

# NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 16.01.2023. godine, broj 14/XII-3/2-NS, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

## **„Funkcionalne i biohemijske promene centralnog nervnog sistema u eksperimentalnom modelu hroničnog pelvičnog bola“**

kandidata dr Nikole Šutulović, zaposlenog na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

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

Komentor je Doc. dr Sonja Šuvakov, Mayo Clinic, Rochester, USA.

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 Zoran Džamić**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
5. **Prof. dr Silvana Andrić**, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet

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 Nikole Šutulović napisana je na srpskom jeziku, u skladu sa Statutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu. Sadrži ukupno 235 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci, literatura i prilozi. U disertaciji se nalaze ukupno 4 tabele, 44 slike, 67 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 doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** su opisani aktuelna definicija, klasifikacija, epidemiološke karakteristike, klinička slika i dijagnostički kriterijumi hroničnog prostatitisa/sindroma hroničnog pelvičnog bola (eng. chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome, CP/CPPS). Na posebno detaljan način iznete

su do sada poznate činjenice o etiopatogenetskim mehanizmima koji mogu biti u osnovi nastanka CP/CPPS, sa posebnim osvrtom na ulogu inflamatornih procesa, neurofizioloških mehanizama, endokrinih, genetskih i psihosocijalnih faktora. Dat je iscrpan pregled eksperimentalnih modela ove bolesti i istaknut njihov značaj sa aspekta razvoja novih terapijskih modaliteta, a dat je i prikaz postojećih terapijskih strategija. U daljim razmatranjima su opisani komorbiditeti ovog sindroma sa posebnim razmatranjem anksioznosti, depresije, kognicije i ekscitabilnosti CNS. Potom je do detalja razmatrana uloga neuroinflamacije u patogenezi CP/CPPS sa opisom uloge glija ćelija, citokina, hemokina, krvno-moždane barijere, adhezionih molekula, endokrinih osovina, oksidativnog stresa, adultne neurogeneze i astrocitne aktivacije u ovom procesu. U sklopu potencijalnih novih terapijskih pristupa, u uvodu je takođe dat pregled literature i razmatranje uloge ugljen-monoksida (CO) kao gasotransmitera, opisana su njegova endogena sinteza i fiziološke uloge. Takođe su opisani efekti fizičke aktivnosti na zdravlje, sa posebnim akcentom na uticaj na CNS i modulaciju bola uz razmatranja o fizičkoj aktivnosti u eksperimentalnim uslovima. Detaljnim prikazom trenutno poznatih relevantnih rezultata različitih studija i konciznim opisom poznatih činjenica o etiopatogenezi, terapiji i komorbiditetima CP/CPPS, uvodnim izlaganjem je postavljena dobra osnova zadatim ciljevima ove doktorske disertacije.

**Ciljevi rada** su precizno formulisani, a sastoje se od ispitivanja elektroencefalografskih i bihevioralnih karakteristika epileptičnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana; utvrđivanja postojanja promena ponašanja povezanih sa anksioznošću i depresijom, kao i promena u kognitivnim sposobnostima; ispitivanja biohemijskih parametara oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i nivoa proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$  i IL-6) u serumu, prostati, hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu, kao i ekspresije proteina ICAM-1 u pomenutim moždanim strukturama; utvrđivanja nivoa hormona kortikosterona i testosterona 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 markera inhibitornih interneurona (PV); utvrđivanja efekata modulacije nivoa CO (primenom CO donora CORM-A1) na elektroencefalografske i bihevioralne promene; i ispitivanju efekata hronične aerobne fizičke aktivnosti na tredmilu na elektroencefalografske i bihevioralne promene.

