

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.09.2023. godine, broj 14/XVI-1/3-ŽG, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Fragmentacija spavanja izazvana eksperimentalno po modelu apneje u spavanju: bihejvioralne, elektrofiziološke, biohemijske i strukturne promene“

kandidata dr Željka Grubača, zaposlenog na Klinici za digestivnu hirurgiju-Prva hirurška, Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije.

Mentor je Prof. dr Dragan Hrnčić, Institut za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komentor je Prof. dr Nela Puškaš, Institut za histologiju i embriologiju „Prof. dr Aleksandar Đ. Kostić“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. **Prof. dr Olivera Stanojlović**, redovni profesor, predsednik, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. **Prof. dr Tatjana Simić**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, dopisni član SANU
3. **Prof. dr Aleksandra Rašić-Marković**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
4. **Prof. dr Dušan Mladenović**, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
5. **Prof. dr Vesna Martić Popović**, redovni profesor, Univerzitet Odbrane u Beogradu, Medicinski fakultet Vojno Medicinske Akademije

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Željka Grubača napisana je na srpskom jeziku, u skladu sa Statutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu. Sadrži ukupno 156 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci, literatura i prilozi. U disertaciji se nalaze ukupno 26 slika i 34 grafikona (pojedinačni i u obliku panela). Doktorska disertacija sadrži još: sadržaj, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, pismo zahvalnosti, biografiju doktoranda, spisak publikovanih rezultata koji su proizašli iz teze, kao i prateće izjave: Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** su izneti savremeni koncepti o ulogama i značaju spavanja u održavanju homeostaze. Jasnom podelom poremećaja spavanja na kvalitativne i kvantitativne, u odnosu na disrupciju arhitekture i skraćenje vremena provedenog u spavanju, se ukazuje na najčešće poremećaje spavanja (kvalitativne i kvantitativne). Opisana je fragmentacija spavanja kao eksperimentalni model koja translaciono ukazuje na pacijente sa opstruktivnom apnejom u spavanju. U kliničkim studijama nemoguće je odvojeno ispitivanje hiperkapnije i fragmentacije spavanja tokom apneje u spavanju. Nije izvodljivo kliničko ispitivanje mehanizama nastanka fragmentacije spavanja i hiperkapnije kao i neuropsihijatrijskih i drugih komorbiditeta koji su njihova posledica, što je u eksperimentalnim studijama moguće. Jedno od poglavlja je posvećeno eksperimentalnim modelima koji su ostali nezaobilazna istraživačka strategija za razumevanje mehanizama epileptogeneze kao i mentalnih poremećaja - ponašanja povezanog sa anksioznošću i depresijom, usled postojanja baterija etoloških testova za istraživanja. U analizi eksperimentalnih metoda za izazivanje poremećaja spavanja kod eksperimentalnih životinja u uvodu je opisan model visokofrekventne fragmentacije spavanja sa učestalošću sličnoj onoj kod pacijenata sa opstruktivnom apnejom u spavanju, kao somnološki eksperimentalni model apneje u spavanju. Postavljena je hipoteza o uticaju fragmentacije spavanja na ekscitabilnost centralnog nervnog sistema, obzirom da se apneja u spavanju sa povećanom učestalošću javlja kod pacijenata sa refraktornom epilepsijom. U drugom delu uvoda napravljen je osvrt na povezanost mentalnog zdravlja i poremećaja spavanja. Promenjeno trajanje i kvalitet spavanja su među dijagnostičkim kriterijumima za generalizovani anksiozni poremećaj i depresiju. Mnogobrojne kliničke studije ukazuju na postojanje povezanosti apneje u spavanju sa anksioznošću i depresijom. Detaljnim prikazom trenutno poznatih relevantnih rezultata različitih studija o etiopatogenezi, komorbiditetima obstruktivne apneje u spavanju, uvodnim izlaganjem je postavljena dobra osnova za ciljeve ove doktorske disertacije.

Ciljevi rada su precizno formulisani, sastoje se od ispitivanja uticaja eksperimentalne fragmentacije spavanja na elektroencefalografske i bihevioralne karakteristike epileptičnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana; utvrđivanja postojanja promena ponašanja povezanih sa anksioznošću i depresijom, kao i promena u kognitivnim sposobnostima; ispitivanja biohemijskih mehanizama tih promena (parametara oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i nivoa proinflatornih citokina (IL-1 β i IL-6) u serumu, hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu); utvrđivanja nivoa hormona kortikosterona, testosterona, progesterona i estradiola u serumu; ispitivanja procesa neurogeneze i gliogeneze u hipokampusu imunohistohemijskom analizom ekspresije markera proliferacije (Ki-67) i nezrelih neurona (DCX), odnosno proteinskog markera astrocita (GFAP), kao i utvrđivanja promena u ekspresiji parvalbumina (PV), markera inhibitornih interneurona.

