

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog Veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.06.2019. godine, imenovana je komisija za ocenu završne doktorske disertacije pod naslovom:

„Efekti dugotrajne primene antipsihotika na redoks regulaciju u animalnom modelu shizofrenije“

kandidata dr Tihomira Stojkovića, zaposlenog na Medicinskom fakultetu u Beogradu u zvanju asistenta na predmetu Medicinska i klinička biohemija. Mentor doktorske disertacije je prof. dr Nataša Petronijević, a komentor prof. dr Nela Puškaš.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivanka Marković, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Doc. dr Maja Ivković, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu

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 Tihomira Stojkovića napisana je na ukupno 154 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalaze ukupno 4 tabele i 21 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o mentoru, komentoru i komisiji, biografiju kandidata i spisak korišćenih skraćenica.

U **uvodu** je opisana klinička slika shizofrenije i navedeni su epidemiološki podaci o bolesti. Detaljno su prikazani najvažniji etiopatogenetski faktori bolesti, kao i morfološke, neurohemijske i neurofiziološke promene prisutne kod obolelih od shizofrenije. Objasnjen je mehanizam dejstva antipsihotika, lekova koji se koriste u terapiji shizofrenije, kao i njihovi

neželjeni efekti. Detaljno je objašnjena struktura i funkcija glutamatnih receptora i njihovog nekompetitivnog antagoniste fenciklidina, kao i način na koji fenciklidin učestvuje u modelovanju shizofrenije i omogućava konstruisanje animalnog modela baziranog na dve hipoteze o nastanku shizofrenije - glutamatnoj i neurorazvojnoj.

Takođe, dat je detaljan osvrt na savremena saznanja o oksidativnom stresu i redoks regulaciji u ćeliji. Opisane su najznačajnije reaktivne vrste kiseonika i azota, kao i njihovi mogući izvori u fiziološkim i patološkim uslovima. Objašnjeni su mehanizmi antioksidativne zaštite, posebno uloga antioksidativnih enzima i glutationa. Detaljno je objašnjena struktura i funkcija NADPH oksidaze i značaj ovog enzima u različitim ćelijskim procesima. Na kraju, navedeni su najvažniji rezultati istraživanja povezanosti oksidativnog stresa i shizofrenije.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Sastoje se iz ispitivanja uticaja dugotrajne primene antipsihotika haloperidola i risperidona na parametre oksidativnog stresa i redoks regulacije u mozgu pacova nakon perinatalne primene fenciklidina. Ciljevi rada bili su ispitivanje uticaja hronične terapije antipsihoticima na pokazatelje antioksidativnog oštećenja i aktivnost najznačajnijih antioksidativnih enzima, metabolizam glutationa i aktivnost enzima uključenih u njegov metabolizam, metabolite azot-monoksida i ekspresiju izoenzima sintaze azot-monoksida, aktivnost pojedinih enzima respiratornog lanca i ekspresiju membranskih i citosolnih subjednica enzima NADPH oksidaze.

U poglavlju **Materijal i metode** je opisan tok eksperimenta, uključujući vrstu korišćenih eksperimentalnih životinja i protokol tretiranja životinja perinatalno fenciklidinom i potom dugotrajnom oralnom terapijom antipsihoticima. Navedene su procedure uzorkovanja tkiva prefrontalnog korteksa i hipokampusu i detaljno opisane metode spektrofotometrijske analize, *Western blot* metoda i imunohistohemijske metode kojima su analizirani parametri navedeni u ciljevima rada.

Poglavlje **Rezultati** sadrži detaljan i jasan tekstualni, tabelarni i grafički prikaz dobijenih rezultata.

Diskusija je napisana pregledno i sistematski su izneti podaci drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Poglavlje **Zaključci** sadrži sažet prikaz najvažnijih nalaza koji su proistekli iz rezultata istraživanja.

Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 344 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati doktorske disertacije pokazali su da perinatalna primena fenciklidina dovodi do dugoročnih efekata na redoks status u prefrontalnom korteksu i hipokampusu eksperimentalnih pacova, što uključuje povećanje koncentracije malondialdehida kao markera lipidne peroksidacije, kao i smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid dizmutaze i glutation peroksidaze. Takođe, pokazano je smanjenje količine ukupnog glutationa uz smanjenje aktivnosti regulatornog enzima njegove sinteze γ -glutamilstein ligaze i povećanje oksidativne forme glutationa. U ispitivanim strukturama zapaženo je i smanjenje metabolita azot-monoksida nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom.

Dugotrajna oralna terapija ispitivanim antipsihoticima haloperidolom i risperidonom uticala je na povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima, normalizaciju nivoa ukupnog glutationa i aktivnost γ -glutamilstein ligaze. Haloperidol je u mitohondrijama doveo do smanjenja ekspresije superoksid dizmutaze. Antipsihotici nisu pokazali značajan efekat na nivo metabolita azot-monoksida. Haloperidol je za razliku od risperidona uzrokovao smanjenje ekspresije neuronalne azot-monoksid sintaze. Perinatalna primena fenciklidina nije bila praćena dugoročnim efektima na aktivnost enzima respiratornog lanca. Haloperidol je uzrokovao smanjenje ekspresije citohrom c oksidaze u prefrontalnom korteksu. Pokazana je povećana ekspresija membranskih subjedinića NADPH oksidaze (gp91phox i p22phox) nakon perinatalne primene fenciklidina, dok je upotreba antipsihotika dovela do reverzije ovih promena. Ekspresija aktivnišuće citosolne subjediniće NADPH oksidaze (p67phox) u obe moždane strukture bila je povišena nakon primene fenciklidina.

Rezultati doktorske disertacije ukazuju na povećanje ekspresije subjedinića NADPH oksidaze uz normalnu aktivnost enzima respiratornog lanca što sugerise da ovaj enzim može biti glavni izvor narušene redoks ravnoteže nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom i potencijalna meta za razvoj novih terapijskih strategija u lečenju shizofrenije. Dugotrajna oralna primena haloperidola i risperidona ne izaziva oksidativni stres u korteksu i hipokampusu, a nakon perinatalnog tretmana fenciklidinom pokazuje i određene antioksidativne efekte.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Uloga oksidativnog stresa i promenjenog redoks statusa je zapažena u brojnim istraživanjima patogeneze shizofrenije. Prva pretpostavka o povezanosti oksidativnog stresa i shizofrenije je postavljena sredinom prošlog veka (Hoffer i sar., 1954). U literaturi se mogu

naći dokazi o postojanju oksidativnih oštećenja različitih biomolekula kod obolelih od shizofrenije kao posledice oksidativnog stresa koji nastaje u sklopu patogenetskih procesa ove bolesti, a nekada i same terapije. Podaci iz literatute ukazuju na promene kod obolelih koje su zapažene prvenstveno indirektnim metodama, određivanjem parametara oksidativnog stresa, uključujući antioksidativne enzime i druge antioksidanse, u krvi obolelih (Wood i sar., 2009; Wu i sar., 2013). Najčešće određivani parametar enzimske antioksidativne zaštite je superoksid dizmutaza, a podaci iz literature nisu uvek jednosmerni. Meta-analiza sprovedena od strane Flatow i sar. (2013) ukazuje na snižene vrednosti aktivnosti periferne superoksid dizmutaze kod pacijenata nezavisno od faze bolesti. Pored toga, zapažene su promene u aktivnosti drugih antioksidativnih enzima (Flatow i sar., 2013; Wu i sar., 2013). Rezultati ovog rada pokazuju da je perinatalna primena fenciklidina dovela do značajnog smanjenje aktivnosti superoksid dizmutaze i ekspresije citosolnog izoenzima, dok se ekspresija mitohondrijalnog izoenzima nije menjala. Sa druge strane, nije zapažen efekat na aktivnost katalaze, kao drugog važnog enzima antioksidativne zaštite. Takođe, rezultati ove studije su pokazali da haloperidol uzrokuje smanjenje aktivnosti i ekspresije superoksid dizmutaze, naročito izraženo u korteksu, dok risperidon na opisan način deluje na obe strukture.

