

НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На седници Научног већа Медицинског факултета у Београду, одржаној дана 28. 04. 2016. године, број 5940/04, именована је комисија за оцену завршене докторске дисертације под насловом:

„ ДУГОРОЧНИ ЕФЕКТИ МАТЕРНАЛНЕ ДЕПРИВАЦИЈЕ НА ХОЛИНЕРГИЧКИ СИСТЕМ И РЕДОКС РЕГУЛАЦИЈУ У МОЗГУ ПАЦОВА “

кандидата др Бранке Марковић, запослене на Факултету спорта и физичког васпитања у Београду у звању асистента на предмету Функционална анатомија, катедра за ужу научну област Биомедицинске науке у физичком васпитању, спорту и рекреацији. Ментор ове докторске тезе је проф. др Бранислав Филиповић, коментор је проф. др Наташа Петронијевић.

Комисија за оцену завршене докторске дисертације именована је у саставу:

1. Проф. др Видосава Радоњић, професор Медицинског факултета у Београду
2. Проф. др Иванка Марковић, професор Медицинског факултета у Београду
3. Проф. др Раде Чукурановић, професор Медицинског факултета у Нишу

На основу анализе приложене докторске дисертације, комисија за оцену завршене докторске дисертације једногласно подноси Научном већу Медицинског факултета следећи

ИЗВЕШТАЈ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација др Бранке Марковић написана је на 101 страни и подељена је на следећа поглавља: увод, радна хипотеза, циљеви рада, материјал и

методе, резултати, дискусија, закључци и литература. У дисертацији се налази укупно 8 слика, 14 графика и 3 табеле. Докторска дисертација садржи сажетак на српском и енглеском језику, биографију кандидата, податке о комисији, списак скраћеница коришћених у тексту и прилоге.

У **уводу** је широко приказана етиопатогенеза шизофреније са посебним освртом на холинергички систем и оксидативни стрес. Дат је опис и значај анималних модела у проучавању психијатријских обољења са посебним освртом на матерналну депривацију као једног од потенцијалних узрока у развоју шизофреније у каснијем периоду живота. Посебан осврт је дат на активност и значај холинергичког система, као и улогу ензима Ach у етиопатогенези шизофреније. Детаљно су описана предилекциона места и путеви у хипокампусу у којима долази до промена у току настанка шизофреније. Такође, детаљно је описана улога оксидативног стреса, као и потенцијални извори слободних радикала. Приказан је значај NADPH оксидазе и његова физиолошка и етиопатогенетска улога у шизофренији.

Циљеви рада су прецизно дефинисани. Састоје се у испитивању дуготрајног утицаја матерналне депривације на активност AchE у кортексу, хипокампусу, таламусу и каудатусу мозга пацова и густину холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу и хипокампадној формацији. Као циљ рада наведено је и испитивање дуготрајног утицаја матерналне депривације на садржај GSH и активност γ -GCL и показатеље оксидативног стреса одређивањем активности SOD, GPx, GR, затим мерење експресије SOD1 и SOD2 као и одређивањем липидних пероксида у кортексу, хипокампусу, таламусу и каудатусу мозга пацова. Такође, међу циљевима је наведено и испитивање дуготрајног утицаја матерналне депривације на активност ензима респираторног ланца митохондрија (kompleksa I i citohrom C oksidaze) и експресију субјединица NADPH оксидазе (gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) у кортексу, хипокампусу, таламусу и каудатусу мозга пацова.

У поглављу **Материјал и методе** наведено је да су експерименти рађени на животињама које су добијене из узгајалишта Института за биомедицинска истраживања Галеника у Београду. Описан је експериментални модел матерналне депривације

пацова уз детаљан опис услова њиховог чувања. Експерименти су спровођени у складу са етичким принципима и смерницама за бригу о животињама одобреним од Управе за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине и Медицинског факултета Универзитета у Београду. Прецизно су наведени начин одвајања младунаца од мајке као и временски интервали подвргавања животиња експерименту и њиховог жртвовања. Детаљно је описана методологија припреме узорака за биохемијске анализе и имунохистохемијско бојење. Све биохемијски протоколи су прецизно наведени. Такође, техником *Western blot-a* описано је одређивање експресије протеина специфичних за оксидативни стрес.