U poglavlju **Materijal i metode** su jasno izneti detalji eksperimentalnog dizajna i korišćenih savremenih metoda i tehnika. Opisani su eksperimentalni protokoli za: 1. izazivanje fragmentacije spavanja u eksperimentalnim životinjama, 2. ispitivanje funkcionalnih, bihevioralnih, biohemijskih i imunohistohemijskih promena u CNS i podložnosti razvoju hiperekscitabilnosti u eksperimentalnom modelu fragmentacije spavanja; 3. protokoli za izolaciju biološkog materijala: moždanih struktura i krvi; i 4. protokoli za ispitivanje ponašanja karakterističnog za anksioznost i depresiju kao i kognitivnog poremećaja kod eksperimentalnih životinja. Definisano je da su u radu korišćeni odrasli mužjaci pacova soja *Wistar albino*, koji su dopremljeni iz akreditovanog vivarijuma u Beogradu, a u laboratoriji čuvani pod kontrolisanim standardnim ambijentalnim uslovima.

Svi eksperimentalni postupci bili su u skladu sa direktivom Evropskog parlamenta i Veća (2010/63/EU) i odobreni od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja

Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br. 8026/2) i Rešenjem nadležnog ministarstva Republike Srbije (br. 323-07-05290/2017-05).

Eksperimentalna fragmentacija spavanja je sprovedena uz pomoć tredimla za male životinje u akutnom, subakutnom i hroničnom tretmanu, u prvih 6 sati „svetle“ faze počev od 08.00h ujutro. U svim eksperimentima su korištene dve kontrolne grupe: kontrolna grupa za aktivnost koja je primila istu količinu kretanja kao i eksperimentalna, ali u različitom vremenskom opsegu te joj nije fragmentirano spavanje (ona je činila kontrolnu grupu za aktivnost na tredmilu) i sedentarna kontrolna grupa u kojoj su životinje samo fizički boravile u tredmilu bez aktivnosti trake. Navedeno je da su pre početka, ali i tokom istraživačkog perioda, sve životinje bile pod stalnim praćenjem, pri čemu su na dnevnom nivou mereni dnevne promene u telesnoj masi a hrana i voda su bili dostupni *ad libitum*. Opisane su metode bihevioralnih ispitivanja u cilju analize ponašanja povezanog sa anksioznošću i depresijom i kognitivnih funkcija. Izvođenje neurofizioloških bihevioralnih testova: svetlo/tama, uzdignutog krstastog lavirinta, otvorenog polja, forsiranog plivanja i modifikovanog testa uzdignutog krstastog lavirinta su detaljno opisani. Dat je pregled korišćenih biohemijskih tehnika sa opisom procedura za: pripremu uzoraka tkiva, organa i seruma za biohemijske analize, određivanje koncentracije proteina u uzorcima, merenje koncentracije IL-1 β i IL-6 i hormona u serumu ELISA tehnikom i određivanje parametara oksidativnog stresa u strukturama.

Pregled eksperimentalnih procedura za utvrđivanje bihevioralnih i elektroencefalografskih karakteristika konvulzivnog ponašanja u proceni ekscitabilnosti CNS je opisan: metoda implantacije registrujućih EEG elektroda, procesi akvizicije kao i analiza EEG zapisa. Imunohistohemijske metode bojenja i kvantifikovanja ekspresije markera Ki-67, DCX, GFAP i PV su takođe opisane. Na kraju ovog poglavlja je dat pregled korišćenih statističkih testova.

U poglavlju **Rezultati** detaljno i jasno su predstavljeni svi dobijeni rezultati, uz adekvatan prateći opis: grafički, tabelarno, shematski, korišćenjem reprezentativnih slika fotomikrografije, reprezentativnih EEG zapisa, reprezentativnih prikaza lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja i dr.

Diskusija je napisana preglednouz sumiran i prodiskutovan značaj dobijenih rezultata i njihovo dovođenje u međusobnu vezu i razmatranje mehanicističkih aspekata ispitivanih fenomena. Prodiskutovani su rezultati drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazani i konzistentni su sa postavljenim ciljevima istraživanja. Prikazuju najvažnije rezultata rada.

Pregled korišćene **Literature** sadrži spisak od 534 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati sprovedenih istraživanja bihevioralnom, biohemijskom, hormonalnom, elektroencefalografskom analizom su pokazali da eksperimentalno izazvana fragmentacija spavanja po uzoru na kliničku opstruktivnu apneju u spavanju, izaziva povećanja moždane ekscitabilnosti, akutno i kada je procedura prolongirana.

U prvom delu istraživanja ispitivan je uticaj akutne fragmentacije spavanja, u trajanju od 6 sati svetle faze, na pojavu konvulzija kod eksperimentalnih životinja. Modulacija spavanja postignuta je uz pomoć tredmila za male eksperimentalne životinje koji je kontrolisan softverskim paketom uz konstantan nadzor istraživača, prema već prethodno opisanom protokolu. Rezultati su pokazali da poremećaj arhitekture spavanja potencira bihevioralne i EEG karakteristike epileptične aktivnosti eksperimentalnih životinja. Akutna fragmentacija spavanja značajno dovodi do bihevioralnih promena: povećanja incidence i inteziteta konvulzivnih odgovora, povećanja broj iktalnih perioda kod eksperimentalnih životinja, deluje na skraćenje latentnog perioda (od davanja subkonvulzivne doze lindana do pojave napada). Ove promene ukazuju na hiperekscitabilnost nervnog sistema.