Kod obolelih je takođe uočeno smanjenje važnih antioksidanasa u plazmi, poput bilirubina ili mokraćne kiseline, kako u prvoj epizodi bolesti (Reddy i sar., 2003), tako i kod hroničnih pacijenata (Yao i sar., 2000). Ukupni antioksidativni status plazme je smanjen kod obolelih u aktunoj fazi bolesti (Li i sar., 2011), sa postojanjem negativne korelacije sa negativnim simptomima shizofrenije i pojedinim kognitivnim deficitima (Zhang i sar., 2012). Kada je reč o aktivnosti glutatation peroksidaze u krvi pacijenata koji boluju od shizofrenije, većina istraživanja govori u prilog smanjenju aktivnosti glutatation peroksidaze. Niža aktivnost glutatation peroksidaze zapažena je kod pacijenata na početku bolesti pre primene terapije (Bai i sar., 2018), nakon kratkotrajne primene terapije (Ruiz-Litago i sar., 2012) i kod hroničnih pacijenata na dugotrajnoj terapiji (Zhang i sar., 2006). Bai i sar. (2018) pronašli su da hronična terapija povećava aktivnost glutatation peroksidaze. Rezultati doktorske disertacije pokazali su da u hipokampusu perinatalna primena fenciklidina dovodi do smanjenja aktivnosti ovog enzima, a haloperidol i risperidon dovode do reverzije zapaženih promena.

Smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima pokazano je i u studijama na animalnim modelima shizofrenije (Hou i sar., 2013, Réus i sar., 2017, Ben Azu i sar., 2018; Zhang i sar., 2018). U istraživanju Réus i sar. (2018) zapažena je snižena aktivnost superoksid dizmutaze u hipokampusu nakon primene ketamina. Primenom jedinjenja M40403 koje deluje kao mimetik superoksid dizmutaze i značajno smanjuje količinu superoksidnog anjona, dolazi do

sprečavanja nastanka apoptoze kortikalnih neurona i izostanka fenciklidinom posredovane prepulsne inhibicije (Wang i sar., 2003).

Kod obolelih od shizofrenije uočeno je smanjenje količine glutationa u cerebrospinalnoj tečnosti (Do i sar., 2000). Istraživanja na *post mortem* uzorcima pokazuju smanjenje količine ukupnog glutationa u uzorcima prefrontalnog korteksa (Gawryluk i sar., 2011) i *nucleus caudatus*-a (Yao i sar., 2006). Rezultati ove doktorske disertacije takođe ukazuju na smanjenju količine ukupnog glutationa i izraženi porasta oksidovane forme glutationa u obe ispitivane moždane strukture.

U studijama koje su kod obolelih od shizofrenije pratile koncentraciju azot-monoksida ili metabolita NO u krvi pacijenata mogu se naći različiti podaci. U meta analizi Maia-de-Oliveira i sar. (2012) nije uočena razlika u sadržaju nitrita u plazmi obolelih u odnosu na zdrave ispitanike, ali je pokazano da terapija antipsihoticima dovodi do povećanja nivoa NO. Sa druge strane, u studiji Ramirez i sar. (2004) zapaženo je smanjenje koncentracije NO u cerebrospinalnoj tečnosti obolelih, što bi ukazivalo na smanjenu produkciju NO u mozgu pacijenata. Ovaj nalaz jeste u saglasnosti sa rezultatima ove studije koji takođe sugerišu smanjenje NO kao dugotrajnu posledicu perinatalnog tretmana fenciklidinom. fenciklidin nije pokazao uticaj na ekspresiju nijednog izoenzima azot-monoksid sintaze što ukazuje na to da je ukoliko postoji smanjena sinteza azot-monoksida ona posredovana drugim mehanizmima, a ne preko regulacije količine enzima. Dodatno, rezultati pokazuju da je haloperidol uzrokovao smanjenje ekspresije neuronalne azot-monoksid sintaze.