У поглављу **Резултати** детаљно су описани и јасно представљени сви добијени резултати.

Дискусија је написана јасно и прегледно, уз приказ података других истраживања са упоредним прегледом добијених резултата истраживања.

Закључци сажето приказују најважније налазе који су проистекли из резултата рада. Коришћена **литература** садржи списак од 250 референци.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Ово истраживање је показало да рани стрес изазван матерналном депривацијом проузрокује дуготрајне промене у холинергичком систему и редокс регулацији. Првенствено стрес проузрокован раним одвајањем младунаца од мајке доводи до доводи до смањења активности AChE у кортексу као и до повећања активности AChE у хипокампусу. Такође, доводи до смањења густине холинергичких влакана у ретроспленијалном кортексу мозга пацова као и до повећања густине холинергичких влакана у СА1 подручју хипокампуса.

Матернална депривација доводи до снижења редукованог глутатиона у свим испитиваним структурама, доводи до повећања активности ензима GPx у кортексу, и смањења активности овог ензима у таламусу али не доводи до промена у активности ензима γ -GCL и GR. Матернална депривација узрокује повећање активности ензима

SOD у кортексу и хипокампусу као и повећану експресију SOD1 и SOD2 у кортексу. Матернална депривација доводи до липидне пероксидације у кортексу и таламусу. Матернална депривација узрокује повећану активност комплекса I у хипокампусу, таламусу и *nc.caudatus*-у али не доводи до промена у активности COX.

Матернална депривација доводи до повећане експресије $gp91^{phox}$ у кортексу и хипокампусу, као и до снижења експресије у таламусу и *nc.caudatus* –у, такође узрокује повећану експресију $p22^{phox}$ у хипокампусу и снижење експресије у *nc.caudatus*–у, као и снижење експресије $p47^{phox}$ у хипокампусу и *nc.caudatus*-у. Матернална депривација узрокује повећање експресије $p40^{phox}$ у хипокампусу али не узрокује промене у експресији $p67^{phox}$.

Наведени подаци могу бити од значаја у смислу сагледавања и разумевања етиопатогенетских механизма шизофреније, као и у развоју нових експерименталних модела и стратегија у лечењу ове болести.

Ц) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе

Стресни животни догађаји имају кључну улогу у етиопатогенези психијатријских обољења као што су шизофренија, хронична анксиозност и депресија (Muscattell i sar., 2009). Стрес је неизбежан фактор током људског живота, а екстремни облици акутног и хроничног стреса представљају ризик за развој психијатријских обољења (Roberts, 1994). Мајка може бити кључни разлог за настанак стреса током живота са трајним последицама у развоју мозга (Francis i Meaney, 1999). Стрес у раном периоду живота као што је матернална депривација представља један од актуелних анималних модела шизофреније. Досадашња испитивања су показала да стрес у раном периоду живота изазива комплексно дејство на различите неуротрансмитерске системе, док дуготрајни утицаји нарочито код матерналне депривације као модела раног стреса још увек нису довољно познати. Испитивање холинергичког система је од посебног

значаја у шизофренији обзиром да типични антипсихотици показују високу ефективност у редуковању позитивних симптома али не показују ефективност у редуковању негативних симптома и когнитивних поремећаја (Foster i sar., 2012), стога се сматра да је холинергички систем мета за развој нових лекова који ће успешније редуковати негативне симптоме SCH као и поремећаје когниције (Freedman i sar., 2008; Scarr, 2012). У приказаном истраживању активност ензима AchE као и стереолошка испитивања густине холинергичких влакана показала су регион-специфичне промене што се подудара се са претходним студијама које су указале на холинергичке абнормалности код оболелих од шизофреније (Carruthers i sar., 2015), као и на значај холинергичких влакана у етиопатогенези шизофреније (Barak i sar., 2009).