U drugom delu studije pokazano je da dugotrajna fragmentacija značajno facilitira konvulzivne napade. Ovakav rezultat je u saglasnosti sa činjenicom da je indukcioni prag za nastanak konvulzivnog napada izuzetno osetljiv na promene obrazaca spavanja. Efekti dugotrajne fragmentacije spavanja bili su značajnoveći u odnosu na akutnu fragmentaciju, i deluju na povećanje incidence napada, bihevioralne i EEG epileptične aktivnosti nakon administracije subkonvulzivne doze lindana. Elektroencefalografskom analizom akutne i hronične fragmentacije spavanja utvrđuje se pojava serije visokovoltajzne iktalne aktivnosti, dok je kvantitativna analiza iktalnih perioda pokazala značajne razlike između grupa. U kontrolnoj grupi za aktivnost primećena je sporadična pojava iktalnih fenomena, dok su životinje iz sedentarne kontrolne grupe imale uredan EEG zapis. Nakon hronične fragmentacije spavanja vrednosti IL-1 β bile su značajno povećane u hipokampusu, talamusu i korteksu životinja iz eksperimentalne grupe. Nivoi IL-6 su bili najniži u hipokampusu i talamusu eksperimentalnih životinja, ali bez statističke razlike u odnosu na životinje iz kontrolnih grupa. Vrednosti IL-6 u korteksu eksperimentalnih životinja bile su značajno veće u odnosu na životinje iz kontrolnih grupa.

Ova studija pokazala je da fragmentacija spavanja dovodi do pojave ponašanja koje je karakteristično za anksioznost, a efekti fragmentacije su direktno proporcionalni vremenu za koje je spavanje narušeno. Kvantitativna analiza svih bihevioralnih testova koji su sprovedeni na eksperimentalnim životinjama (test otvorenog polja, test uzdignutog krstastog lavirinta i test svetlo/tama) pokazala je ponašanje indikativno za anksioznost, što je podrazumevalo manji broj propinjanja na zadnje šape, kraće vreme provedeno u centru i veći indeks tigmataksije u testu otvorenog polja, kod životinja kojima je fragmentisano spavanje; kao i kraće vreme provedeno u otvorenom kraku i svetlom kompartmanu, kao i smanjen broj tranzicija iz svetla u tamu, u testovima uzdignutog krstastog lavirinta i svetlo/tama. Kod grupe životinja kojima je akutno fragmentisano spavanje utvrđeni su statistički značajno niži nivoi testosterona, progesterona i estradiola u odnosu na životinje iz kontrolnih grupa. Hronična fragmentacija spavanja značajno je uticala na pojavu oksidativnog stresa u centralnom nervnom sistemu pacova, sa koncentracijom MDA značajno većom u sve tri izolovane strukture (talamus, hipokampus i korteks) kod životinja iz eksperimentalne grupe, sniženom aktivnošću SOD, gubitkom *thiol* grupa u talamusu i korteksu fragmentisanih životinja i značajno manjom aktivnošću Gpx enzima u sve tri izolovane strukture.

Rezultati ove studije pokazali su da fragmentacija spavanja po uzoru na onu koja se javlja kod opstruktivne apneje u spavanju dovodi do ponašanja karakterističnog za depresiju, a efekti ovakve fragmentacije su linearno proporcionalni trajanju fragmentisanog perioda. Ovo je potvrđeno bihevioralnom analizom rezultata testa forsiranog plivanja, koji je pokazao produženje perioda imobiliteta u odnosu na aktivno plivanje i borbu kod životinja kojima je fragmentisano spavanje u odnosu na kontrolne grupe. Ovaj efekat bio je više izražen nakon