U poglavlju **Materijal i metode** su jasno izneti detalji eksperimentalnog dizajna i korišćenih savremenih metoda i tehnika. Opisani su eksperimentalni protokoli za: 1. ispitivanje funkcionalnih, bihevioralnih, biohemijskih i imunohistohemijskih promena u CNS i podložnosti razvoju hiperekscitabilnosti u eksperimentalnom modelu CP/CPPS; 2. modulaciju nivoa CO i ispitivanje efekata na CP/CPPS; i 3. ispitivanje uticaja hronične aerobne fizičke aktivnosti na tredmilu na CP/CPPS. 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 ogleđnih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br. 4175/2) i Rešenjem nadležnog ministarstva Republike Srbije (br. 323-07-01339/2017-05/3). Indukcija eksperimentalnog CP/CPPS je sprovedena uz pomoć hirurške procedure koja je u skladu sa načelima dobre laboratorijske prakse i intraprostatične injekcije 3% karagenina. Kontrolne životinje su tretirane na isti način sterilnim fiziološkim rastvorom. Navedeno je da su pre početka, ali i tokom istraživačkog perioda, sve životinje bile pod stalnim praćenjem, pri čemu su na dnevnom nivou mereni dnevni prirast u telesnoj masi i dnevni unos hrane. Opisan je metod merenja skrotalnog praga bola na mehaničku draž, kao i metode bihevioralnih ispitivanja u cilju analize ponašanja povezanog sa anksioznošću i depresijom, kao i za ispitivanje kognitivnih funkcija. Opisan je način izvođenja testa svetlo/tama, testa

uzdignutog krstastog lavirinta, testa otvorenog polja, testa forsiranog plivanja i modifikovanog testa uzdignutog krstastog lavirinta. 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 $\beta$  i IL-6 i hormona u serumu ELISA tehnikom, određivanje parametara oksidativnog stresa u strukturama mozga i utvrđivanje nivoa ekspresije proteina ICAM-1 u strukturama moga izvođenjem *Western blot* analize. Dat je detaljan pregled eksperimentalnih procedura za utvrđivanje bihevioralnih i elektroencefalografskih karakteristika konvulzivnog ponašanja u proceni ekscitabilnosti CNS. Opisan je metod implantacije registrujućih EEG elektroda, procesi akvizicije i analize EEG zapisa. Opisan je standardni histološki metod za ispitivanje inflamatornih promena u tkivu prostate u cilju definitivne potvrde uspešnosti indukcije eksperimentalnog CP/CPPS. Opisana je imunohistohemijska tehnika analize hipokampusu sa opisom procedure pripreme isečaka za bojenje, imunohistohemijskog bojenja i kvantifikovanja ekspresije markera Ki-67, DCX, GFAP i PV. Na kraju ovog poglavlja je dat pregled korišćenih statističkih testova.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati. Dobijeni rezultati predstavljeni su pravilno i u najvećoj meri grafički uz adekvatan prateći opis.

**Diskusija** je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. Jasno je sumiran i prodiskutovan značaj dobijenih rezultata uz njihovo dovođenje u međusobnu vezu i razmatranje mehanicističkih aspekata etiopatogeneze CP/CPPS i komorbiditeta ovog sindroma. Razmotreni su i mehanizmi modulatornog efekta CO i hronične aerobne fizičke aktivnosti na tredmilu.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada, a konzistentni su sa postavljenim ciljevima istraživanja.

Pregled korišćene **Literature** sadrži spisak od 698 reference.

