

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 01.12.2016. godine, broj 5940/8 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Mitohondrijalna disfunkcija u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom – Efekat antipsihotika“

kandidata Gordane Jevtić Dožudić, istraživača saradnika zaposlenog na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je Prof. dr Nataša Petronijević. Komentor je Doc. dr Aleksandar Mirčić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Ivanka Marković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Maja Ivković, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Vladimir Jakovljević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta 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 Gordane Jevtić Dožudić napisana je na 128 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija,

zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 19 grafika i 15 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, spisak skraćenica, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su analizirane istorijske pretpostavke o patofiziologiji shizofrenije (SCH) i morfološke promene koje se uočavaju u mozgu obolelih. Pored toga opisan je značaj disregulacije neurotransmisije, posebno glutamata u razvoju bolesti. Detaljno je objašnjena farmakologija fenciklidina, nekompetitivnog antagoniste glutamatergičkih NMDA receptora, njegov efekat na ljude i životinje, kao i način na koji fenciklidin učestvuje u modelovanju ove bolesti i omogućava konstruisanje animalnog modela baziranog na dve hipoteze o nastanku shizofrenije – hipoteze o NMDA receptorskoj hipofunkciji i neurorazvojne hipoteze.

U drugom delu uvoda istaknut je značaj mitohondrija i mitohondrijskog metabolizma u mozgu, kao i posledice koje se javljaju usled njihove disfunkcije u mozgu obolelih od shizofrenije, što se koristi kao deo savremenog pristupa ispitivanja ovog oboljenja. Opisani su kompleksi koji formiraju eletron transportni respiratorni lanac na mitohondrijama i predstavljena je važnost oksidativne fosforilacije u mozgu. Pokazano je da usled strukturnih i funkcionalnih promena mitohondrija može doći do remećenja ćelijske homeostaze kao posledica poremećaja odvijanja procesa apoptoze i/ili autofagije. Opisano je odvijanje kaspaza zavisnog i kaspaza nezavisnog puta apoptoze u sisarskim ćelijama. Takođe, detaljno je opisano odvijanje procesa autofagije u ćeliji. Prikazana su aktuelna saznanja vezana za disfunkciju mitohondrija, kao i poremećaje odvijanja ova dva procesa u mozgu obolelih od shizofrenije, u okviru kojih je naglašena važnost sagledavanja efekata dugogodišnje terapije antipsihoticima prve i druge generacije. U ovom delu uvoda je istaknuta povezanost dugogodišnje terapije antipsihoticima sa morfološkim promenama u mozgu obolelih od shizofrenije i uticaj terapije na ćelije centralnog nervnog sistema.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju mitohondrijskog metabolizma i procesa apoptoze i autofagije, kao i efekata antipsihotika haloperidola i klopazina u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom. Ciljevi doktorske teze bili su ispitivanje: (a) neposrednih (PN13) i dugotrajnih efekata (PN70) perinatalne primene

fenciklidina na mitohondrijski metabolizam određivanjem aktivnosti kompleksa I i citohrom c oksidaze, proces apoptoze određivanjem ekspresije kaspaze 3 i apoptoza indukujućeg faktora (AIF), proces autofagije određivanjem ekspresije Beklin 1 i p62 proteina, kao i ultrastrukturne promene u korteksu i hipokampusu pacova; (b) dugotrajnih efekata perinatalne primene fenciklidina i efekata hronične primene antipsihotika haloperidola i klopazina (PN100) na mitohondrijski metabolizam, proces apoptoze i autofagije, ultrastrukturne promene u mozgu pacova, kao i zastupljenost neurona i glija ćelija (astrociti, oligodendrociti i mikroglije) u korteksu i hipokampusu.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je sprovedeno istraživanje na životinjama odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Detaljno je opisano tretiranje životinja, kao i procedura uzorkovanja tkiva i njihova analiza tehnikama spektrofotometrije, *Western blot*, transmisiona elektronske mikroskopije i imunohistohemije.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije. U disertaciji su jasno prikazani snaga i ograničenja primenjenog istraživanja.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži spisak od 333 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati istraživanja ukazuju da perinatalna primena fenciklidina ostvaruje neposredne i dugotrajne efekte na mitohondrijalni metabolizam. Pokazana je snažna korelacija između perinatalne primene fenciklidina i povećanja aktivnosti prvog i terminalnog enzima respiratornog lanca kod mladih pacova (PN13). Veza perinatalne primene i promene aktivnosti enzima respiratornog lanca je uočena i kod odraslih životinja. Naime, kod odraslih