subakutnog i hroničnog tretmana u odnosu na akutni. Modifikovani test uzdignutog krstastog lavirinta pokazao je kognitivni pad kod životinja nakon hronične fragmentacije spavanja koji se manifestovao produženim periodom tranzicije iz svetlih u tamne krake u TL2 sekvenci. Pojava karakteristična za depresivni poremećaj ili posledica depresivnog poremećaja jer imunohistohemijski nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji Ki-67, DCX i GFAP u dentatnom girusu hipokampusa. Dugotrajna fragmentacija spavanja je uticala na smanjenja telesne težine (iako je bilo fluktuacija u opserviranom periodu od 14 dana), povećanja serumskog nivoa kortikosterona i smanjenja nivoa testosterona kod životinja iz eksperimentalne grupe u odnosu na kontrole.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Promene obrazaca spavanja imaju duboke efekte na podložnost za pojavu konvulzija, a uticaj deprivacije spavanja na pacijente sa epilepsijom je prethodno objašnjen (Scalise i sar., 2006; Lucey i sar., 2015). Ipak, odnos između fragmentacije spavanja i epilepsije još uvek nije dovoljno rasvetljen. Nekoliko studija proučavalo je efekte deprivacije spavanja na podložnost konvulzivnim napadima, pri čemu se pokazalo da deprivacija spavanja može povećati incidencu napada kod pacijenata sa epilepsijom i eksperimentalnih životinja (Hrnčić i sar., 2013). U preglednom radu Díaz-Negrillo (2013) je pokazano da deprivacija spavanja povećava učestalost konvulzivnih epizoda kod pacijenata sa noćnim fokalnim konvulzivnim epizodama u frontalnom režnju, dok su Aboul Ezz i sar. (2021) pokazali da selektivna deprivacija povećava učestalost i trajanje napada kod pacova. Studiju o uticaju fragmentisanog spavanja na epileptogenezu podelili smo na akutnu i hroničnu kako bi stekli bolje razumevanje efekta ovog fenomena na moždanu ekscitabilnost i istražili potencijalne mehanizme koji su odgovorni za ovu povezanost. Fragmentacija spavanja i intermitentna hipoksija su glavna obeležja OSA kod koje je primećeno snižavanje praga za nastanak konvulzivnih napada (Malow i sar., 2003). Neodgovoreno pitanje u trenutno dostupnoj literaturi je i do kog nivoa fragmentacija spavanja doprinosi sniženju praga ekscitabilnosti kod apnoičnih pacijenata. Da bi se odgovorilo na ovo pitanje, Baud i sar. (2015) su sprovedli studiju o efektima hronične fragmentacije spavanja na podložnost za konvulzije na animalnom modelu. Istraživači su otkrili da hronična fragmentacija spavanja u trajanju od 24 sata dnevno dovodi do povećane podložnosti za konvulzije kod pacova. Međutim, studija nije obuhvatila efekte različitih nivoa fragmentacije spavanja na podložnost za konvulzije. U preglednom radu koji je objavio Stepanski (2002), definisani su različiti nivoi fragmentacije spavanja (akutni, subakutni i hronični) kao i minimalna učestalost prekida kako bi se spavanje smatralo fragmentisanim. Ovi različiti nivoi fragmentacije spavanja omogućili su istraživačima da ispituju efekte kratkoročne i dugoročne fragmentacije spavanja na podložnost za konvulzivne napade kod pacova. Otkrili su da i akutna i hronična fragmentacija spavanja povećavaju podložnost za pojavu epileptičnih napada, pri čemu hronična fragmentacija ima veći uticaj. Ipak, ni ova studija nije dala odgovor za uticaj visokofrekventne fragmentacije spavanja, po uzoru na onu kod pacijenata sa OSA, na ekscitabilnost. Efekat dugotrajne fragmentacije spavanja u trajanju od 14 dana, korišćen je u saglasnosti sa Baud i sar. (2015), kako bi se procenili hronični efekti, sa razlikom u trajanju fragmentisanog perioda, s obzirom da su Baud i sar. koristili 24h fragmentaciju, dok je ovde primenjena fragmentaciju 6/24h, koja je bolja za razumevanje njenih efekata s obzirom da je to prosečno trajanje spavanja. Neophodno je istaći da se efekti akutne i hronične fragmentacije spavanja značajno razlikuju, pre svega u smislu reakcije na stres, somatskog bola, smanjenog kvaliteta života, poremećaja raspoloženja i kognitivne disfunkcije (Medic i sar., 2017). U oba istraživanja, ispitivanje uticaja akutne i hronične fragmentacije