## **B) Kratak opis postignutih rezultata**

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je kod životinja koje su bile tretirane intraprostatičnom injekcijom  $\lambda$ -karagenina došlo do razvoja CP/CPPS koji je bio praćen promenama u funkcionalnim testovima za evaluaciju glavnih simptoma ovog sindroma i dokazan histološkom verifikacijom pokazujući tipične patohistološke znake zapaljenja prostate koji se manifestuju intersticijalnom leukocitnom infiltracijom, proliferacijom, deskvamacijom ćelija i leukocitnom infiltracijom tubulo-alveolarnih žlezdi, kao i hijalinizacijom i fokalnom nekrozom u intersticijumu. Sa druge strane, Sham životinje koje su tretirane intraprostatičnom injekcijom 0,9% NaCl nisu razvile zapaljenje prostate, što potvrđuje nenarušena histološka građa prostate. Funkcionalno, postoperativno merenje praga bola je pokazalo da su CP/CPSS životinje, u odnosu na kontrolne, pokazivale statistički značajnu redukciju skrotalnog praga bola na mehanički stimulus u 3. i 7. postoperativnom danu. Biohemijska ispitivanja su pokazala da 7. postoperativnog dana od intraprostatične injekcije karagenina u tkivu prostate postoje povišene vrednosti IL-1 $\beta$ , glavnog proinflamatornog citokina koji se povezuju sa patogeneom simptoma CP/CPPS. Istovremeno, postojala je i smanjena ekspresija IL-6 koja ukazuje na hronicitet ovog procesa u tkivu prostate. Procena konvulzivnog ponašanja i EEG analiza su pokazali da je kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS pri administraciji subkonvulzivne doze lindana došlo do povećane sklonosti ka nastanku epileptičnih napada, što se ogleda kroz veću incidencu, kraći latentni period, veći intenzitet napada, kao i veći broj EEG iktalnih perioda kod životinja sa CP/CPPS, u odnosu na kontrolne životinje bez prostatitisa. U EEG iktalnim periodima je

dominirala bioelektrična aktivnost niže frekvencije, ali je udeo aktivnosti koji pripada alfa ritmu (7-15 Hz) takođe bio visok. Nakon indukcije eksperimentalnog CP/CPPS, upotrebom standardne baterije 3 etološka testa, pokazano je postojanje ponašanja povezanog sa anksioznošću u 3. i 7. postoperativnom danu, dok su obrasci ponašanja bili nepromenjeni drugog dana nakon operacije. Kod CP/CPPS pacova, u odnosu na Sham kontrole, u testu otvorenog polja je dokazana promena sledećih varijabli: smanjena distanca ambulatornog kretanja i vreme ambulatornog kretanja (parametri horizontalne lokomotorne aktivnosti), smanjen broj propinjanja na zadnje ekstremitete (parametar vertikalne lokomotorne aktivnosti), veći indeks tigmotaksije i kraće vreme provedeno u centru otvorenog polja. Preostala dva testa iz ove baterije su pokazala kongruentne rezultate. Naime, tokom testa uzdignutog krstastog lavirinta je opservirano da su CP/CPPS životinje, u odnosu na Sham životinje, provele manje vremena u otvorenim kracima lavirinta, a takođe i napravile manji broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta. Tokom testa svetlo/tama, kod CP/CPPS životinja je u