Prvi dokazi o povezanosti NADPH oksidaze (NOX) i shizofrenije potiču iz istraživanja na ketaminskom modelu shizofrenije i studije Behrens i sar. (2007) kojom je pokazano da ketamin dovodi do povećane ekspresije, kao i aktivnosti NADPH oksidaze in vitro na kulturi neurona, kao i in vivo u mozgu eksperimentalnih miševa i posledično povećava produkciju superoksidnog anjona što direktno uzrokuje smanjenje ekspresije GAD67 odgovornog za sintezu GABA u subpopulaciji parvalbumin-pozitivnih GABAergičkih interneurona, čija se disfunkcija smatra odgovornom za neurokognitivne defekte koji se viđaju u shizofreniji. Istovremeno, primenom inhibitora NOX-a ovaj efekat ketamina na parvalbumin-pozitivne interneurone izostaje. Dodatno, ista grupa autora pokazala je da svoje dejstvo na NOX2 ketamin ostvaruje prvenstveno posredstvom IL-6 (Behrens i sar., 2008). Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da perinatalna primena fenciklidina dovodi do dugoročnog efekta povećanja ekspresije membranskih subjedinica gp91phox i p22phox, kao i citosolne subjedinice p67phox NADPH oksidaze u prefrontalnom

korteksu i hipokampusu. Nakon primene haloperidola i risperidona izostaje povećanje ekspresije NOX2 izoenzima, pri čemu haloperidol svoje dejstvo ostvaruje samo u korteksu, za razliku od risperidona koji je efekat pokazao u obe ispitivane strukture. Takođe, upotreba oba antipsihotika dovela je do reverzije povećane ekspresije p22phox nakon primene fenciklidina u hipokampusu.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Stojković Tihomir, Radonjić Nevena, Velimirović Milica, Jevtić Gordana, Popović Vera, Doknić Mirjana, Petronijević Nataša. Risperidone reverses phencyclidine induced decrease in glutathione levels and alterations of antioxidant defense in rat brain. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2012;39(1):192-9.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija “Efekti dugotrajne primene antipsihotika na redoks regulaciju u animalnom modelu shizofrenije” dr Tihomira Stojkovića predstavlja originalni naučni doprinos i prva je studija u kojoj je uporedno praćen uticaj dugotrajne oralne terapije haloperidolom kao tipičnim i risperidonom kao atipičnim antipsihotikom na parametre oksidativnog stresa i redoks statusa u mozgu pacova u perinatalnom fenciklidinskom modelu shizofrenije. Ispitivani su mitohondrijalni enzimi – kompleks I i kompleks IV i membranski enzim NADPH oksidaza, koji mogu biti značajni generatori superoksidnog anjona. Ispitivana je njihova uloga u redoks disregulaciji u shizofreniji kao i dugoročni uticaj antipsihotika na aktivnost ili ekspresiju ovih enzima. Nalaz povećane ekspresije membranskih subjedinica NADPH oksidaze nakon perinatalne primene fenciklidina i reverzija ovih promena nakon primene antipsihotika, govori u prilog tome da sagledavanje funkcije NADPH oksidaze može dovesti do stvaranja novih ili unapređenja postojećih strategija u lečenju shizofrenije. S obzirom na to da je korišćen po jedan predstavnik tipičnih i atipičnih antipsihotika, dobijena razlika u efektima ova dva leka u okviru ove doktorske disertacije mogla bi dodatno objasniti fenomen „atipičnosti“ antipsihotika i potencijalnu vezu između redoks regulacije i različitih farmakoloških dejstava ovih lekova.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. 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.

Na osnovu svega navedenog i uzimajući u obzir dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Tihomira Stojkovića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 15.07.2019. godine

Mentor:

Prof. dr Nataša Petronijević

Komentor:

Prof. dr Nela Puškaš

Članovi komisije:

Prof. dr Ivanka Marković

Doc. dr Maja Ivković

Prof. dr Vladimir Jakovljević
