskustva kao u prethodnim studijama (Aksic et al., 2021; Poleksic et al., 2021) potvrdili smo odsustvo promena u gustini PV+ ćelija nakon MD u IL. Međutim, iznenađujući rezultat je što nisu otkrivene značajne promene u gustini PV interneurona u roCg1 i PrL nakon MD. Ovakve razlike u odnosu na prethodne nalaze se mogu djelimično objasniti različitim pristupom analizi. Naime, iako je korišćen isti MD protokol, Poleksic et al., 2021., su radili odvojenu analizu površinskih i dubokih slojeva prefrontalne kore, dok su u ovoj studiji duboki i površinski slojevi analizirani zajedno. U drugim studijama gdje nisu sprovedeni protokoli ranog traumatskog iskustva, otkriveno je da intenzitet PV signala zavisi od toga da li taj interneuron eksprimira PNM, i da ima pozitivnu korelaciju sa intenzitetom WFA signala u PrL regionu (Carceller et al., 2020).

## **5.6. Uticaj MD na PNM u hipokampusu pacova**

U našem istraživanju nismo pronašli promjene u gustini ili intenzitetu PNM koje obavijaju PV+ ili PV- inhibitorne interneurone u hipokampusu pacova nakon MD. U skladu sa tim rezultatom, protokol fizičkog i socijalnog stresa u adolescenciji nije izazvao promjene u gustini PNM i procentu PNM+PV+ ćelija u bilo kojem od hipokampusnih podregiona (Ueno et al., 2018). Jedina značajna razlika u toj studiji je bila smanjenje inteziteta WFA signala u CA1 regionu pacova koji su pretrpjeli rano traumatsko iskustvo. Dalje, hronični protokol MD u vidu odvajanja u trajanju od 4-8 sati svaki dan u periodu PND2-16, je pokazao povećanje inteziteta WFA signala u DG ventralnog hipokampusa bez promjena u gustini PNM (Murthy et al., 2019). S obzirom da se funkcije dorzalnog i ventralnog hipokampusa razlikuju i da je ventralni hipokampus povezan sa kontrolom emocionalnih odgovora u regulaciji stresa, nije iznenađujuće što MD utiče na ventralni a ne dorzalni hipokampus (Fanselow and Dong, 2010).

## **5.7. Uticaj MD na volumen prefrontalne kore i hipokampusa pacova**

Materinska deprivacija je uzrokovala smanjenje volumena PrL regiona, što je u skladu sa rezultatima Sarabdjitsingh et al., (2017), gdje je 24-časovna MD u PND3 dovela do smanjenja volumena mPFK pacova, izmjereno koristeći oslikavanje magnetnom rezonancijom. Naši rezultati poređenja volumena hipokampusa kontrolnih i MD životinja su u suprotnosti sa nalazima Aksića et al., (2013), gde je opisano smanjenje zapremine hipokampusa nakon 24 h MD za PND9. Međutim, promjene u zapremini PrL nakon MD, koje smo pronašli nisu uticale na gustinu PNM i PV+ neurona. Što se tiče drugih neokortikalnih područja, MD je uzrokovala smanjenje zapremine



retrosplenijalne kore (Aksić et al., 2013), smanjenje dekarboksilaze glutaminske kiseline u temporalnoj kori (Janetsian-Fritz et al., 2018) i promene u purinergičkim receptorima u insularnoj kori velikog mozga (Zhang et al., 2018). Ove studije ukazuju da posmatrane promjene nisu ograničene na mPFC, već da MD utiče na moždana područja uključena u pamćenje, obradu slušnih informacija i percepciju bola.

## 5.8. Uticaj MD na sinaptičku plastičnost mPFC

Promjene u PNM su se odrazile na inhibitorni balans u mPFC, gdje smo pronašli značajno povećanje VGAT sinaptičkih završetaka koji se projektuju na PNM+PV+ interneurone u infralimbičkoj kori kod MD pacova. Istraživanje efekta hroničnog stresa na IL podregion mPFC su sproveli McKlveen et al., (2016) koristeći *patch clamp* tehniku na piramidalnim neuronima. Pokazali su da 14 dana hroničnog promenljivog stresa u odrasloj dobi dovodi do povećanja perisomatskog oslobađanja GABA (McKlveen et al., 2016). Povećanje gustine VGAT završetaka je takođe otkriveno u IL mužjaka i ženki miševa nakon 15 dana stresa prije adolescencije (Bueno-Fernandez et al., 2021). Zatim, Lensjø i saradnici su pokazali povećanje postsinaptičkih inhibitornih završetaka nakon enzimatskog uklanjanja PNM u primarnom vizualnom korteksu (Lensjø et al., 2017). Iako se opisani protokoli stresnog iskustva razlikuju od modela ranog životnog stresa, povećanje inhibitornih završetaka može sugerisati opšti mehanizam hiperaktivnosti mPFC i drugih moždanih područja. Ukoliko se inhibira aktivnost inhibitornih interneurona onda oni ne luče neurotransmitere koji inhibiraju ekscitatorne neurone i dolazi do hiperaktivnosti kao odgovora na traumatska iskustva i uklanjanje PNM. U studiji gdje nije bilo stresnog iskustva, injektiranje hondroitinaze ABC koja razgrađuje PNM u mPFC, nije dovelo do promjena u VGAT perisomatskim punktovima na PNM+/PV+ ćelijama (Carceller et al., 2020).

Pokazali smo da uvođenjem 24 h MD, dolazi do smanjenja intenziteta i gustine PNM, a povećanja VGAT intenziteta sinapsi projektovanih na PNM+/PV+ ćelije u IL mPFC. Takvi nalazi ukazuju da u uslovima materinske deprivacije, ukoliko se PNM razgrade i više ne kontrolišu i stabilizuju inhibitorne projekcije na PV+ ćelije, povećanje inhibicije može dovesti do pomjeranja balansa ekscitacije/inhibicije.

## 5.9. Interakcija PNM i sinapsi u modelu ranog traumatskog iskustva

Medijalna prefrontalna kora ima ključnu ulogu u regulaciji straha i kognitivne fleksibilnosti (Nett and LaLumiere, 2021), procesa za koje je prethodno prijavljeno da su izmjenjeni ranim traumatskim iskustvom (Baudin et al., 2012; Stamatakis et al., 2016). Zanimljivo je da reverzno učenje i promjena pažnje, dva glavna aspekta kognitivne fleksibilnosti, nisu bila promenjena enzimatskom degradacijom PNM u mPFC odraslih pacova (Paylor et al., 2018). Odsustvo kognitivne nefleksibilnosti može se objasniti sazrijevanjem neuronskih kola u mPFC kod odraslih