spavanja na ekscitabilnost, korišćen je isti protokol za fragmentaciju spavanja u istim eksperimentalnim uslovima, koji imitira poremećaj spavanja u opstruktivnoj apneji u spavanju. Već je prethodno pokazano da postoji povećan broj pacijenata sa opstruktivnom apnejom u spavanju koji kao pridruženu bolest imaju i epilepsiju (Sonka i sar., 2000). Udruženost epilepsije i opstruktivne apneje u spavanju je veoma česta (Manni i sar., 2005). Takođe opisano je da terapija apneje u spavanju sa kontinuiranim pozitivnim respiratornim pritiskom (CPAP) ima značajne pozitivne efekte na refraktarnu epilepsiju kod ovih pacijenata (Pornsriyom i sar., 2014), kao i na dnevnu somnolenciju i nedostatak pažnje (Hoyt, 2005; Soldatos i Paparrigopoulos, 2005). Intermitentna hipoksija sa konsekutivnom hipoksemijom kod apneje u spavanju je već uspostavljena hipoteza povećanja ekscitabilnosti CNS-a (Seyal i sar., 2010). Odnos između epilepsije i vrednosti IL-1 β još uvek nije razjašnjen u kliničkim studijama: u nekima je dokazana povezanost, u drugim nije (Tilgen i sar., 2002; Virta i sar., 2002; Kanemoto i sar., 2003; Ozakara i sar., 2006). Sa druge strane, bazične eksperimentalne studije daju veću mogućnost da se uspostavi povezanost između povišenih vrednosti IL-1 β i povećane konvulzivne aktivnosti. Vezzani i sar. (1999) su prvi objavili da IL-1 β pojačava fokalnu elektroencefalografsku aktivnost konvulzija indukovanih kainatom posredstvom glutaminičke neurotransmisije. Inflamatorne alteracije kod pacova tokom konvulzivnih epizoda se karakterišu brzim porastom nivoa IL-1 β u aktiviranim mikroglijama i astrocitima (Fabene i sar. 2008). Štaviše, ovi povišeni nivoi IL-1 β održavaju se i nakon prestanka napada, što dodatno doprinosi hipotezi o uticaju IL-1 β u mehanizmu nastanka spontanih konvulzivnih napada (Allan i sar., 2005; Fabene i sar., 2008). U ovoj studiji povećani nivoi IL-1 β u cerebralnom korteksu, hipokampusu i talamusu u SF grupi su u saglasnosti sa hipotezama o prokonvulzivnoj ulozi i neurotoksičnim efektima IL-1 β . Nekoliko kliničkih studija je pokazalo rapidno i prolazno postiktalno povećanje IL-6 koje dostiže maksimum nakon 12h i zadržava se 24 sata nakon konvulzije. Ipak, neki pacijenti sa hroničnom epilepsijom imali su povećane nivoe IL-6 i u bazalnim uslovima (Virta i sar., 2002; Lehtimaki i sar., 2004; Lehtimaki i sar., 2007; Alapirrti i sar., 2009). Različiti tipovi epilepsije pokazali su različite obrasce u povećanju IL-6. Uzimajući u obzir niže postiktalne nivoe IL-6 kod ozbiljnih formi epilepsije, može se zaključiti da se IL-6 potencijalno ponaša kao protektivni agens (Bauer i sar., 2009). Nasuprot ovom mišljenju, postoje podaci da je egzogeno apliciran IL-6 doveo do atenuacije konvulzija kod pacova (Fukuda i sar., 2007). Studije sa transgenetskim pacovima reflektuju dvostruku prirodu IL-6, te su životinje deficitantne u IL-6 podložnije na konvulzije, a one sa prekomernom ekspresijom IL-6 imaju manji prag za nastanak spontanih napada i NMDA indukovanih napada, najverovatnije usled redukovane GABA posredovane inhibicije (De Sarro i sar., 2004)

Veza između poremećaja spavanja i anksioznosti bila je predmet istraživanja brojnih studija. Jedno od glavnih saznanja sprovedenih studija u ovoj oblasti jeste da poremećaji spavanja mogu povećati rizik od razvoja anksioznosti, što je u saglasnosti sa rezultatima ove studije. Na primer, meta-analiza Taylora i sar. (2005) pokazala je da poremećaji spavanja povećavaju rizik od razvoja anksioznosti, a anksioznost povećava rizik od razvoja poremećaja spavanja. Baglioni i sar. (2011) analizirali su podatke iz nekoliko epidemioloških studija i utvrdili da osobe sa nesanicom imaju veći rizik od razvoja anksioznih poremećaja u odnosu na one bez nesаницe. Slično tome, Franzen i sar. (2008) su sugerisali da poremećaji spavanja mogu biti rani marker anksioznosti, budući da su prethodili razvoju simptoma anksioznosti. Prethodni rezultati o uticaju narušene arhitekture spavanja na ponašanje povezano sa anksioznošću kod pacova su kontradiktorni, a o tačnim uzrocima uočenih razlika se još uvek raspravlja (Bonnet i Arand, 2003; Pires i sar., 2016). Naime fragmentacija spavanja je povećala „grooming“, ali nije imala nikakvog efekta na stereotipno ponašanje, lokomociju ili rezultat na testu uzdignutog krstastog lavirinta prema rezultatima Tufika i sar. (2009). Sa druge strane, pokazano je da fragmentacija spavanja značajno snižava incidencu propinjanja na zadnje šape, indikator

vertikalne aktivnosti koji je povezan sa eksplorativnim ponašanjem. Dodatno, Suchecki i sar. (2002) su pokazali da su pacovi imali smanjenu lokomotornu aktivnost i naglašene bihevioralne parametre karakteristične za anksioznost nakon fragmentacije spavanja postignute uz pomoć metodologije sa platformom. Rezultati sva tri bihevioralna testa za ispitivanje anksioznosti (test otvorenog polja, test uzdignutog krstastog lavirinta i *light/dark* test) primenjena u ovoj studiji su konzistentni i pokazuju povećan nivo anksioznosti nakon fragmentacije spavanja prema ustaljenim smernicama za interpretaciju (Prut i Belzung, 2003; Bourin i Hascoet 2003; Costall i sar., 1989). Naime, ovi testovi za ponašanje povezano sa anksioznošću snažno sugerišu redukciju eksplorativnog biheviora nakon akutne fragmentacije spavanja. U eksperimentima u ovoj tezi visokofrekventni hronični prekid spavanja doveo je do povećanja anksioznih obrazaca ponašanja kod mužjaka glodara, što je u skladu sa rezultatima Sateie, koji su pokazali da poremećaj kvaliteta i kontinuiteta spavanja predisponiraju razvoj ili pogoršanje mentalnih bolesti (Sateia, 2009).