istim vremenskim tačkama konstatovano manje vremena provedenog u svetlom kompartmanu i smanjen broj tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana. Kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS je pokazano i ispoljavanje ponašanja povezanog sa depresijom jer je u testu forsiranog plivanja, 7. postoperativnog dana, pokazano da, u odnosu na kontrolne životinje, dominira imobilizacija (flotiranje) koja je indikator ponašanja povezanog sa depresijom. Takođe, kod CP/CPPS životinja, u istoj vremenskoj tački utvrđeno je oštećenje kognitivnih funkcija spacijalne memorije i orijentacije, koje se manifestovalo kao produženje latence ulaska u zatvoreni krak prilikom izvođenja modifikovanog testa uzdignutog krstastog lavirinta. Biohemijska analiza ekspresije proinflatornih citokina je pokazala da su postojale povišene vrednosti citokina IL-1 $\beta$  i IL-6 u korteksu i talamusu životinja sa CP/CPPS, dok značajne razlike nije bilo u hipokampusu. Analiza parametara oksidativnog stresa je pokazala da kod životinja sa CP/CPPS postoji povećanje MDA kao markera lipidne peroksidacije u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu, dok su enzimi antioksidativne zaštite (SOD i GPx), kao i koncentracija P-SH pokazivali snižene vrednosti u ovim strukturama. Stepenn oksidativnog stresa je korelirao sa stepenom ponašanja povezanog sa anksioznošću. Takođe, kod pacova sa eksperimentalno izazvanim CP/CPPS u talamusu i moždanom korteksu postoji povećana ekspresija proteina ICAM-1, u odnosu na kontrolne životinje, dok razlika u ICAM-1 ekspresiji u hipokampusu nije bila statistički značajna. Rezultati hormonskih analiza su pokazali povišene koncentracije kortikosterona i smanjene koncentracije testosterona u serumu kod pacova sa CP/CPPS, koje su korelirale sa stepenom ponašanja povezanog sa anksioznošću. Analiza broja inhibitornih interneurona u hipokampusu je pokazala da kod pacova sa eksperimentalnim CP/CPPS postoji smanjenje broja PV+ interneurona u CA1, CA2/3 regionima i dentatnom girusu (DG) hipokampusu. Sem toga, regresiona analiza kod pacova iz grupe CP/CPPS je pokazala da je smanjenje broja PV+ interneurona u CA2/3 regionu i DG koreliralo sa povećanjem intenziteta ponašanja povezanog sa anksioznošću u sva tri etološka testa za utvrđivanje anksioznosti. Analiza aktivacije glija ćelija u hipokampusu pacova sa CP/CPPS, je pokazala povećanu zastupljenost GFAP koji je marker aktiviranih astrocita. Takođe, kod životinja sa prostatitisom pokazana je smanjena ekspresija Ki-67 markera proliferacije, kao i DCX markera mladih neurona u hipokampusu, što upućuje da je kod CP/CPPS životinja postojao smanjen obim adultne neurogeneze u hipokampusu. Rezultati koji su dobijeni istraživanjem efekata sedmodnevnog postoperativnog tretmana donorom CO, CORM-A1, su pokazali da je došlo do ublažavanja razvoja mehaničke alodinije i manje devijacije skrotalnog praga bola kod CORM-A1 tretiranih pacova sa CP/CPPS. Ponašanje povezano sa anksioznošću i depresijom je bilo