pacova. Međutim, u našoj studiji, stresni događaj se desio tokom ranog postnatalnog perioda, kada se mPFK intenzivno razvija i podložnija je efektima ranog traumatskog iskustva (Kolb et al., 2012). Iako različiti modeli stresa u ranom uzrastu mogu dovesti do nekonzistentnih rezultata, istraživanja jasno prikazuju da je razvoj PNM koje eksprimiraju PV+ interneuroni u mPFK pogođen neonatalnim i adolescentskim stresom (Gildawie et al., 2020; Ueno et al., 2018). Takve razvojne promjene mogu imati dugotrajne posljedice na neuronska kola u koja su uključeni PV inhibitorni interneuroni, rezultirajući poremećajem u balansu ekscitacije i inhibicije (McKlveen et al., 2019). Za opisivanje ovakvih procesa, Spijker i saradnici (2020) su predložili model promjena u EĆM nakon izloženosti stresnim događajima u ranom životnom dobu. Tako bi fiziološka ekspresija PNM i PV koja osigurava optimalnu sinaptičku povezanost ukoliko je poremećena akutnim stresnim događajem, dovela do povećane sinaptičke povezanosti, mogućim smanjenjem ekspresije PNM (Spijker et al., 2020). Dalje bi smanjen intezitet ili gustina PNM u mPFK sa povišenom inhibicijom, kao što je pronađeno u našoj studiji, odražavao akutnu fazu stresnog odgovora gdje sinapse nisu stabilizovane perineuronskim mrežama. U odrasloj dobi, nakon što je balans E/I narušen uslijed ranog traumatskog iskustva, dalja razgradnja molekula EĆM bi mogla smanjiti ekscitatorne projekcije na PV+ interneurone, što bi dovelo do smanjenog lučenja GABA neurotransmitera, čime se smanjuje ukupna inhibicija u neuronskim kolima (Riga et al., 2017; Spijker et al., 2020). Rano traumatsko iskustvo, kao što je odvajanje od majke u neonatalnom periodu, može da utiče na krivu razvoja PNM u mPFK odraslih životinja, tako što smanjuje broj i intezitet PNM sprečavajući stabilizaciju sinapsi koje se projektuju na PV+ interneurone (Sultana et al., 2021). Predloženi mehanizam podržavaju i recentni rezultati povećanog omjera plastičnosti/stabilnosti, sa prijavljenim povišenjem ekspresije BDNF u mPFK neonatalnih i mladih odraslih pacova nakon MD (Poleksic et al., 2021). Predhodno je pokazano da u prefrontalnoj kori miševa, PV+ interneuroni koji su obavijeni PNM imaju veću ekspresiju parvalbumina, VGAT i VGlut1 sinaptičkih markera, kao i duže aksonske segmente u poređenju sa PV+ interneuronima koji nemaju PNM (Carceller et al., 2020). Ovi rezultati ističu ulogu PNM u regulaciji sinapsi koje se projektuju na tijela PV+ neurona, čime doprinose sinhronizaciji kortikalnih kola u mPFK. Naši rezultati podržavaju ovo gledište isticanjem da promjene u PNM intenzitetu potiču od promjena PNM specifično oko PV+ interneurona, i sugerišu važnost PNM+PV+ ćelija u regulaciji neuronske aktivnosti u mPFK nakon ranog traumatskog iskustva. S obzirom da glavnu ulogu u regulaciji neuroendokrinog stresa u mPFK ima njegov infralimbički dio (Radley et al., 2006), naglašavamo značaj PNM+/PV+ ćelija u IL, gde je u poređenju sa drugim regijama mPFK ispitanim u ovoj studiji, IL pokazao najistaknutije i najdosljednije promjene nakon MD.

## 6. Zaključci

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj studiji mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Obogaćena sredina u trajanju od 8 sedmica pokreće strukturnu plastičnost u dentatnom girusu kod miševa divljeg soja tako što povećava kompaktnost perineuronskih mreža i gustinu inhibitornih završetaka.
2. Tenascin-C reguliše plastičnost inhibitornih i ekscitatornih sinapsi u dentatnom girusu održavajući ultrastrukturu perineuronskih mreža, s tim da obogaćena sredina može da kompenzuje promjene u njihovoj ultrastrukturi kao i organizaciji ekscitatornih sinapsi koje su izazvane nedostatkom tenascina-C.
3. Mikroskopija strukturirane iluminacije je kao ključna super-rezoluciona tehnika, omogućila detaljnu analizu ultrastrukture perineuronskih mreža na nanometarskoj skali, čime je značajno unaprijedila razumjevanje njihove uloge u neuronalnoj plastičnosti.
4. Tenascin-C vrši regulaciju broja perineuronskih mreža i ekspresije inhibitornih završetaka u CA2 regionu hipokampusa, jer u odsustvu TnC dolazi do povećanja njihovog broja i gustine inhibitornih sinapsi.
5. Tenascin-C ne utiče na ekspresiju perineuronskih mreža u CA3 i CA1 regionu, i na promjene u organizaciji sinaptičkih završetaka CA1 regiona.
6. Materinska deprivacija negativno utiče na ekspresiju perineuronskih mreža oko parvalbuminskih interneurona u medijalnoj prefrontalnoj kori, tako što smanjuje gustinu perineuronskih mreža u rostralnoj cingulatnoj kori, i intezitet perineuronskih mreža u prelimbičkoj kori, kao i zapreminu tog regiona.
7. Infralimbička kora je region medijalne prefrontalne kore koji je najpodložniji dugotrajnim efektima materinske deprivacije, koja je dovela do smanjenja gustine i inteziteta perineuronskih mreža uz povećanje inhibitornih završetaka, što jasno ukazuje na ulogu ovih struktura kao regulatora sinaptičke ravnoteže parvalbuminskih interneurona.

## 7. Literatura

- Aksic, M., Poleksic, J., Aleksic, D., Petronijevic, N., Radonjic, N. V., Jakovcevski, M., Kapor, S., Divac, N., Filipovic, B.R., Jakovcevski, I., 2021. Maternal Deprivation in Rats Decreases the Expression of Interneuron Markers in the Neocortex and Hippocampus. *Front. Neuroanat.* 15, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.670766>
- Aksić, M., Radonjić, N. V., Aleksić, D., Jevtić, G., Marković, B., Petronijević, N., Radonjić, V., Filipović, B., 2013. Long-term effects of the maternal deprivation on the volume and number of neurons in the rat neocortex and hippocampus. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 73, 394–403.
- Alkondon, M., Albuquerque, E.X., 2004. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog. Brain Res.* 145, 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)45007-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)45007-3)
- Alwis, D.S., Rajan, R., 2014. Environmental enrichment and the sensory brain: The role of enrichment in remediating brain injury. *Front. Syst. Neurosci.* 8, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00156>
- Andrews, M.R., Czvitkovich, S., Dassie, E., Vogelaar, C.F., Faissner, A., Blits, B., Gage, F.H., Ffrench-Constant, C., Fawcett, J.W., 2009.  $\alpha 9$  integrin promotes neurite outgrowth on tenascin-C and enhances sensory axon regeneration. *J. Neurosci.* 29, 5546–5557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0759-09.2009>
- Baidoe-Ansah, D., Mirzapourdelavar, H., Carceller, H., Pérez-rando, M., 2023. Depletion of neurocan in the prefrontal cortex impairs temporal order recognition , cognitive flexibility and perisomatic GABAergic innervation 1–29.
- Bandtlow, C. E., Zimmermann, D.R., 2000. Proteoglycans in the developing brain: New conceptual insights for old proteins. *Physiol. Rev.* 80, 1267–1290. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1267>
- Bandtlow, Christine E., Zimmermann, D.R., 2000. Proteoglycans in the developing brain: New conceptual insights for old proteins. *Physiol. Rev.* 80, 1267–1290. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1267>
- Bartsch, U., 1996. The extracellular matrix molecule tenascin-C: Expression in vivo and functional characterization in vitro. *Prog. Neurobiol.* 49, 145–161. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(96\)00014-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(96)00014-7)
- Baudin, A., Blot, K., Verney, C., Estevez, L., Santamaria, J., Gressens, P., Giros, B., Otani, S., Daugé, V., Naudon, L., 2012. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.* 98, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.08.004>
- Benke, T., 2014. What the dentate gyrus and the millennial in your basement have in common. *Epilepsy Curr.* 14, 152–154. <https://doi.org/10.5698/1535-7597-14.3.152>
- Bentall, R.P., Wickham, S., Shevlin, M., Varese, F., 2012. Do specific early-life adversities lead to specific symptoms of psychosis? a study from the 2007 the adult psychiatric morbidity survey. *Schizophr. Bull.* 38, 734–740. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs049>