pacova (PN70) fenciklidin ostvaruje dugotrajne efekte na aktivnost citohrom c oksidaze (COX), koje su region-specifične. Međutim, u narednom vremenskom preseku (PN100) korelacija perinatalne primene fenciklidina i aktivnosti pomenutih enzima u mozgu pacova nije detektovana. Ispitivanje efekata perinatalne primene fenciklidina na proces apoptoze ukazuju na intenziviranje ovog procesa u mozgu mladih pacova (PN13) jer je uočeno povećanje ekspresije egzekutorske kaspaze 3 u mozgu pacova neposredno nakon perinatalne administracije fenciklidina. Takođe, uočeno je da ovaj psihotomimetik remeti odvijanje procesa autofagije u smeru supresije ovog procesa, što se ogleda u povećanju ekspresije p62 proteina u korteksu pacova. Ultrastrukturalne promene korteksa i hipokampusa uzrokovane neposrednom primenom fenciklidina, a koje ukazuju na mitohondrijalnu disfunkciju i apoptozu, potvrđene su upotrebom transmisiona elektronske mikroskopije. Perinatalna primena fenciklidina ostvaruje dugotrajne efekte (PN70 i PN100) na proces apoptoze u smeru intenziviranja ovog procesa u kortikalnim regionima, što potvrđuje povećanje ekspresije markera ovog procesa – kaspaze 3 i AIF. U mozgu istih životinja, prvenstveno u hipokampalnim regionima, detektovane su promene ekspresije markera autofagije, Beklin 1 i p62 proteina, što ukazuje da fenciklidin intenzivira odvijanje procesa autofagije. Detektovane promene proteinske ekspresije prate opservirane ultrastrukturalne promene u ovim moždanim strukturama, upućujući da perinatalna primena fenciklidina ostvaruje dugotrajne efekte (PN70 i PN100) u mozgu pacova remećujući odvijanje procesa apoptoze i autofagije, čime se istovremeno ukazuje na postojanje sprege između ova dva procesa.

Rezultati ove studije ukazuju na snažnu korelaciju između hronične primene antipsihotika haloperidola i klozapina tokom devet nedelja i remećenja mitohondrijalnog metabolizma. Naime, oba antipsihotika imaju sposobnost da redukuju aktivnost terminalnog enzima respiratornog lanca. Haloperidol suprimira proces apoptoze u mozgu pacova, dok klozapin intenzivira ovaj proces u kortikalnim strukturama bez obzira na tip antipsihotika koji je primenjen kao i perinatalni tretman kojem su životinje izložene. Pored toga, pokazano je da hronični tretman klozapinom remeti odvijanje procesa autofagije. Promene se ogledaju u smanjenju ekspresije Beklin 1 proteina koji je uključen u prvim fazama ovog procesa, što ukazuje da klozapin remeti formiranje autofagolizozoma i recikliranje oštećenih ćelijskih

komponenti. Ultrastrukturnom analizom potvrđene su promene mitohondrijske strukture, kao i poremećaji procesa apoptoze i autofagije u korteksu i hipokampusu pacova tretiranih antipsihoticima.

Imunohistohemijski i tehnikom *Western blot* pokazano je da primena obe klase antipsihotika remeti zastupljenost ćelija centralnog nervnog sistema. Naime, primena antipsihotika redukuje zastupljenost neurona i astrocita, povećava zastupljenost oligodendrocita, dok je zastupljenost ćelija mikroglije nepromenjena u mozgu ispitivanih životinja u poređenju sa kontrolom.

C) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Istraživanje ove doktorske disertacije i njeni rezultati ukazuju da perinatalna primena fenciklidina ostvaruje neposredne i dugotrajne efekte na funkciju i strukturu mitohondrija. Neposredni efekti perinatalne primene fenciklidina ogledaju se u povećanju aktivnosti kompleksa I i COX u mozgu pacova, ukazujući na povećane potrebe mozga za energijom i u skladu su sa rezultatima prethodne studije (de Oliveira i sar., 2011). Perinatalna primena fenciklidina ne menja aktivnost kompleksa I u mozgu odraslih životinja (PN70), dok je COX aktivnost smanjena u korteksu a povećana u hipokampusu. U narednom vremenskom preseku (PN100) aktivnost oba enzima je nepromenjena. Važno je napomenuti da direktno poređenje rezultata sa drugom animalnom studijom baziranoj na perinatalnoj primeni psihotomimetika nije moguće, jer takvih studija nema. Kliničke studije najčešće evidentiraju redukciju aktivnosti enzima respiratornog lanca u obolelih od SCH (Maurer i sar., 2001; Dror i sar., 2002), za razliku od rezultata aktuelne studije. Međutim, kao ograničenje pomenutih studija naveden je uticaj dugogodišnje medikacije i ova disertacija je pokušaj da se odgovori na to pitanje. Naime, aktuelno istraživanje je utvrdilo da hronično tretiranje pacova antipsihoticima haloperidolom i klopazinom tokom devet nedelja, što odgovara periodu od oko pet ljudskih godina (Quinn 2005), dovodi do redukcije aktivnosti COX što je u saglasnosti sa *post mortem* rezultatima.

Novije studije dovode u vezu mitohondrijalnu disfunkciju sa aktivacijom apoptoze i njihovu ulogu u patogenezi SCH (Faizi i sar., 2014). Neka od pionirskih istraživanja na polju apoptoze u SCH (Ikonomidou i sar., 1999; Wang i sar., 2001; Jevtović-Todorović i sar., 2003) utvrdila su da primena antagonista NMDA receptora indukuje široko rasprostranjenu apoptozu u mozgu neposredno nakon svoje primene i aktuelna studija je to potvrdila. Međutim, ono što je zanimljivo je da rezultati ove disertacije ukazuju da perinatalna primena fenciklidina ostvaruje dugotrajne efekte na proces ćelijske smrti i da se aktivacija ovog procesa dešava na kaspaza zavisani i kaspaza nezavisani način 70. i 100. postnatalnog dana. Pored toga, aktuelna studija je utvrdila da primena antipsihotika indukuje promene ekspresije markera apoptoze, čime se ukazuje na negativan efekat dugotrajne terapije i kontroverze prilikom upotrebe. Opservirani rezultati idu u prilog skorijoj kliničkoj longitudinalnoj studiji koja je dovela u pitanje tvrdnje o neuroprotektivnom dejstvu antipsihotika (Ahmed i sar., 2015).

Najnovije studije ukazuju na mogućnost da poremećaji odvijanja procesa autofagije, procesa recikliranja ćelijskih komponenti, može imati ulogu u patogenezi shizofrenije (Merenlender-Wagner i sar., 2015) i da postoji sprega između procesa apoptoze i autofagije. Pored toga, prethodne studije su pokazale da abnormalnosti u odvijanju procesa autofagije mogu dovesti do aktivacije procesa apoptoze (Debnath i sar., 2005; Lum i sar., 2005). Prema našim saznanjima aktuelna doktorska disertacija se prva bavila uticajem perinatalne primene fenciklidina na proces autofagije, kao i efektima antipsihotika na isti. Rezultati aktuelne studije su pokazali da perinatalna primena fenciklidina neposredno po primeni ne remeti značajnije odvijanje procesa autofagije i da su efekti mahom bazirani na intenziviranju procesa apoptoze. Međutim, dugotrajni efekti (PN70) se razlikuju od neposrednih i uočavaju se znaci intenziviranja procesa autofagije, dok se nakon hronične primene antipsihotika uočavaju znaci supresije odvijanja početne faze procesa autofagije.