Rezultati ove disertacije pobijaju teoriju da psihopatologija kod OSA predstavlja ujedno i etiološki uzrok i komplikaciju (Haba-Rubio, 2005) s obzirom da je jasno pokazano da poremećaj spavanja, sličan onom kod apneje u spavanju, izaziva anksioznost u eksperimentalnim uslovima. Jednom razvijena, anksioznost može dodatno pogoršati kvalitet spavanja stvarajući začarani krug, jer poremećaj spavanja i mentalno zdravlje potiču iz istih neurobioloških procesa (Haba-Rubio, 2005), što je ovde verovatno slučaj. Još uvek postoji nedovoljan broj podataka o uticaju fragmentacije spavanja na hormonski status. Povećana aktivnost HPA osovine usled akutne fragmentacije spavanja, prema Hanu i sar. (2012), najverovatnije je posledica metalnog i/ili fizičkog stresa, pre nego nedostatka spavanja *per se*. Veća prevalenca anksioznosti kod žena i hipogonadnih muškaraca u poređenju sa zdravim muškarcima je primećena u brojnim studijama (Gater i sar., 1998; Yonkers, 1997). Povećana simptomatologija u smislu panike u premenstrualnom periodu je bila praćena naglim smanjenjem nivoa progesterona, dok ovi simptomi nisu uočeni tokom trudnoće (Cohen i sar., 1994), što pokazuje da gonadni hormoni utiču na ponašanje. Dugo su hipoksemija (Fisher i sar., 2012; Barrett-Conno i sar., 2008; Gambineri i sar., 2003) i gojaznost (Kirbas i sar., 2007) smatrani glavnim razlozima za snižene vrednosti testosterona kod pacijenata sa OSA, dok fragmentacija spavanja do sada nije razmatrana kao faktor koji utiče na ovaj efekat. Intermitentna hipoksija i fragmentacija spavanja se dešavaju udruženo kod pacijenta sa OSA, a odvojeni efekti ova dva fenomena mogu biti proučavani samo na eksperimentalnim modelima. Frye i Seliga (Frye i Seliga, 2001) su pokazali da je suplementacija testosteronom kod pacova izazvala anksiolitički efekat utvrđen povećanjem eksplorativnog biheviora i vremena provedenog u otvorenom kraku uzdignutog krstastog lavirinta.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su u saglasnosti sa rezultatima Filova i sar (2015) koji su pokazali da je administracija estradiola gonadektomisanim muškim životinjama uzrokovala brz anksiolitički efekat u otvorenom krstastom lavirintu, ali ne i na drugim testovima. U studji na gonadektomisanim muškim pacovima, Carrier i sar. (2015) su pokazali da se ponašanje koje je karakteristično za anksioznost može neutralisati administracijom bilo testosterona ili estradiola. Estradiol nezavisno takođe ima značajnu anksiolitičku ulogu (Farr i sar., 2000). Podaci pokazuju da poremećaj u REM fazi spavanja izaziva oksidativni stres dominantno u hipokampusu (Singh i sar., 2008) kao posledicu smanjene antioksidativne odbrane (Ramanathan i sar., 2002; Süer i sar., 2011). Ranije je pokazano da nedostatak spavanja izaziva ponašanje povezano sa anksioznošću i kod ljudi i kod životinja. Sa druge strane, postoji povezanost između anksioznosti i oksidativnog stresa u mozgu (Hovatta i sar., 2010; Famitafreshi i Karimian, 2020; Hrnčić i sar., 2016; Serdari i sar., 2000). Rezultati ove studije ukazuju da postoji korelacija između nusprodukta oksidativnog stresa sa anksioznim ponašanjem pacova nakon fragmentacije spavanja. Suprotno rezultatima Harkness i sar. koji su objavili da poremećaj

spavanja podiže oksidativni stres u PV+ ćelijama moždane kore pacova (Harkness i sar., 2019), ovde nisu primećene značajne promene hipokampalnih PV+ interneurona. Gubitak hipokampalnih neurona zajedno sa ponašanjem povezanim sa anksioznošću je pokazan u drugim studijama (Lorigooini i sar., 2020; Šutulović i sar., 2021). Međutim, ipak treba naglasiti da su hipokampalni PV+ interneuroni (Czeh i sar., 2005) uključeni u obrasce ponašanja, uključujući strah i anksioznost (Rankov Petrovic i sar., 2019), iako ne utiču na mehanizam ponašanja sličnog anksioznosti izazvanog fragmentacijom spavanja.