- Bhagya, V., Sindhu, V.K., Mahati, K., Shankaranarayana, R.B.S., 2022. Exposure to an enriched environment promotes dendritic remodelling in hippocampal neurons affected by endogenous depression. *Indian J. Biochem. Biophys.* 59, 998–1005. <https://doi.org/10.56042/ijbb.v59i10.57620>
- Bijelić, D., Adžić, M., Perić, M., Jakovčevski, I., Förster, E., Schachner, M., Andjus, P.R., 2021. Different Functions of Recombinantly Expressed Domains of Tenascin-C in Glial Scar Formation. *Front. Immunol.* 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.624612>
- Bijelić, D., Adžić, M., Perić, M., Reiss, G., Milošević, M., Andjus, P.R., Jakovčevski, I., 2022. Tenascin-C fibronectin D domain is involved in the fine-tuning of glial response to CNS injury in vitro. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.952208>
- Bosiacki, M., Gaśowska-Dobrowolska, M., Kojder, K., Fabiańska, M., Jeżewski, D., Gutowska, I., Lubkowska, A., 2019. Perineuronal nets and their role in synaptic homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms20174108>
- Brodkey, J.A., Laywell, E.D., O'Brien, T.F., Faissner, A., Stefansson, K., Dörries, H.U., Schachner, M., Steindler, D.A., 1995. Focal brain injury and upregulation of a developmentally regulated extracellular matrix protein. *J. Neurosurg.* 82, 106–112. <https://doi.org/10.3171/jns.1995.82.1.0106>
- Brückner, G., Brauer, K., Härtig, W., Wolff, J.R., Rickmann, M.J., Derouiche, A., Delpech, B., Girard, N., Oertel, W.H., Reichenbach, A., Brockner, G., Brauer, K., Hart, W., Joachim Wolff, G.R., Rickma, M.J., Derouiche, A., Delpech, B., Girard, N., Oertel, W.H., Reichenbach, A., 1993. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8, 183–200. <https://doi.org/10.1002/glia.440080306>
- Brückner, G., Grosche, J., Schmidt, S., Härtig, W., Margolis, R.U., Delpech, B., Seidenbecher, C.I., Czaniera, R., Schachner, M., Brückner, G., Brückner, B., Grosche, J., Schmidt, S., Härtig, W., Härtig, H., Margolis, R.U., Delpech, B., Seidenbecher, C.I., Czaniera, R., Schachner, M., Brückner, G., Grosche, J., Schmidt, S., Härtig, W., Margolis, R.U., Delpech, B., Seidenbecher, C.I., Czaniera, R., Schachner, M., 2000. Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J. Comp. Neurol.* 428, 616–629. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001225\)428:4<616::AID-CNE3>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001225)428:4<616::AID-CNE3>3.0.CO;2-K)
- Cabungcal, J.H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T.K., Do, K.Q., 2013. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9130–9135. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300454110>
- Cao, W., Duan, J., Wang, X., Zhong, X., Hu, Z., Huang, F., Wang, H., Zhang, Juan, Li, F., Zhang, Jianyi, Luo, X., Li, C.Q., 2014. Early enriched environment induces an increased conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. *Behav. Brain Res.* 265, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.022>
- Carceller, H., Guirado, R., Ripolles-Campos, E., Teruel-Martí, V., Nacher, J., 2020a. Perineuronal Nets Regulate the Inhibitory Perisomatic Input onto Parvalbumin Interneurons and c Activity in the Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 40, 5008–5018.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0291-20.2020>

- Carceller, H., Guirado, R., Ripolles-Campos, E., Teruel-Marti, V., Nacher, J., 2020b. Perineuronal Nets Regulate the Inhibitory Perisomatic Input onto Parvalbumin Interneurons and  $\gamma$  Activity in the Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 40, 5008–5018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0291-20.2020>
- Carlén, M., 2017. What constitutes the prefrontal cortex? *Science (80-. )*. 358, 478–482. <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>
- Carstens, K.E., Alexander, G.M., Dudek, S.M., 2020. Modified adeno-associated virus targets the bacterial enzyme chondroitinase ABC to select mouse neuronal populations in vivo using the Cre-LoxP system 1–11. <https://doi.org/10.1111/ejn.15050>
- Carstens, K.E., Phillips, M.L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R.J., Dudek, S.M., 2016. Perineuronal nets suppress plasticity of excitatory synapses on CA2 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 36, 6312–6320. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016>
- Carulli, D., Broersen, R., de Winter, F., Muir, E.M., Meškovic, M., de Waal, M., de Vries, S., Boele, H.J., Canto, C.B., de Zeeuw, C.I., Verhaagen, J., 2020. Cerebellar plasticity and associative memories are controlled by perineuronal nets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 6855–6865. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916163117>
- Carulli, D., Rhodes, K.E., Fawcett, J.W., 2007. Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 501, 83–94. <https://doi.org/10.1002/cne.21231>
- Cattaud, V., Bezzina, C., Rey, C.C., Lejards, C., Dahan, L., Verret, L., 2018. Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of Alzheimer’s disease can be rescued by enriched environment. *Neurobiol. Aging* 72, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.08.024>
- Celio, M.R., Chiquet-Ehrismann, R., 1993. “Perineuronal nets” around cortical interneurons expressing parvalbumin are rich in tenascin. *Neurosci. Lett.* 162, 137–140. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90579-A](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90579-A)
- Celio, M.R., Spreafico, R., De Biasi, S., Vitellaro-Zuccarello, L., 1998. Perineuronal nets: Past and present. *Trends Neurosci.* 21, 510–515. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01298-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01298-3)
- Chapman, C.A., Nuwer, J.L., Jacob, T.C., 2022. The Yin and Yang of GABAergic and Glutamatergic Synaptic Plasticity: Opposites in Balance by Crosstalk Mechanisms. *Front. Synaptic Neurosci.* 14, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.911020>
- Chen, M., He, G., Li, Q., 2018. Maternal deprivation promotes hippocampal neuronal apoptosis via ERK1/2 signaling. *Front. Biosci. - Landmark* 23, 1923–1932. <https://doi.org/10.2741/4681>
- Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R.P., 2011. Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004960>

- Christensen, A.C., Lensjø, K.K., Lepperød, M.E., Dragly, S.A., Sutterud, H., Blackstad, J.S., Fyhn, M., Hafting, T., 2021. Perineuronal nets stabilize the grid cell network. *Nat. Commun.* 12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20241-w>
- Citri, A., Malenka, R.C., 2008. Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Cope, E.C., Zych, A.D., Katchur, N.J., Waters, R.C., Laham, B.J., Diethorn, E.J., Park, C.Y., Meara, W.R., Gould, E., 2022. Atypical perineuronal nets in the CA2 region interfere with social memory in a mouse model of social dysfunction. *Mol. Psychiatry* 27, 3520–3531. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01174-2>
- Coutens, B., Lejards, C., Bouisset, G., Verret, L., Rampon, C., Guiard, B.P., 2023. Enriched environmental exposure reduces the onset of action of the serotonin norepinephrin reuptake inhibitor venlafaxine through its effect on parvalbumin interneurons plasticity in mice. *Transl. Psychiatry* 13. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02519-x>
- Day, J.M., Olin, A.I., Murdoch, A.D., Canfield, A., Sasaki, T., Timpl, R., Hardingham, T.E., Aspberg, A., 2004. Alternative Splicing in the Aggrecan G3 Domain Influences Binding Interactions with Tenascin-C and Other Extracellular Matrix Proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 12511–12518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400242200>
- De Vivo, L., Landi, S., Panniello, M., Baroncelli, L., Chierzi, S., Mariotti, L., Spolidoro, M., Pizzorusso, T., Maffei, L., Ratto, G.M., 2013. Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of dendritic spines in the adult visual cortex. *Nat. Commun.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms2491>
- De Winter, F., Kwok, J.C.F., Fawcett, J.W., Vo, T.T., Carulli, D., Verhaagen, J., 2016. The Chemorepulsive Protein Semaphorin 3A and Perineuronal Net-Mediated Plasticity. *Neural Plast.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3679545>
- Dityatev, A., Rusakov, D.A., 2011. Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.12.006>
- 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 Rep.* 29, 1099–1112.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.044>
- Dzyubenko, E., Manrique-Castano, D., Kleinschnitz, C., Faissner, A., Hermann, D.M., 2018. Topological remodeling of cortical perineuronal nets in focal cerebral ischemia and mild hypoperfusion. *Matrix Biol.* 74, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.08.001>
- Dzyubenko, E., Manrique-Castano, D., Pillath-Eilers, M., Vasileiadou, P., Reinhard, J., Faissner, A., Hermann, D.M., 2022. Tenascin-C restricts reactive astrogliosis in the ischemic brain. *Matrix Biol.* 110, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2022.04.003>
- Edmiston, E.E., 2011. Corticostriatal-Limbic Gray Matter Morphology in Adolescents With Self-reported Exposure to Childhood Maltreatment. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 165, 1069. <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2011.565>
- Eiland, L., McEwen, B.S., 2012. Early life stress followed by subsequent adult chronic stress