Literarni podaci dovode u vezu primenu antipsihotika sa reduktivnim promenama mozga obolelih od SCH (Ho i sar., 2011; Fusar i sar., 2013; Ahmed i sar., 2015). Takođe, medikacija se dovodi u vezu sa proširenjem bočnih ventrikula (Crespo-Facorro i sar., 2008) i redukcijom bele mase (Martins-de-Souza i sar., 2009a, 2009b). Rezultati aktuelne doktorske

disertacije nalaze smanjenje zastupljenosti neurona i astrocita nakon primene antipsihotika i u saglasnosti su sa rezultatima kliničkih studija. Takođe je pokazano da antipsihotici imaju sposobnost da vrše reverziju promena zastupljenosti ovih ćelija indukovanih perinatalnom primenom PCP-a. Međutim, zastupljenost oligodendrocita je povećana, dok antipsihotici teže da suprimiraju promene indukovane PCP-om. Kliničke studije ukazuju na redukciju bele mase, pa razlog za navedene razlike između aktuelne i kliničkih studija moguće je tražiti u starosti pacijenata obolelih od SCH (Hof i sar., 2003). Nakon hronične medikacije i nije detektovana mikrogliozna, što je u skladu sa rezultatima *post mortem* analiza (Steiner i sar., 2006, 2008), ali je detektovana promena morfologije ovih ćelija.

Analizom mozгова iz svih eksperimentalnih grupa primenom transmisionе elektronske mikroskopije aktuelna disertacija potvrđuje prisustvo mitohondrijalne disfunkcije i promene karakteristične za procese apoptoze i autofagije.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Jevtić, G., Nikolić, T., Mirčić, A., Stojković, T., Velimirović, M., Trajković, V., Marković, I., Trbovich, A.M., Radonjić, N.V., Petronijević, N.D., 2016. Mitochondrial impairment, apoptosis and autophagy in a rat brain as immediate and long-term effects of perinatal phencyclidine treatment - influence of restraint stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 66, 87-96.

E) Zaključak

Doktorska disertacija Gordane Jevtić Dožudić pod nazivom „**Mitohondrijalna disfunkcija u mozgu pacova perinatalno tretiranih fenciklidinom – Efekat antipsihotika**“ predstavlja originalni naučni doprinos jer je ovo prema našim saznanjima prva studija koja se bavila efektima perinatalne primene fenciklidina na mitohondrijalni metabolizam i poremećaje u odvijanju procesa apoptoze i autofagije u tri različita vremenska preseka, kao i prva studija koja se bavila analizom efekata hroničnog tretmana antipsihotika haloperidola i klopazina na pomenute procese na animalnom modelu shizofrenije. Navedeni rezultati potkrepljuju pretpostavku da je u shizofreniji prisutna disfunkcija respiratornog lanca, što remeti normalno funkcionisanje mitohondija i za posledicu može imati aktivaciju procesa ćelijske smrti apoptozom i/ili autofagijom. Neposredni efekti perinatalne primene fenciklidina ogledaju se u aktivaciji apoptoze, što potvrđuju i mikroskopski rezultati. Međutim, dugotrajni efekti ukazuju da perinatalna primena fenciklidina remeti aktivnost enzima respiratornog lanca, kao i odvijanje oba procesa uključena u ćelijsku homeostazu - apoptozu i autofagiju. Pored toga, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju i da je vrlo verovatno da antipsihotici imaju efekat na odvijanje ovih procesa i upućuju na mogućnost da dugotrajnom primenom psihofarmaci dodatno remete odvijanje pomenutih procesa. U tezi je pokazano da antipsihotici ostvaruju efekat i na zastupljenost ćelija nervnog sistema, što dodatno upućuje na odvijanje intenzivnih promena u mozgu u uslovima medikacije. Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu u razumevanju mehanizama koji učestvuju u patofiziologiji shizofrenije i da ukažu na moguće nove strategije u tretmanu ove bolesti usmerenih na poboljšanje mitohondrijske funkcije.

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 imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju Gordane Jevtić Dožudić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, _____

Članovi Komisije:

Prof. dr Ivanka Marković

Doc. dr Maja Ivković

Prof. dr Vladimir Jakovljević

Mentor:

Prof. dr Nataša Petronijević

Komentor:

Doc. dr Aleksandar Mirčić