manje izraženo u pomenutim etološkim testovima kod CORM-A1 tretiranih pacova sa CP/CPSS. Hiperekscitabilnost CNS koja je opservirana kod životinja sa prostatitisom je bila manje izražena kod onih koje su postoperativno tretirane CORM-A1, što je zaključeno na osnovu bihevioralnih i EEG manifestacija konvulzija izazvanih lindanom. Histološka analiza prostate je potvrdila razvoj prostatitisa kod pacova tretiranih intraprostatičnom injekcijom  $\lambda$ -karagenina, kako onih koji su postoperativno dobijali CORM-A1, a tako i kod onih koji su postoperativno tretirani injekcijama rastvarača. Međutim, CORM-A1 je doveo do smanjenja parametara inflamacije u tkivu prostate. Životinje koje su prošle tridesetodnevni trening na trenažer, odnosno tokom 30 preoperativnih dana bile izložene aerobnoj fizičkoj aktivnosti na trenažer, u odnosu na životinje koje su bile sedentarne, posedovale su umanjeno ponašanje povezano sa anksioznošću i depresijom, manju ekscitabilnost CNS, manji inflamatorni odgovor u tkivu prostate i manji stepen mehaničke alodinije.

### C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Hronični prostatitis/sindrom hroničnog pelvičnog bola je klinički sindrom koji se najčešće manifestuje hroničnim genitourinarnim bolom, poremećajima mokrenja, seksualnom disfunkcijom uz odsustvo infektivnih uropatogena (Passavanti i sar. 2017). CP/CPSS je jedan od najučestalijih uroloških problema kod reproduktivno i radno sposobnih muškaraca sa prevalencijom od 2,2% do 25,3% širom sveta (Zhang i sar. 2019b). Kod ovih pacijenata su istovremeno dijagnostikovane brojne promene u CNS, koje se ispoljavaju depresijom i anksioznošću, naglim promenama raspoloženja i promenom ličnosti kao i zloupotrebom lekova, naročito analgetika (Brünahl i sar. 2017). Sve pomenuto ukazuje na tesnu povezanost CP/CPSS i CNS. Eksperimentalni model CP/CPSS koji se indukuje upotrebom  $\lambda$ -karagenina (polisaharid iz algi) je uveden od strane Radhakrishnan i Nallu (Radhakrishnan i Nallu 2009) posebno se ističe među svim modelima ovog sindroma jer izaziva najmanje iritativno oštećenje tkiva, a inflamacija koja nastaje je najbližnja hroničnoj inflamaciji prostate kod ljudi. U istraživanjima ove doktorske disertacije, kandidat je eksperimentalnim postupcima uspešno izazvao navedeni model bolesti uz jasno konfirmaciju upotrebom patohistološkog pregleda prostate koji je dokazao inflamaciju kod eksperimentalnih životinja, uz istovremenu verifikaciju i merenje dinamike razvoja skrotalnog praga bola na mehaničku draž.

CP/CPSS započinje delovanjem nespecifične nokse i lokalnim inflamatornim procesom u prostati, što uzrokuje periferno nervno oštećenje, razvoj neurogenog prostatitisa sa inflamatornim i neuropatskim bolom (Breser i sar. 2017). U ranoj fazi bolesti je povećana ekspresija proinflamatornih medijatora u prostati koji snižavaju prag ekscitacije perifernog nociceptivnog neurona (periferna senzitivizacija) uz specifične manifestacije: hiperalgezija i alodinija (Hu i sar. 2016a). U kasnoj fazi bolesti promene u CNS su odgovorne za postojanje kontinuiranog, spontanog bola (centralna senzitivizacija) (Hu i sar. 2016a). Usled CPSS dolazi do promena u moždanim strukturama (talamus, cerebralni korteks, hipotalamus) koje mogu biti u osnovi neuroloških komorbiditeta (Sadler i Kolber 2016). U rezultatima ove doktorske disertacije su dobijeni kongruentni rezultati po pitanju ekspresije interleukina u prostati. Takođe, daljim biohemijskim analizama je pokazano da u CNS dolazi do alteracija na biohemijskom nivou, te je pokazana povećana ekspresija interleukina 1 $\beta$  i 6, kao i proteina ICAM-1 u strukturama mozga (hipokampus, talamus, cerebralni korteks), čime je data konfirmacija neuroinflamatornog procesa u CNS, čime rezultati ove doktorske disertacije u značajnoj meri doprinose rasvetljavanju etiopatogenetskih mehanizama ovog sindroma.

Uloga oksidativnog stresa u razvoju hroničnog prostatitisa (Hu i sar. 2016b) je opisana u literaturi, ali nema podataka da li CP/CPSS pojačava oksidativni stres izvan tkiva prostate, u udaljenim

tkivima kao što je CNS. Kandidat je svojim istraživanjima pokazao da u pomenutim strukturama mozga dolazi do oksidativnog stresa usled smanjenja kapaciteta antioksidativne zaštite i povećanja markera oksidativnog oštećenja.