- potentiates anxiety and blunts hippocampal structural remodeling. *Hippocampus* 22, 82–91. <https://doi.org/10.1002/hipo.20862>
- Ellenbroek, B.A., De Bruin, N.M.W.J., Van Den Kroonenburg, P.T.J.M., Van Luijtelaar, E.L.J.M., Cools, A.R., 2004. The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult wistar rats. *Biol. Psychiatry* 55, 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.024>
- Ellenbroek, B.A., Peter T.J.M. van den Kroonenberg, A.R.C., 1998. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats Bart. *Schizophr. Res.* 30, 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(99\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(99)00080-8)
- Elston, G.N., Oga, T., Fujita, I., 2009. Spinogenesis and Pruning Scales across Functional Hierarchies. *J. Neurosci.* 29, 3271–3275. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5216-08.2009>
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Evers, M.R., Salmen, B., Bukalo, O., Rollenhagen, A., Bösl, M.R., Morellini, F., Bartsch, U., Dityatev, A., Schachner, M., 2002. Impairment of L-type Ca<sup>2+</sup> Channel-Dependent Forms of Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice Deficient in the Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-C. *J. Neurosci.* 22, 7177–7194. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-16-07177.2002>
- Faissner, A., Roll, L., Theocharidis, U., 2017. Tenascin-C in the matrisome of neural stem and progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 81, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.11.003>
- Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C.M., Sánchez-Aguilera, A., Mantoan, L., Maeso, P., Fernandes, C., Ewers, H., Rico, B., 2017. Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron* 95, 639–655.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.028>
- Felleman, D.J., Van Essen, D.C., 1991. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 1, 1–47.
- Fenoglio, K.A., Brunson, K.L., Baram, T.Z., 2006. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: Functional and molecular aspects. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.001>
- Ferguson, B.R., Gao, W.J., 2018. Pv interneurons: critical regulators of E/I balance for prefrontal cortex-dependent behavior and psychiatric disorders. *Front. Neural Circuits* 12, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00037>
- Ferhat, L., au Louis, N.C., Jorquera, I., Niquet, J., Khrestchatisky, M., Ben-Ari, Y., Represa, A., 1996a. Transient increase of tenascin-C in immature hippocampus: astroglial and neuronal expression. *J. Neurocytol.* 25, 53–66. <https://doi.org/10.1007/BF02284785>
- Ferhat, L., Chevassus-Au-Louis, N., Khrestchatisky, M., Ben-Ari, Y., Represa, A., 1996b. Seizures induce tenascin-C mRNA expression in neurons. *J. Neurocytol.* 25, 535–546. <https://doi.org/10.1007/bf02284821>

- Ferle, V., Repouskou, A., Aspiotis, G., Raftogianni, A., Chrousos, G., Stylianopoulou, F., Stamatakis, A., 2020. Synergistic effects of early life mild adversity and chronic social defeat on rat brain microglia and cytokines. *Physiol. Behav.* 215, 112791. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112791>
- Filipovic, B.R., Djurovic, B., Marinkovic, S., Stijak, L., Aksic, M., Nikolic, V., Starcevic, A., Radonjic, V., 2011. Volume changes of corpus striatum, thalamus, hippocampus and lateral ventricles in posttraumatic stress disorder (PTSD) patients suffering from headaches and without therapy. *Zentralbl. Neurochir.* 72, 133–137. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253349>
- Foscarin, S., Ponchione, D., Pajaj, E., Leto, K., Gawlak, M., Wilczynski, G.M., Rossi, F., Carulli, D., Grzegorz, M., Rossi, F., Carulli, D., Wilczynski, G.M., Rossi, F., Carulli, D., 2011. Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016666>
- Freitas, A., Aroso, M., Rocha, S., Ferreira, R., Vitorino, R., Gomez-Lazaro, M., 2021. Bioinformatic analysis of the human brain extracellular matrix proteome in neurodegenerative disorders. *Eur. J. Neurosci.* 53, 4016–4033. <https://doi.org/10.1111/ejn.15316>
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C.I., Choquet, D., Gundelfinger, E.D., 2009. Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 12, 897–904. <https://doi.org/10.1038/nn.2338>
- Fukamauchi, F., Mataga, N., Wang, Y.J., Sato, S., Yoshiki, A., Kusakabe, M., 1996. Abnormal behavior and neurotransmissions of tenascin gene knockout mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 151–156. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0561>
- Galtrey, C.M., Kwok, J.C.F., Carulli, D., Rhodes, K.E., Fawcett, J.W., 2008. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1373–1390. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06108.x>
- Gergues, M.M., Han, K.J., Choi, H.S., Brown, B., Clausing, K.J., Turner, V.S., Vainchtein, I.D., Molofsky, A. V., Kheirbek, M.A., 2020. Circuit and molecular architecture of a ventral hippocampal network. *Nat. Neurosci.* 23, 1444–1452. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0705-8>
- Gildawie, K.R., Honeycutt, J.A., Brenhouse, H.C., 2020. Region-specific Effects of Maternal Separation on Perineuronal Net and Parvalbumin-expressing Interneuron Formation in Male and Female Rats. *Neuroscience* 428, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.12.010>
- Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., Herry, C., 2009. Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science (80-. )*. 325, 1258–1261. <https://doi.org/10.1126/science.1174146>
- Golgi, C., 1898. Intorno alla struttura della cellula nervosa, in: *Bollettino Della Società Medico-Chirurgica Di Pavia*. pp. 13:1-14.
- Gorka, A.X., Hanson, J.L., Radtke, S.R., Hariri, A.R., 2014. Reduced hippocampal and medial

- prefrontal gray matter mediate the association between reported childhood maltreatment and trait anxiety in adulthood and predict sensitivity to future life stress. *Biol. Mood Anxiety Disord.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1186/2045-5380-4-12>
- Gottschling, C., Wegrzyn, D., Denecke, B., Faissner, A., Morphology, C., Neurobiology, M., 2019. Elimination of the four extracellular matrix molecules tenascin-C , tenascin-R , brevican and neurocan alters the ratio of excitatory and inhibitory synapses Authors : *Sci. Rep.* 9, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50404-9>
- Grahamm, B., Sutsuridiss, V., Cobb, S., Vida, I., 2018. Hippocampal Microcircuits, A Computational Modeler’s Resource Book.
- Green, M.K., Rani, C.S.S., Joshi, A., Soto-Piña, A.E., Martinez, P.A., Frazer, A., Strong, R., Morilak, D.A., 2011. Prenatal stress induces long term stress vulnerability, compromising stress response systems in the brain and impairing extinction of conditioned fear after adult stress. *Neuroscience* 192, 438–451. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.06.041>
- Grumet, M., Milev, P., Sakurai, T., Karthikeyan, L., Bourdon, M., Margolis, R.K., Margolis, R.U., 1994. Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *J. Biol. Chem.* 269, 12142–12146. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32692-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32692-3)
- Guadagno, A., Verlezza, S., Long, H., Wong, T.P., Walker, C.-D.D., 2020. It Is All in the Right Amygdala: Increased Synaptic Plasticity and Perineuronal Nets in Male, But Not Female, Juvenile Rat Pups after Exposure to Early-Life Stress. *J. Neurosci.* 40, 8276–8291. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1029-20.2020>
- Gualtieri, F., Brégère, C., Laws, G.C., Armstrong, E.A., Wylie, N.J., Moxham, T.T., Guzman, R., Boswell, T., Smulders, T. V., 2017. Effects of environmental enrichment on doublecortin and BDNF expression along the dorso-ventral axis of the dentate gyrus. *Front. Neurosci.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00488>
- Gurevicius, K., Kuang, F., Stoenica, L., Irintchev, A., Gureviciene, I., Dityatev, A., Schachner, M., Tanila, H., 2009. Genetic ablation of tenascin-C expression leads to abnormal hippocampal CA1 structure and electrical activity in vivo. *Hippocampus* 19, 1232–1246. <https://doi.org/10.1002/hipo.20585>
- Gustafsson, M.G.L., 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy 198, 82–87.
- Haglund, L., Swanson, L.W., Köhler, C., 1984. The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: An immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *J. Comp. Neurol.* 229, 171–185. <https://doi.org/10.1002/cne.902290204>
- Han, Y., Yuan, M., Guo, Y.S., Shen, X.Y., Gao, Z.K., Bi, X., 2022. The role of enriched environment in neural development and repair. *Front. Cell. Neurosci.* 16, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.890666>
- Harland, B.C., Dalrymple-Alford, J.C., 2020. Enriched Environment Procedures for Rodents: Creating a Standardized Protocol for Diverse Enrichment to Improve Consistency across