Poremećaji spavanja, uopšteno, predstavljaju rizik za nastanak depresivnih poremećaja, dok depresija sama po sebi izaziva poremećaje spavanja (Roberts i sar., 2014). Studija koju su sprovedi Saha i sar. (2016) sugerise da gubitak apetita i gubitak telesne težine, bilo nezavisno ili u kombinaciji, mogu doprineti neurokognitivnom padu kod pacijenata sa depresijom. Kada je u pitanju akutna fragmentacija spavanja, rezultati ove disertacije su u saglasnosti sa onima koje su dobili Steru i sar. (1985). Pacovi koji su podvrgnuti protokolima fragmentacije često pokazuju produženo trajanje nepokretnosti, što ukazuje na povećanu podložnost ponašanju sličnom depresiji. Kada je u pitanju hronična fragmentacija spavanja u istraživanju Dulawa i sar. (2004) pokazano je da tretman fluoksetinom (antidepresiv) nakon hronične fragmentacije spavanja dovodi do smanjenja imobilnosti životinja i povećanog trajanja aktivnog plivanja u testu forsiranog plivanja, što je takođe u saglasnosti sa ovim rezultatima. Ovo je prva studija koja je linearno na istim životinjama pratila efekte akutne i hronične fragmentacije spavanja na bihevioralne karakteristike u testu forsiranog plivanja. Konceptualni model Taherija sugerise da smanjena aktivnost zbog umora, povećan unos hrane i metabolički hormoni koji utiču na glad i apetit su važni faktori koji povezuju spavanje sa gojaznošću (Taheri i sar., 2004).

Studije su pokazale da je fragmentacija spavanja povezana sa povećanim unosom hrane i telesnom težinom kako kod ljudi, tako i kod životinja (Mavanji i sar., 2010). Fragmentacija spavanja može poremetiti regulaciju hormona koji su uključeni u kontrolu apetita, poput leptina i grelina, što dovodi do povećanog unosa hrane i povećanja telesne težine (Taheri i sar., 2004). Lee i sar. (2016) su proučavali povezanost između OSA i oštećenja autobiografske memorije, što predstavlja marker depresije. Studija je pokazala da se pacijenti sa OSA, koji su imali simptome depresije, znatno slabije sećaju specifičnih događaja u poređenju sa zdravim kontrolama. Modifikovani test uzdignutog krstastog lavirinta u našoj studiji je pokazao kognitivni pad kod pacova koji su podvrgnuti fragmentaciji spavanja. To se manifestovalo u vidu produženog vremena koje je pacovima bilo potrebno za tranziciju iz otvorenih u zatvorene krake lavirinta u T2 sekvenci, što ukazuje na smanjene sposobnosti učenja i pamćenja. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem koje su sprovedi Vecsey i sar. (2012) u kome je proučavan genomski uticaj disrupcije spavanja u hipokampusu miševa. Istraživanje koje su sprovedi Abel i sar. (2013) istaklo je vezu između spavanja i konsolidacije pamćenja.

Autori su diskutovali o tome kako određene oscilacije u sporotalasnom spavanju (NREM) pre kodiranja mogu poboljšati kapacitet učenja hipokampusa kod ljudi. Vraćajući se na proučavanje eksperimentalnog neuroendokrinog modela depresije/anksioznosti, koji navodi da su glavni mehanizmi koji leže u pozadini alteracije ponašanja i spavanja verovatno posledica hroničnog tretmana kortikosteronom koje pokreće negativnu povratnu spregu na HPA osovину, možemo analizirati potencijalne mehanizme uključene u disregulaciju spavanja. Kod osoba koje boluju od depresije dokazan je povišen nivo kortizola u krvi, ali i u drugim uzorcima poput urina i salive gde je kortizol slobodan, nevezan za proteinske nosače (Stetler i sar., 2011; Rodenbeck i Hajak, 2001), ali pojačana

funkcija HPA osovine ne mora nužno nastati kao posledica depresivnih promena u ponašanju. Hiperaktivnost može nastati i pre nastupanja depresivnih poremećaja zbog neurobioloških abnormalnosti koje su prethodile razvoju depresivnog oboljenja (Pariante, 2008).

Dodatni faktor koji doprinosi razvoju ponašanja sličnog depresiji je nizak nivo testosterona, što je primećeno kod pacova izloženih fragmentaciji spavanja u ovoj studiji. Pojedina klinička istraživanja daju dokaze koji ukazuju da testosteron ima anksiolitičku i antidepresivnu ulogu, i potencijalno se može koristiti za poboljšanje raspoloženja i mentalnog zdravlja (Morsink i sar. 2007; Giltay i sar., 2021). U poslednjih nekoliko godina, različita istraživanja su ispitivala kako proizvodnja novih ćelija i njihov razvoj u neurone bivaju pogođeni kvalitetom spavanja i gubitkom istog. Iako prekidi spavanja u periodu kraćem od jednog dana imaju malo uticaja na osnovnu stopu proliferacije ćelija, produžena restrikcija ili prekidi spavanja mogu imati kumulativne efekte koji dovode do značajnog smanjenja proliferacije ćelija, preživljavanja ćelija i neurogeneze u hipokampusu.