Једна од најочљивијих промена запажених у овом истраживању било је смањење садржаја GSH у свим испитиваним структурама, једног од најважнијих параметара оксидативног стреса а што је у складу са литературним подацима на другим анималним моделима шизофреније (Radonjić i sar., 2010; Stojković i sar., 2012;), док клиничке студије указују на снижење нивоа GSH у еритроцитима (Raffa i sar., 2011) и ликвору (Do i sar., 2000) нелечених пацијената оболелих од шизофреније, као и префронталном кортексу и репатом једру пацијената оболелих од SCH (Matsuzawa i sar., 2008; Do i sar., 2004). Испитивање ензима који су укључени у метаболизам GSH, указали су на присуство редокс дисрегулацију. Иако су нивои GSH у испитаним можданим структурама у овом истраживању статистички значајно снижени, активност γ -GCL, првог корака у GSH синтези, није се променила. Статистички значајно повећање активност GPx показано је само у кортексу, док активност ензима GR не показује статистички значајне промене. Раније *postmortem* студије пацијената оболелих од SCH показале су снижење активности GPx i GR у *nc.caudatus-u* (Yao i sar., 2006), снижење GPx као и непромењену активност GR у префронталном кортексу (Gawryluk i sar., 2011). Испитивање активности ензима SOD показало је повећану активност SOD у кортексу и хипокампусу, које прати повећање експресије и цитосолних (SOD1) и митохондријалних (SOD2) изоформи овог ензима у кортексу. Литературни подаци показују контрадикторне податке који се односи на активност SOD код пацијената

оболелих од SCH. Различите студије показују повишење (Zhang i sar., 2003), снижење (Zhang i sar., 2006; Raffa i sar., 2009) или непромењену активност SOD у крви пацијената оболелих од шизофреније (Raffa i sar., 2011). Скорашња студија је показала да код пацијента оболелих од SCH у акутној фази, активност серумске SOD је у негативној корелацији са активношћу серумске GPx, док је ниво серумског GSH у позитивној корелацији са активношћу серумске GPx (Tsai et al., 2013). Испитивање оксидативног стреса у овом истраживању одређивањем концентрације MDA, показало је повећање концентрације MDA само у кортексу и таламусу. Мерењем нивоа продуката липидне пероксидације показано је оксидативно оштећење код пацијената са шизофренијом (Dietrich-Muszalska i Olas 2009; Zhang i sar., 2010). Неколико студија је испитивало утицај матерналне депривације на оксидативни стрес у мозгу пацова (Uysal i sar., 2005, Diehl i sar., 2012) али нема резултата о дуготрајним последицама матерналне депривације на редокс регулацију у мозгу пацова. С друге стране, циљ овог истраживања је био потенцијални извор повећане продукције слободних радикала који може бити узрок оксидативном оштећењу. У истраживању је испитивана активност комплекса I и цитохром C оксидазе респираторног ланца митохондрија. Резултати овог истраживања су показала повећану активност комплекса I у свим испитиваним структурама осим у кортексу, док је активности COX у свим испитиваним структурама била непромењена. Литературни подаци говоре у прилог митохондријалној дисфункцији код оболелих од шизофреније али нису конзистентни. Митохондријална дисфункција је показана и код кетаминског анималног модела шизофреније где су се запажене повећане активности комплекса I, II, I-III и IV митохондријалног респираторног ланца у префронталном кортексу, стријатуму и хипокампусу ((de Oliveira i sar., 2011). У истраживању које су извршили Gubert и сар. (Gubert i sar., 2013) забележено је знатно смањење активности митохондријалног комплекса I и повећање липидних пероксида као маркера оксидативног стреса у моноклеарним ћелијама периферне крви оболелих од шизофреније. Drog и сар. (Drog i sar., 2002) запазили су изузетно специфичне и осетљиве алтерације активности комплекса I у тромбоцитима шизофрених пацијената у зависности од стадијума болести. Повећање активности доведено је у везу са психотичном симптоматологијом, док је смањење активности

запажено код пацијената с резидуалном схизофренијом. Недавна испитивања *substantia nigra-e* и вентралне тегменталне области код схизофрених пацијената нису уочене промене активности COX, што је у сагласности са резултатима наше студије, мада је запажено знатно смањење експресија COX субјединица II и IV-I (Rice i sar., 2014).