- Research Studies. *Bio-protocol* 10, 1–19. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3637>
- Hebb, D.O., 1949. *The Organization of Behavior, A Neuropsychological Theory*. Lawrence Erlbaum Associates.
- Heidbreder, C.A., Groenewegen, H.J., 2003. The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 555–579. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003>
- Hitti, F.L., Siegelbaum, S.A., 2014. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 508, 88–92. <https://doi.org/10.1038/nature13028>
- Hjorth-Simonsen, A., 1973. Some intrinsic connections of the hippocampus in the rat: An experimental analysis. *J. Comp. Neurol.* 147, 145–161. <https://doi.org/10.1002/cne.901470202>
- Hjorth, A., Jeune, B., 1972. Origin and Termination of the Hippocampal Perforant Path in the Rat Studied by Silver Impregnation. *J Comp Neurol* 144, 215–232.
- Holland, F.H., Ganguly, P., Potter, D.N., Chartoff, E.H., Brenhouse, H.C., 2014. Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. *Neurosci. Lett.* 566, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.02.023>
- Hoover, W.B., Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212, 149–179. <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>
- Infurna, M.R., Brunner, R., Holz, B., Parzer, P., Giannone, F., Reichl, C., Fischer, G., Resch, F., Kaess, M., 2016. The specific role of childhood abuse, parental bonding, and family functioning in female adolescents with borderline personality disorder. *J. Pers. Disord.* 30, 177–192. [https://doi.org/10.1521/pedi\\_2015\\_29\\_186](https://doi.org/10.1521/pedi_2015_29_186)
- Ippolito, D.M., Eroglu, C., 2010. Quantifying synapses: An immunocytochemistry-based assay to quantify synapse number. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/2270>
- Irintchev, A., Rollenhagen, A., Troncoso, E., Kiss, J.Z., Schachner, M., 2005. Structural and Functional Aberrations in the Cerebral Cortex of Tenascin-C Deficient Mice. *Cereb. Cortex* 15, 950–962. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh195>
- Jay, T.M., Burette, F., Laroche, S., 1996. Plasticity of the hippocampal-prefrontal cortex synapses. *J. Physiol. Paris* 90, 361–366. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(97\)87920-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(97)87920-X)
- Joester, A., Faissner, A., 2001. The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol.* 20, 13–22. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00136-0)
- Kawaguchi, Y., Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C.W., Hama, K., 1987. Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res.* 416, 369–374. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90921-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90921-8)
- Kawaguchi, Y., Kubota, Y., 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7, 476–486. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.6.476>

- Kesner, R.P., Lee, I., Gilbert, P., 2004. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev. Neurosci.* 15, 333–351.  
<https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2004.15.5.333>
- Klausberger, T., Magill, P.J., Cobden, P.M., Somogyi, P., 2003. Firing of Hippocampal Interneurons in Vivo. *Nature* 421.
- Kobayashi, S., Ohashi, Y., Ando, S., 2002. Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams maze task. *J. Neurosci. Res.* 70, 340–346.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.10442>
- Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A.J., Jung, H.Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., Wickersham, I.R., Tonegawa, S., 2014. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat. Neurosci.* 17, 269–279.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3614>
- Kolb, B., 1984. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Res.* 320, 65–98.
- Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Li, Y., Frost, D.O., Gibb, R., 2012. Experience and the developing prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 17186–17193.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1121251109>
- Küffner, M., 2013. Ultrastructural analysis of spine apparatus in CA3 pyramidal neurons following single cell electroporation in Synaptopodin Knockout - mice. “L.
- Kwok, J.C.F., Carulli, D., Fawcett, J.W., 2010. In vitro modeling of perineuronal nets: Hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *J. Neurochem.* 114, 1447–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06878.x>
- Kwok, J.C.F., Dick, G., Wang, D., Fawcett, J.W., 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev. Neurobiol.* 71, 1073–1089. <https://doi.org/10.1002/dneu.20974>
- Le Roux, N., Amar, M., Moreau, A., Baux, G., Fossier, P., 2008. Impaired GABAergic transmission disrupts normal homeostatic plasticity in rat cortical networks. *Eur. J. Neurosci.* 27, 3244–3256. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06288.x>
- Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., Huganir, R.L., 2000. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405, 955–959. <https://doi.org/10.1038/35016089>
- Levy, C., Brooks, J.M., Chen, J., Su, J., Fox, M.A., 2015. Cell-specific and developmental expression of lectican-cleaving proteases in mouse hippocampus and neocortex. *J. Comp. Neurol.* 523, 629–648. <https://doi.org/10.1002/cne.23701>
- Li, X. -G, Somogyi, P., Ylinen, A., Buzsáki, G., 1994. The hippocampal CA3 network: An in vivo intracellular labeling study. *J. Comp. Neurol.* 339, 181–208.  
<https://doi.org/10.1002/cne.903390204>
- Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., Hernández, F., 2015. Novel connection between newborn granule neurons and the hippocampal CA2 field. *Exp. Neurol.* 263, 285–292.

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.10.021>

- Loisy, M., Farah, A., Fafouri, A., Fanton, A., Ahmadi, M., Therreau, L., Chevaleyre, V., Piskorowski, R.A., 2023. Environmental enrichment and social isolation modulate inhibitory transmission and plasticity in hippocampal area CA2. *Hippocampus* 33, 197–207. <https://doi.org/10.1002/hipo.23478>
- Lundell, A., Olin, A.I., Mörgelin, M., Al-Karadaghi, S., Aspberg, A., Logan, D.T., 2004. Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: Evidence for a crosslinking role for tenascins. *Structure* 12, 1495–1506. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.05.021>
- Lupori, L., Totaro, V., Cornuti, S., Ciampi, L., Carrara, F., Grilli, E., Viglione, A., Tozzi, F., Putignano, E., Mazziotti, R., Amato, G., Gennaro, C., Tognini, P., Pizzorusso, T., 2023. A comprehensive atlas of perineuronal net distribution and colocalization with parvalbumin in the adult mouse brain. *Cell Rep.* 42, 112788. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112788>
- Mackie, E.J., Tucker, R.P., 1999. The tenascin-C knockout revisited. *J. Cell Sci.* 112, 3847–3853. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.22.3847>
- Madinier, A., Quattromani, M.J., Sjölund, C., Ruscher, K., Wieloch, T., Madinier, A., Quattromani, M.J., Sjölund, C., Ruscher, K., Wieloch, T., 2014. Enriched Housing Enhances Recovery of Limb Placement Ability and Reduces AggreCAN-Containing Perineuronal Nets in the Rat Somatosensory Cortex after Experimental Stroke. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093121>
- Manno, F.A.M., Kumar, R., An, Z., Khan, M.S., Su, J., Liu, J., Wu, E.X., He, J., Feng, Y., Lau, C., 2022. Structural and Functional Hippocampal Correlations in Environmental Enrichment During the Adolescent to Adulthood Transition in Mice. *Front. Syst. Neurosci.* 15, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2021.807297>
- Manrique-Castano, D., Dzyubenko, E., Borbor, M., Vasileiadou, P., Kleinschnitz, C., Roll, L., Faissner, A., Hermann, D.M., 2021. Tenascin-C preserves microglia surveillance and restricts leukocyte and, more specifically, T cell infiltration of the ischemic brain. *Brain. Behav. Immun.* 91, 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.016>
- Marco, E.M., Llorente, R., López-Gallardo, M., Mela, V., Llorente-Berzal, Á., Prada, C., Viveros, M.-P., 2015. The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 51, 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.015>
- Marco, E.M., Valero, M., De La Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., Ramirez, M.J., Viveros, M.P., 2013. Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. *Neuropharmacology* 68, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.08.014>
- Mauney, S.A., Athanas, K.M., Pantazopoulos, H., Shaskan, N., Passeri, E., Berretta, S., Woo, T.U.W., 2013. Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 74, 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.007>
- Maurel, P., Rauch, U., Flad, M., Margolis, R.K., Margolis, R.U., 1994. Phosphacan, a

- chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2512–2516. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2512>
- Maynard, T.M., Sikich, L., Lieberman, J.A., LaMantia, A.S., 2001. Neural development, cell-cell signaling, and the “two-hit” hypothesis of schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 27, 457–476. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a006887>
- McEwen, B.S., Morrison, J.H., 2013. The Brain on Stress: Vulnerability and Plasticity of the Prefrontal Cortex over the Life Course. *Neuron* 79, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.028>
- McEwen, B.S., Weiss, J.M., Schwartz, L.S., 1968. Selective Retention of Corticosterone. *Nature* 220, 911–912.
- Midwood, K.S., Chiquet, M., Tucker, R.P., Orend, G., 2016. Tenascin-C at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 4321–4327. <https://doi.org/10.1242/jcs.190546>
- Miragaia, A.S., de Oliveira Wertheimer, G.S., Consoli, A.C., Cabbia, R., Longo, B.M., Girardi, C.E.N., Suchecki, D., 2018. Maternal deprivation increases anxiety-and depressive-like behaviors in an age-dependent fashion and reduces neuropeptide y expression in the amygdala and hippocampus of male and female young adult rats. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00159>
- Momčilović, M., Stamenković, V., Jovanović, M., Andjus, P.R., Jakovčevski, I., Schachner, M., Miljković, Đ., 2017. Tenascin-C deficiency protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 302, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.12.001>
- Morawski, M., Brückner, M.K., Riederer, P., Brückner, G., Arendt, T., 2004. Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp. Neurol.* 188, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.04.017>
- Morawski, M., Dityatev, A., Hartlage-Rübsamen, M., Blosa, M., Holzer, M., Flach, K., Pavlica, S., Dityateva, G., Dityateva, G., Brückner, G., Schachner, M., 2014. Tenascin-R promotes assembly of the extracellular matrix of perineuronal nets via clustering of aggrecan. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0046>
- Moreno-Jiménez, E.P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., Llorens-Martín, M., 2019. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer’s disease. *Nat. Med.* 25, 554–560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>
- Moser, M.B., Moser, E.I., 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608–619. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)
- Mouw, J.K., Ou, G., Weaver, V.M., 2014a. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>
- Mouw, J.K., Ou, G., Weaver, V.M., 2014b. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>



- Muhammad, A., Kolb, B., 2011. Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. *Behav. Brain Res.* 223, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.015>
- Mukhopadhyay, S., Chatterjee, A., Tiwari, P., Ghai, U., Vaidya, V.A., 2021. Postnatal fluoxetine treatment alters perineuronal net formation and maintenance in the hippocampus. *eNeuro* 8. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0424-20.2021>
- Murthy, S., Kane, G.A., Katchur, N.J., Lara Mejia, P.S., Obiofuma, G., Buschman, T.J., McEwen, B.S., Gould, E., 2019. Perineuronal Nets, Inhibitory Interneurons, and Anxiety-Related Ventral Hippocampal Neuronal Oscillations Are Altered by Early Life Adversity. *Biol. Psychiatry* 85, 1011–1020. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.02.021>
- Nakamura, H., Kobayashi, S., Ohashi, Y., Ando, S., 1999. Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *J. Neurosci. Res.* 56, 307–315. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990501\)56:3<307::AID-JNR10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990501)56:3<307::AID-JNR10>3.0.CO;2-3)
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., Svoboda, K., 2002. Structure and Function of Dendritic Spines. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 313–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008>
- Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrn1970>
- Novak, U., Kaye, A.H., 2000. Extracellular matrix and the brain: Components and function. *J. Clin. Neurosci.* 7, 280–290. <https://doi.org/10.1054/jocn.1999.0212>
- O'Connor, A.M., Burton, T.J., Mansuri, H., Hand, G.R., Leamey, C.A., Sawatari, A., 2019. Environmental Enrichment From Birth Impacts Parvalbumin Expressing Cells and Wisteria Floribunda Agglutinin Labelled Peri-Neuronal Nets Within the Developing Murine Striatum. *Front. Neuroanat.* 13, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00090>
- Ohashi, T., Edamatsu, M., Bekku, Y., Carulli, D., 2015. The hyaluronan and proteoglycan link proteins: Organizers of the brain extracellular matrix and key molecules for neuronal function and plasticity. *Exp. Neurol.* 274, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.09.010>
- Page, C.E., Coutellier, L., 2018. Adolescent Stress Disrupts the Maturation of Anxiety-related Behaviors and Alters the Developmental Trajectory of the Prefrontal Cortex in a Sex- and Age-specific Manner. *Neuroscience* 390, 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.030>
- Pamidi, N., Yap, C.G., Nayak, S., 2022. Environmental enrichment preserves hippocampal neurons in diabetes and stressed rats. *Histol. Histopathol.* 37, 385–395. <https://doi.org/10.14670/HH-18-418>
- Perez-Rando, M., Carceller, H., Castillo-Gomez, E., Bueno-Fernandez, C., García-Mompó, C., Gilabert-Juan, J., Guirado, R., Pesarico, A.P., Nacher, J., 2022. Impact of stress on inhibitory neuronal circuits, our tribute to Bruce McEwen. *Neurobiol. Stress* 19. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2022.100460>

- Petanjek, Z., Judaš, M., Šimić, G., Rašin, M.R., Uylings, H.B.M., Rakic, P., Kostović, I., 2011. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13281–13286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105108108>
- Pinel, J.P.J., Barnes, S.J., 2018. *Biopsychology*, AQA Psychology. Pearson Education. <https://doi.org/10.4324/9781315692334-13>
- Pizzorusso, T., 2002. Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science (80- )*. 298, 1248–1251. <https://doi.org/10.1126/science.1072699>
- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J.W., Maffei, L., 2002. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science (80- )*. 298, 1248–1251. <https://doi.org/10.1126/science.1072699>
- Poleksic, J., Aksic, M., Kapor, S., Aleksic, D., Stojkovic, T., Radovic, M., Djulejic, V., Markovic, B., Stamatakis, A., 2021. Effects of Maternal Deprivation on the Prefrontal Cortex of Male Rats: Cellular, Neurochemical, and Behavioral Outcomes. *Front. Behav. Neurosci.* 15, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.666547>
- Pothuizen, H.H.J., 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, 705–712. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03170.x>
- Pouille, F., Scanziani, M., 2001. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science (80- )*. 293, 1159–1163. <https://doi.org/10.1126/science.1060342>
- Praag, H. Van, Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. NEURAL CONSEQUENCES OF ENVIRONMENTAL ENRICHMENT 1, 1–8.
- Prakash, Y.S., Smithson, K.G., Sieck, G.C., 1994. Application of the Cavalieri Principle in Volume Estimation Using Laser Confocal Microscopy. *Neuroimage* 1, 325–333. <https://doi.org/10.1006/nimg.1994.1017>
- Qian, J., Noebels, J.L., 2001. Presynaptic CA2+ channels and neurotransmitter release at the terminal of a mouse cortical neuron. *J. Neurosci.* 21, 3721–3728. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-11-03721.2001>
- Radonjic, Veselin, Malobabic, S., Radonjic, Vidosava, Puskas, L., Stijak, L., Aksic, M., Filipovic, B., 2014. Hippocampus: Why is it studied so frequently? *Vojnosanit. Pregl.* 71, 195–201. <https://doi.org/10.2298/VSP130222043R>
- Rebola, N., Carta, M., Mulle, C., 2017. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: Implications for memory encoding. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 209–221. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.10>
- Rhodes, K.E., Fawcett, J.W., 2004. Chondroitin sulphate proteoglycans: Preventing plasticity or protecting the CNS? *J. Anat.* 204, 33–48. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2004.00261.x>
- Richardson, R., Bowers, J., Callaghan, B.L., Baker, K.D., 2021. Does maternal separation accelerate maturation of perineuronal nets and parvalbumin-containing inhibitory