Većina kliničkih i epidemioloških studija komorbiditeta je kod obolelih od CP/CPPS ispitivala anksioznost, depresiju i kvalitet života, dok su samo tri uvrstile i analizu kognitivnih funkcija (Nickel i sar. 2008, Riegel i sar. 2014, Naliboff i sar. 2015), iako oboleli od ovog sindroma često prijavljuju tegobe koje se tiču kognitivnih procesa. U eksperimentalnim uslovima je moguće objektivno procenjivanje ponašanja životinja povezano sa anksioznošću i depresijom upotrebom etoloških testova: test otvorenog polja, test svetlost/tama, test forsiranog plivanja kao i test uzdignutog krstastog lavirinta (Hrncic i sar. 2016). Imajući u vidu da 60% obolelih od CP/CPPS razvija simptome anksioznosti, nameće se potreba za animalnim modelom CP/CPPS u cilju rasvetljavanja mehanizma nastanka sindroma kao i odnosa prema CNS. Razmatran je jedan mogući mehanizam nastanka sindroma, a to je disfunkcija osovine hipotalamus-hipofizadububrežna žlezda (Anderson i sar. 2009) kao i promena serumskih nivoa hormona (kortikosteron, testosteron). Bol intenzivno aktivira ovu osovinu i povećava sintezu kortikosterona koji kod eksperimentalnih životinja izaziva promene u ponašanju (Butkevich i sar. 2013). Povećan oksidativni stres u pojedinim strukturama mozga eksperimentalnih životinja dovodi do ponašanja povezanog sa anksioznošću i depresijom i redukcije kognicije. Ova doktorska disertacija je u eksperimentalnim uslovima pokazala i razjasnila postojanje ponašanja povezanog sa anksioznošću kod životinja sa CP/CPPS upotrebom tri različita etološka testa, a primenom odgovarajućih testova je pokazano i postojanje ponašanja povezanog sa depresijom i kognitivna disfunkcija kod ovih životinja. Razmotreni su potencijalni mehanizmi ove opservacije, a disfunkcija endokrinih osovina u ovom eksperimentu se ogledala kroz nalaz smanjene koncentracije testosterona i povećane koncentracije kortikosterona u serumu životinja sa CP/CPPS.

Lečenje CP/CPPS je samo delimično uspešno, često se koriste antiepileptički lekovi (Strauss i Dimitrakov 2010), što ukazuje da je moždana hiperekscitabilnost potencijalno uključena u patogenezu. Kod ovih pacijenata u serumu i tkivu prostate povećani su brojni proinflammatory citokini (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8) (Pontari i Ruggieri 2004). Sa druge strane, neuroinflamacija je značajan mehanizam epileptogeneze i hiperekscitabilnosti koji su preduslov epileptičnih napada (Xu, Miller i Koh 2013). CNS nije imunoprivilegovan organ (Hrncic i sar. 2018), te bi periferna inflamacija sa povećanom sintezom proinflammatory citokina na periferiji mogla narušiti krvno-moždanu barijeru i dovesti do neuroinflamacije, aktivacije mikroglije i astrocita (Silverman i sar. 2015) i nastanka morfoloških, funkcionalnih, bihevioralnih i elektrofizioloških promena u CNS. Mali je broj studija koje istražuju mehanizme epileptogeneze kod perifernih inflamatornih procesa (Riazi i sar. 2008), ne postoje studije koje proučavaju povećanu ekscitabilnost CNS u modelu CP/CPPS. Ova doktorska teza je pokazala da se kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS razvija hiperekscitabilnost CNS, što je demonstrirano potencijacijom bihevioralnih i elektroencefalografskih karakteristika epileptičnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana.

Astrociti učestvuju u razvoju hiperalgezije u CP/CPPS, na šta ukazuje povećana ekspresija markera astrocitne aktivacije, glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (eng. glial fibrillary acidic protein, GFAP) u kičmenoj moždini životinja sa CP/CPPS (Lin, Zhu i Cai 2017). Dentatni girus hipokampusa sadrži progenitorske ćelije koje imaju sposobnost da se kontinuirano diferenciraju u nove neurone što je sposobnost adultne neurogeneze (Ribeiro i Xapelli 2021). Iako GABAergički lokalni interneuroni u neuronskim krugovima hipokampusa čine samo 10-15% njegove ćelijske populacije, njihova anatomsko i fiziološko raznovrsnost im omogućava da regulišu esencijalne procese u obradi signala unutar CNS (Pelkey i sar. 2017). Za sada nije

ispitano da li u višim strukturama CNS postoji alteracija broja inhibitornih interneurona, adultne neurogeneze i ekspresije markera aktivacije astrocита kod pacova sa CP/CPPS. Deo ove teze koji se odnosi na imunohistohemijske analize je dokazao da se kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS može konstatovati smanjenje adultne neurogeneze, povećana aktivacija astrocита u hipokampusu i smanjen broj inhibitornih interneurona hipokampusu. Sve ove opservacije mogu objasniti uzrok nastanka bihevioralnih alteracija kod životinja.