У овом истраживању је такође испитиван дугорочан утицај матерналне депривације на субјединице ензима NADPH оксидазе. У овом истраживању кортекса једина примећена промена у NOX била је повећана експресија мембранске субјединице gp91^{phox} док су највеће промене забележене у хипокампусу где је показано повећање експресије gp91^{phox}, p22^{phox} и p40^{phox} као и смањењем експресије p47^{phox}. У таламусу је показало снижење експресије gp91^{phox} док су се дугорочни ефекти матерналне депривације у *pc.caudatus*-у огледали у смањеној експресији gp91^{phox}, p22^{phox} и p47^{phox}. Актуелна истраживања потенцирају улогу ензима NADPH оксидазе у редокс дисрегулацији (Sorce i Krause, 2009), као и на значајну улогу NOX ензима у патогенези схизофреније (Sorce i sar., 2012), што потврђују и најновије студије (Jiang i sar., 2016), која је показала да метаболити клозапина, атипичног антипсихотика, имају неуропротективни ефекат управо кроз инактивацију микроглијалног NOX2 што такође говори у прилог да NADPH оксидазе јесу извор слободних радикала од значаја у етиопатогенези схизофреније.

Д) Објављени радови који чине део докторске дисертације

1. Marković B, Radonjić NV, Aksić M, Filipović B, Petronijević N. Long-term effects of maternal deprivation on cholinergic system in rat brain. BioMed Res Int. 2014. doi: 10.1155/2014/636574. Epub 2014 Mar 10.

Е) Закључак (образложење научног доприноса)

Докторска дисертација „ Дугорични ефекти матерналне депривације на холинергички систем и редокс регулацију у мозгу пацова “ др Бранке Марковић представља оригинални научни допринос у расветљавању утицаја раног стреса на

дуготрајне промене у мозгу експерименталних животиња. Комисији је задовољство да истакне да је по први пут у овој докторској тези свеобухватно проучен рани утицај стреса на експресију мембранских (gp91^{phox}, p22^{phox}) и цитосолних (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}) субјединица NADPH оксидазе. Такође, су приказани дуготрајни ефекти у мозгу пацова након матерналне депривације на холинергички систем. На основу добијених резултата у овом истраживању, може се закључити да утврђене промена које настају у мозгу експерименталних животиња као последица матерналне депривације могу допринети сагледавању патогенетских механизма схизофреније, као и развоју нових потенцијалних терапијских стратегија у лечењу ове болести.

Докторска дисертација је урађена према свим принципима научног истраживања. Циљеви су били прецизно дефинисани, научни приступ је био оригиналан и пажљиво изабран, а методологија рада је била савремена. Резултати су прегледно и систематично приказани и дискутовани, а из њих су изведени одговарајући закључци.

На основу свега наведеног и имајући у виду досадашњи научни рад кандидата, комисија предлаже Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати докторску дисертацију др Бранке Марковић и одобри њену јавну одбрану ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

Ментор :

Проф. др Бранислав Филиповић, редовни професор, Института за анатомију „Нико Миљанић“, Медицинског факултета, Универзитета у Београду

Коментор:

Проф. др Наташа Петронијевић, редовни професор, Института за медицинску и клиничку биохемију, Медицинског факултета, Универзитета у Београду

Чланови комисије :

Проф. др Видосава Радоњић, редовни професор, Института за анатомију „Нико Миљанић“, Медицинског факултета, Универзитета у Београду

Проф. др Иванка Марковић, редовни професор, Института за медицинску и клиничку биохемију, Медицинског факултета, Универзитета у Београду

Проф. др Раде Чукурановић, редовни професор анатомије, Медицинског факултета,
Универзитета у Нишу