- interneurons in male and female rats? *Dev. Cogn. Neurosci.* 47, 100905.  
<https://doi.org/10.1016/j.dcn.2020.100905>
- Riga, D., Kramvis, I., Koskinen, M.K., van Bokhoven, P., van der Harst, J.E., Heistek, T.S., Jaap Timmerman, A., van Nierop, P., van der Schors, R.C., Pieneman, A.W., de Weger, A., van Mourik, Y., Schoffemeer, A.N.M., Mansvelter, H.D., Meredith, R.M., Hoogendijk, W.J.G., Smit, A.B., Spijker, S., 2017. Hippocampal extracellular matrix alterations contribute to cognitive impairment associated with a chronic depressive-like state in rats. *Sci. Transl. Med.* 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai8753>
- Rigato, F., Garwood, J., Calco, V., Heck, N., Faivre-Sarrailh, C., Faissner, A., 2002. Tenascin-C Promotes Neurite Outgrowth of Embryonic Hippocampal Neurons through the Alternatively Spliced Fibronectin Type III BD Domains via Activation of the Cell Adhesion Molecule F3/Contactin. *J. Neurosci.* 22, 6596–6609.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06596.2002>
- Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrews, M.R., Horner, A.E., Spillantini, M.G., Bussey, T.J., Fawcett, J.W., Pizzorusso, T., Saksida, L.M., 2013. Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *J. Neurosci.* 33, 7057–7065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6267-11.2013>
- Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., Hebert, M., Morimoto, H., 1978. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res.* 153, 563–576.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90340-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90340-2)
- Rowlands, D., Lensjø, K.K., Dinh, T., Yang, S., Andrews, M.R., Hafting, T., Fyhn, M., Fawcett, J.W., Dick, G., 2018a. Aggrecan directs extracellular matrix-mediated neuronal plasticity. *J. Neurosci.* 38, 10102–10113. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1122-18.2018>
- Rowlands, D., Lensjø, K.K., Dinh, T., Yang, S., Andrews, M.R., Hafting, T., Fyhn, M., Fawcett, J.W., Dick, G., 2018b. Aggrecan directs extracellular matrix-mediated neuronal plasticity. *J. Neurosci.* 38, 10102–10113. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1122-18.2018>
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S.H., Hjerling-Leffler, J., 2011. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 45–61.  
<https://doi.org/10.1002/dneu.20853>
- Ruoslahti, E., 1996. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* 6, 489–492.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/6.5.489>
- Sakairi, H., Kamikubo, Y., Abe, M., Ikeda, K., Ichiki, A., Tabata, T., Kano, M., Sakurai, T., 2020. G Protein-Coupled Glutamate and GABA Receptors Form Complexes and Mutually Modulate Their Signals. *ACS Chem. Neurosci.* 11, 567–578.  
<https://doi.org/10.1021/acchemneuro.9b00599>
- Sale, A., Berardi, N., Maffei, L., 2014. Environment and brain plasticity: Towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiol. Rev.* 94, 189–234.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2012>
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., Leonhardt, H., 2010. A guide to super-resolution fluorescence microscopy 190, 165–175. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002018>

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 9(7):676-82. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schloesser, R.J., Lehmann, M., Martinowich, K., Manji, H.K., Herkenham, M., 2010. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol. Psychiatry* 15, 1152–1163. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.34>
- Schnapp, L.M., Hatch, N., Ramos, D.M., Klimanskaya, I. V., Sheppard, D., Pytela, R., 1995. The human integrin  $\alpha 8 \beta 1$  functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *J. Biol. Chem.* 270, 23196–23202. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.39.23196>
- Seidel, K., Poeggel, G., Holetschka, R., Helmeke, C., Braun, K., 2011. Paternal deprivation affects the development of corticotrophin-releasing factor-expressing neurones in prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of the biparental Octodon degus. *J. Neuroendocrinol.* 23, 1166–1176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02208.x>
- Šekeljčić, V., Andjus, P.R., 2012. Tenascin-C and its functions in neuronal plasticity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 825–829. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.014>
- Shapiro, M.L., Riceberg, J.S., Seip-cammack, K., Guise, K.G., 2014. Functional Interactions of Prefrontal Cortex and the Hippocampus in Learning and Memory, in: Space, Time and Memory in the Hippocampal Formation. pp. 517–560. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1292-2>
- Sieveritz, B., Duke, S.H., Arbuthnott, W.G., Wickens, J.R., 2022. Ventral motor thalamic input to prelimbic cortex mediates cost-benefit decision-making in rats. *bioRxiv* 2003–2005.
- Simpson, J., Kelly, J.P., 2011. The impact of environmental enrichment in laboratory rats- Behavioural and neurochemical aspects. *Behav. Brain Res.* 222, 246–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.002>
- Slaker, M., Barnes, J., Sorg, B.A., Grimm, J.W., 2016a. Impact of environmental enrichment on perineuronal nets in the prefrontal cortex following early and late abstinence from sucrose self-administration in rats. *PLoS One* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168256>
- Slaker, M., Barnes, J., Sorg, B.A., Grimm, J.W., 2016b. Impact of environmental enrichment on perineuronal nets in the prefrontal cortex following early and late abstinence from sucrose self-administration in rats. *PLoS One* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168256>
- Soares, A.R., Gildawie, K.R., Honeycutt, J.A., Brenhouse, H.C., 2020. Region-specific effects of maternal separation on oxidative stress accumulation in parvalbumin neurons of male and female rats. *Behav. Brain Res.* 388, 112658. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112658>
- Soleman, S., Filippov, M.A., Dityatev, A., Fawcett, J.W., 2013. Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders. *Neuroscience* 253, 194–213. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.050>
- Soma, S., Ohara, S., Nonomura, S., Suematsu, N., Yoshida, J., Pastalkova, E., Sakai, Y., Tsutsui,

- K.I., Isomura, Y., 2023. Rat hippocampal CA1 region represents learning-related action and reward events with shorter latency than the lateral entorhinal cortex. *Commun. Biol.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04958-0>
- Spencer, R.L., Bland, S.T., 2019. Hippocampus and hippocampal neurons. *Stress Physiol. Biochem. Pathol. Handb. Stress Ser. Vol. 3* 57–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00005-9>
- Stamenkovic, V., Stamenkovic, S., Jaworski, T., Gawlak, M., Jovanovic, M., Jakovcevski, I., Wilczynski, G.M., Kaczmarek, L., Schachner, M., Radenovic, L., Andjus, P.R., 2017a. The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C and matrix metalloproteinases modify cerebellar structural plasticity by exposure to an enriched environment. *Brain Struct. Funct.* 222, 393–415. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1224-y>
- Stamenkovic, V.; Milenkovic, I.; Galjak, N.; Todorovic, V.; Andjus, P. Enriched Environment Alters the Behavioral Profile of Tenascin-C Deficient Mice. *Behav. Brain Res.* 2017, 331, 241–253. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.047>
- Suttkus, A., Holzer, M., Morawski, M., Arendt, T., 2016. The neuronal extracellular matrix restricts distribution and internalization of aggregated tau-protein. *Neuroscience* 313, 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.040>
- Taupin, P., 2007. Neurotransmission and plasticity the hippocampus - in the nervous system. Nova Science Publishers, New York.
- Terreberry, R.R., Neafsey, E.J., 1983. Rat medial frontal cortex: a visceral motor region with a direct projection to the solitary nucleus. *Brain Res.* 278, 245–249. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90246-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90246-9)
- Theodosis, D.T., Pierre, K., Cadoret, M.A., Allard, M., Faissner, A., Poulain, D.A., 1997. Expression of high levels of the extracellular matrix glycoprotein, tenascin-C, in the normal adult hypothalamoneurohypophysial system. *J. Comp. Neurol.* 379, 386–398. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970317\)379:3<386::aid-cne5>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970317)379:3<386::aid-cne5>3.0.co;2-%23)
- Thompson, E.H., Lensjø, K.K., Wigestrang, M.B., Malthe-Sørensen, A., Hafting, T., Fyhn, M., 2018. Removal of perineuronal nets disrupts recall of a remote fear memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 607–612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713530115>
- Travaglia, A., Steinmetz, A.B., Miranda, J.M., Alberini, C.M., 2018. Mechanisms of critical period in the hippocampus underlie object location learning and memory in infant rats. *Learn. Mem.* 25, 176–182. <https://doi.org/10.1101/lm.046946.117>
- Trévia, N., Almeida, I.N.F., Oliveira, P.S., Warwick, L. V., Marques, V., dos Santos, D.C., Paulo, D.C., Viegas, M.L., Picanço-Diniz, C.W., 2011. Enriched environment contributes to recovery of visual acuity and increases perineuronal nets in monocular-deprived animals. *Psychol. Neurosci.* 4, 49–56. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2011.1.006>
- Tucić, M., Stamenković, V., Andjus, P., 2021. The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin C and Adult Neurogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.674199>
- Tynan, R.J., Beynon, S.B., Hinwood, M., Johnson, S.J., Nilsson, M., Woods, J.J., Walker, F.R.,