Skorašnja istraživanja na polju uloga gasotransmitera ugljen monoksida (CO) su dokazala jasnu vitalnu važnost CO za koji je pokazano da poseduje ulogu u ćelijskoj komunikaciji, uz dokazano neuromodulatorno, vazodilatatorno, antiagregaciono, antiinflamatorno, antiproliferativno, pa čak i analgetsko dejstvo (Untereiner i sar. 2012). S obzirom da je neuroinflamacija potencijalno uključena u patogenezu CP/CPPS, eksperimentalne studije sa modulacijom nivoa CO kod životinja sa CP/CPPS koje se ne sreću u literaturi bi mogle doprineti rasvetljavanju patogeneze CP/CPPS. Sedentarni način života je poznati faktor rizika za brojne bolesti, sa druge strane redovna, planirana i dozirana fizička aktivnost je značajan faktor prevencije brojnih oboljenja, kao i moždane hiperekscitabilnosti (Hu i sar. 2001; Hrnčić 2015). Mehanizmi uticaja fizičke aktivnosti na bolnu osetljivost nisu dovoljno razjašnjeni (Galdino i sar. 2014). Fizička aktivnost ima jako neuroprotektivno dejstvo (Hrnčić i sar. 2013), ali za sada ne postoje eksperimentalne studije koje ispituju uticaj fizičke aktivnosti na CP/CPPS. Rezultati doktorske teze su jasno demonstrirali da egzogena aplikacija donora molekula CO i hronična aerobna fizička aktivnost na tredmilu dovode do modulacije bihevioralnih promena u CP/CPPS. Pokazano je da je njihovo dejstvo analgetsko, antikonvulzivno, antidepresivno i anksiolitičko. Istovremeno, njihov antiinflamatorni efekat je pokazan na osnovu smanjenja obima inflamacije u tkivu prostate. Na taj način rezultati ove doktorske disertacije doprinose i razjašnjenju potencijalnih terapijskih meta za razvoj terapijskih strategija.

#### **D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

##### ***Radovi in extenso u časopisima sa JCR liste:***

1. **Šutulović N**, Vesković M, Puškaš N, Zubelić A, Jerotić Dj, Šuvakov S, Despotović S, Grubač Ž, Mladenović D, Macut Dj, Rašić-Marković A, Simić T, Stanojlović O, Hrnčić D. Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome Induces Depression-Like Behavior And Learning-Memory Impairment: A Possible Link With Decreased Hippocampal Neurogenesis And Astrocytes Activation. *Oxid Med Cell Longev* 2023; 2023:3199988. **(M21, IF 7,310)**
2. **Šutulović N**, Grubač Ž, Šuvakov S, Jovanović Đ, Puškaš N, Macut Đ, Rašić-Marković A, Simić T, Stanojlović O, Hrnčić D. Experimental Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome Increases Anxiety-Like Behavior: The Role of Brain Oxidative Stress, Serum Corticosterone, and Hippocampal Parvalbumin-Positive Interneurons. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021:6687493. **(M21, IF 7,310)**
3. **Šutulović N**, Grubač Ž, Šuvakov S, Jovanović Đ, Puškaš N, Macut Đ, Rašić-Marković A, Simić T, Stanojlović O, Hrnčić D. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome increases susceptibility to seizures in rats and alters brain levels of IL-1 $\beta$  and IL-6. *Epilepsy Research* 2019; 153:19–27. **(M22, IF 2,491)**
4. Hrnčić D, **Šutulović N**, Grubač Ž, Rašić-Marković A, Stanojlović O. The central nervous system is not imunoprivileged: inflammation and epileptogenesis. *Vojnosanit Pregl* 2018; 75(8):820–825. **(M23, IF 0,405)**