Posebno je važno napomenuti da iako kratkotrajna deprivacija spavanja možda ne utiče na osnovnu stopu proliferacije ćelija, jedno istraživanje na pacovima pokazuje da čak i blaga restrikcija sna može ometati povećanje neurogeneze koje se normalno dešava tokom učenja zavisnog od hipokampusa (Meerlo i sar., 2009). Smanjenje proliferacije ćelija i smanjenje postotka ćelija koje se diferenciraju u neurone su dva faktora koji mogu doprineti smanjenoj neurogenezi u modelu deprivacije spavanja kod pacova (Guzman-Marin i sar., 2005). Kod pacijenata sa hroničnom insomnijom, povećani su markeri oštećenja astrocita (Zhang i sar., 2020). Kod pacova kojima je deprivirano spavanje u trajanju od 5 dana, astrociti su hipertrofisali sa pojačanom imunoreaktivnošću GFAP (Hsu i sar., 2003). Međutim, ovi rezultati nisu pokazali nikakve razlike u ekspresiji DCX i Ki67 u hipokampusu, što sugerise da u ovom modelu fragmentacije spavanja nisu primećene promene u neurogenezi i proliferaciji neurona.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Radovi in extenso u časopisima sa JCR liste:

1. **Grubač, Ž.**, Šutulović, N., Šuvakov, S., Jerotić, D., Puškaš, N., Macut, D., Rašić-Marković, A., Simić, T., Stanojlović, O., & Hrnčić, D. (2021). Anxiogenic potential of experimental sleep fragmentation is duration-dependent and mediated via oxidative stress state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2262913. (**M21, IF 7,310**)
2. **Grubač, Ž.**, Šutulović, N., Jerotić, D., Šuvakov, S., Rašić-Marković, A., Macut, D., Simić, T., Stanojlović, O., & Hrnčić, D. (2021). Experimental chronic sleep fragmentation alters seizure susceptibility and brain levels of interleukins 1 β and 6. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Warsaw)*, 81(1), 96-109. (**M23, IF 1,527**)

3. **Grubač, Ž.**, Šutulović, N., Ademovic, A., Velimirovic, M., Rašić-Marković, A., Macut, D., Petronijevic, N., Stanojlovic, O., & Hrnčić, D. (2019). Short-term sleep fragmentation enhances anxiety-related behavior: The role of hormonal alterations. *PloS One*, 14(7), e0218920. (M21, IF 2,726)
4. Hrnčić, D., **Grubač, Ž.**, Rašić-Marković, A., Šutulović, N., Šušić, V., Bjekić-Macut, J., & Stanojlović, O. (2016). Sleep disruption increases seizure susceptibility: Behavioral and EEG evaluation of an experimental model of sleep apnea. *Physiology & Behavior*, 155, 188-194. (M22, IF 2.635)

Pregledni rad u časopisu Medicinski podmladak:

1. **Grubač, Ž.**, Jovanović, Đ., Puškaš, N., & Hrnčić, D. (2018). Poremećaji spavanja i depresija - povezanost i mehanizmi interakcije. *Medicinski Podmladak*, 69(3), 48-55.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Fragmentacija spavanja izazvana eksperimentalno po modelu apneje u spavanju: bihejvioralne, elektrofiziološke, biohemijske i strukturne promene“ dr Željka Grubača, predstavlja prvu eksperimentalnu studiju koja je ispitala efekata akutne, subakutne i hronične fragmentacije spavanja, u kojoj su utvrđene biohemijske i funkcionalne, imunohistohemijske promene CNS. Doktorska disertacija je urađena prema principima naučnog istraživanja uz poštovanje svih etičkih načela. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci. Bihejvioralne, elektroencefalografske, biohemijske i strukturne promene u mozgu do kojih dovodi fragmentacija spavanja nisu dovoljno ispitane. Opstruktivna apneja u spavanju je oboljenje sa visokom prevalencom i uvek je udružena sa fragmentacijom spavanja. Češće se javlja kod muškaraca, a prevalenca oboljenja se povećava sa godinama starosti.

Rezultati translacionog istraživanja ove doktorske disertacije doprinose razumevanju fragmentacije spavanja kod pacijenata sa apnejom u spavanju kao i pojavu neuroloških (epilepsija) i psihijatrijskih oboljenja (anksioznost i depresija) i drugih pridruženih bolesti. Rezultati sprovedenih eksperimentalnih istraživanja dobijenih savremenim neurofiziološkim, biohemijskim i imunohistohemijskim metodama, pružaju uvid u potencijalne mehanizme putem kojih fragmentacija spavanja deluje na ponašanje, kognitivni kapacitet kao i bioelektričnu aktivnost mozga. Ova teza ukazuje na moguće poboljšavanje kvaliteta života pacijenata putem razvijanja strategija i traženjem potencijalnih terapijskih tretmana.

Na osnovu svega navedenog i imajući u vidu dobijene rezultate eksperimentalnog istraživanja kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Željka Grubača i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd,
25.09.2023. godine

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Olivera Stanojlović

Prof. dr Tatjana Simić

Prof. dr Aleksandra Rašić-Marković

Prof. dr Dušan Mladenović

Prof. dr Vesna Martić Popović

MENTORI:

Prof. dr Dragan Hrnčić

Prof. dr Nela Puškaš