2013. Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol.* 126, 75–91. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1102-0>
- Ulbrich, P., Khoshneviszadeh, M., Jandke, S., Schreiber, S., Dityatev, A., 2021. Interplay between perivascular and perineuronal extracellular matrix remodelling in neurological and psychiatric diseases. *Eur. J. Neurosci.* 53, 3811–3830. <https://doi.org/10.1111/ejn.14887>
- Underwood, M.D., Bakalian, M.J., Escobar, T., Kassir, S., Mann, J.J., Arango, V., 2019. Early-life adversity, but not suicide, is associated with less prefrontal cortex gray matter in adulthood. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 22, 349–357. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyz013>
- Uylings, H.B., van Eden, C.G., de Bruin, J.P., Corner, M.A., Feenstra, M.G., 1990. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *prefrontal cortex its Struct. Funct. Pathol.* 85, 31–62.
- Uylings, H.B.M.M., Groenewegen, H.J., Kolb, B., 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* 146, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028>
- Valero, M., de la Prida, L.M., 2018. The hippocampus in depth: a sublayer-specific perspective of entorhinal–hippocampal function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 52, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.013>
- Van't Spijker, H.M., Rowlands, D., Rossier, J., Haenzi, B., Fawcett, J.W., Kwok, J.C.F., 2019. Neuronal Pentraxin 2 Binds PNNs and Enhances PNN Formation. *Neural Plast.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6804575>
- Vedunova, M., Sakharnova, T., Mitroshina, E., Perminova, M., Pimashkin, A., Zakharov, Y., Dityatev, A., Mukhina, I., 2013. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00149>
- Viana Di Prisco, G., Vertes, R.P., 2006. Excitatory actions of the ventral midline thalamus (rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60, 45–55. <https://doi.org/10.1002/syn.20271>
- Vitellaro-Zuccarello, L., De Biasi, S., Spreafico, R., 1998. One hundred years of Golgi's "perineuronal net": History of a denied structure. *Ital. J. Neurol. Sci.* 19, 249–253. <https://doi.org/10.1007/BF02427613>
- Wang, D., Fawcett, J., 2012. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res.* 349, 147–160. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1375-y>
- Wang, H., Xu, X.X., Xu, X.X., Gao, J., Zhang, T., 2020. Enriched Environment and Social Isolation Affect Cognition Ability via Altering Excitatory and Inhibitory Synaptic Density in Mice Hippocampus. *Neurochem. Res.* 45, 2417–2432. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03102-2>
- Wang, R., Wang, W., Xu, J., Liu, D., Wu, H., Qin, X., Jiang, H., Pan, F., 2020. Jmjd3 is involved in the susceptibility to depression induced by maternal separation via enhancing the neuroinflammation in the prefrontal cortex and hippocampus of male rats. *Exp. Neurol.* 328, 113254. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113254>

- Wen, T.H., Afroz, S., Reinhard, S.M., Palacios, A.R., Tapia, K., Binder, D.K., Razak, K.A., Ethell, I.M., 2018. Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing Fmr1 Knock-Out Mice. *Cereb. Cortex* 28, 3951–3964. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx258>
- Xu, H., Ye, Y., Hao, Y., Shi, F., Yan, Z., Yuan, G., Yang, Y., Fei, Z., He, X., 2018. Sex differences in associations between maternal deprivation and alterations in hippocampal calcium-binding proteins and cognitive functions in rats. *Behav. Brain Funct.* 14, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12993-018-0142-y>
- Yakel, S.N.S. and J.L., 2004. Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat hippocampal interneurons. *Prog. Brain Res.* 145, 95–107. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)45006-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)45006-1)
- Yamada, J., Ohgomori, T., Jinno, S., 2015. Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 41, 368–378. <https://doi.org/10.1111/ejn.12792>
- Yamada, S., Nelson, W.J., 2007. Synapses: Sites of Cell Recognition, Adhesion, and Functional Specification. *Annu Rev Biochem.* 76, 267–294. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142811.Synapses>
- Yamaguchi, Y., 2000. Lecticans: Organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 276–289. <https://doi.org/10.1007/PL00000690>
- Yeckel, M.F., Berger, T.W., 1990. Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: Redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5832–5836. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5832>
- Young, R.J., 2007. Environmental Enrichment for Captive Animals, Environmental Enrichment for Captive Animals. <https://doi.org/10.1002/9780470751046>
- Zaif, H., Nicolas, S., Petit-Paitel, A., Chabry, J., Guyon, A., 2018. How Does an Enriched Environment Impact Hippocampus Brain Plasticity? *Hippocampus–Plasticity Funct.* 11, 13.
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Amaral, D.G., 1986. Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* 6, 2950–2967. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.06-10-02950.1986>



## **Biografija autora**

Ana N. Jakovljević je rođena 24. oktobra 1993. godina u Palama, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina. Završila je osnovne studije na Odsjeku za Biologiju, smer Biohemija i fiziologija na Prirodno-matematičkog fakulteta u Sarajevu, BiH, 2016. godine. Iste godine je upisala master akademske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu, modul Biofizika. 2017. godine je završila master rad pod nazivom „Uloga matriksne metaloproteinaze 9 u strukturnoj plastičnosti hipokampusa i kore velikog mozga miša“, koji je eksperimentalno urađen u Centru za lasersku mikroskopiju, Instituta za fiziologiju i biohemiju, na Biološki fakultetu, pod mentorstvom prof. dr. Pavla R. Anđusa. Multidisciplinarne doktorske studije upisuje 2017. godine na Univerzitetu u Beogradu, studijski program Biofotonika. Od decembra 2018. godine je zaposlena na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku. 2019/2020 godine je bila saradnik u nastavi na predmetu Biofizičke osnove opšte fiziologije, na osnovnim akademskim studijama. Godine 2019. je boravila na Institutu za molekularnu genetiku, Odeljenje za svjetlosnu mikroskopiju, Češke akademije nauka, Prag, Češka republika, pod pokroviteljstvom COST akcije radi učenja metode super-rezolucione mikroskopije, strukturane iluminacije. U okviru DAAD bilateralnog projekta je ostvarila kratku naučnu posetu Institutu za anatomiju i fiziologiju na Medicinskom fakultetu u Bohumu, Nemačka. Bila je angažovana na internacionalnom HORIZON 2020 projektu AUTOIGG u okviru kojeg je boravila 5 meseci na Medipol Univerzitetu u Istanbulu, Turska, 2022. godine, kao i 3 meseca na LANOTEC institutu u San Hozeu, Kostarika. Trenutno je angažovana na PRIZMA nacionalnom projektu NIMOCHIP. U okviru doktorske disertacije publikovala je 3 naučna rada u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije M21 i autor je 15 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja. Osim naučnog, bavi se i umjetničkim radom.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ана Н. Јаковљевић

Број индекса 50/2017

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Улога молекула тенасцина-Це у структурној пластичности хипокампуса“

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Н. Јаковљевић

Број индекса 50/2017

Студијски програм Биофотоника

Наслов рада Улога молекула тенасцина-Це у структурној пластичности хипокампуса

Ментори Проф др Павле Анђус

Др Бранислав Јеленковић

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

Улога молекула тенасцина-Це у структурној пластичности хипокампуса

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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