### ***Pregledni rad u časopisu Medicinski podmladak:***

1. **Šutulović N**, Marchini SP, Šuvakov S, Hrnčić D. Glial cells, blood brain barrier and cytokines in seizures: implications for therapeutic modalities. *Medicinski podmladak* 2018; 69(3):33-40.

### ***Originalni rad u časopisu Medicinska istraživanja:***

1. **Šutulović N**, Zubelić A, Macut Dj, Vesković M, Mladenović D, Rašić-Marković A, Grubač Ž, Stanojlović O, Hrnčić D. Physical activity decreases anxiety-related behavior in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: functional behavioral study on the crossroad of experimental exercise physiology and andrology. *Medicinska istraživanja* 2022; 55(3):29-41.

## **E) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije, „**FUNKCIONALNE I BIOHEMIJSKE PROMENE CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA U EKSPERIMENTALNOM MODELU HRONIČNOG PELVIČNOG BOLA**”, autora **Nikole Šutulović**, konstatovano je da podudaranje teksta iznosi **14%**. Ovaj stepen podudarnosti posledica je pretežno naziva korišćenih supstanci i opreme, prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz njegove disertacije, opšte-prihvaćenih fraza, kao i opisa standardnih procedura izvođenja eksperimanata, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije.

## **F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „**Funkcionalne i biohemijske promene centralnog nervnog sistema u eksperimentalnom modelu hroničnog pelvičnog bola**“ dr **Nikole Šutulovića**, predstavlja prvu eksperimentalnu studiju  $\lambda$ -karageninom izazvanog CP/CPPS u kojoj su utvrđene funkcionalne, biohemijske i imunohistohemijske promene CNS uz razumevanje modulatornog efekta CO i hronične aerobne fizičke aktivnosti na etiopatogenezu ovog sindroma i njegovih komorbiditeta. Ova doktorska disertacija je urađena prema svim 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.

Sindrom hroničnog pelvičnog bola je oboljenje sa visokom prevalencijom i uvek je udruženo sa komorbiditetima veznim za mentalno zdravlje koji su u najvećoj meri odgovorni za smanjenje kvaliteta života obolelih. Javlja se kod mladih, reproduktivno i radno sposobnih muškaraca. Bihevioralne, elektroencefalografske, biohemijske i imunohistohemijske promene u mozgu do kojih dovodi hronični pelvični bol do sada nisu bile ispitivane. Rezultati realizovanog istraživanja, dobijeni savremenim neurofiziološkim, biohemijskim i imunohistohemijskim metodama, pružiće uvid u mogućnosti modulacije CP/CPPS, kao i mehanizme putem kojih dolazi do nastanka obrazaca ponašanja karakterističnih za anksioznost, depresiju i kognitivnu disfunkciju, kao i percepciju nociceptivnih stimulusa kod obolelih od CP/CPPS. Ispitani mehanizmi razvoja CP/CPPS i opisanih komorbiditeta, kao i efekti primene CO i hronične



aerobne fizičke aktivnosti bi mogli dati doprinos u pronalaženju adekvatnog terapijskog tretmana ili razvoju strategije za poboljšanje kvaliteta života kod ovih pacijenata.

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 Nikole Šutulović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 10.02.2023. godine

ČLANOVI KOMISIJE:

MENTORI:

---

Prof. dr Olivera Stanojlović

---

Prof. dr Dragan Hrnčić

---

Prof. dr Tatjana Simić

---

Dr sci. med. Sonja Šuvakov

---

Prof. dr Aleksandra Rašić-Marković

---

Prof. dr Zoran Džamić

---

Prof. dr Silvana Andrić