

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 21.05.2018. godine, broj 5940/16-RP imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Morfološke i biohemijske promene u prefrontalnom korteksu, amigdaloidnom telu i hipokampalnoj formaciji mozga pacova uslovljene pojedinačnim produženim stresom”**

kandidata mr sci. med. dr Romane Petrović, zaposlene na Klinici za psihijatrijske bolesti “Dr Laza Lazarević” u Beogradu. Mentor: Prof. dr Nataša Petronijević. Komentor: Prof. dr Laslo Puškaš

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Doc. dr Maja Ivković, Klinika za psihijatriju Kliničkog centra Srbije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Milan Aksić, Institut za anatomiju “Niko Miljanić”, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Ljubica Stojšić-Džunja, Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

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 Romane Petrović napisana je na 138 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno jedna tabela, 28 grafika i 22 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, spisak skraćenica, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U **uvodu** su u prvom delu predstavljeni evolucionini značaj straha kao odgovora na potencijalno ugrožavajuće stimulse, kao i značaj filogenetskog pamćenja straha, za preživljavanje vrste. Napravljena je distinkcija između adaptivnog i maladaptivnog straha. Poentirano je da je maladaptivni strah, koji je najpribližniji pojmu anksioznost, jedna od najznačajnijih odrednica posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP). U skladu sa tim PTSP bi predstavljao perzistentno procesiranje i elaboraciju intruzivne emocionalne memorije povezane sa traumatskim iskustvom. Takođe su prikazani pojam traume, definicija, istorijat i epidemiologija posttraumatskog stresnog poremećaja (PTSP). Navedeni su zvanični kriterijumi za dijagnostikovanje PTSP-a u okvirima dva glavna klasifikaciona sistema psihijatrijskih bolesti DSM5 i MKB-10. Predstavljen je i najšire prihvaćen neuroanatomski model PTSP-a koji uključuje tri moždane strukture, amigdalnu, medijalni prefrontalni korteks i hipokampus. Prikazane su neuroanatomske i citoarhitektonske karakteristike navedenih moždanih regiona, kao i njihov značaj u PTSP-u. Takođe, predstavljeni su i najznačajniji strukturni i funkcionalni korelati PTSP-a u navedenim neuroanatomskim strukturama, neuroimaging tehnikama. Detaljno su opisani pretpostavljeni patofiziološki mehanizmi PTSP-a koji obuhvataju abnormalno učenje straha kao i deficite za ekstinkciju naučenog patološkog straha u PTSP-u. U drugom delu su prikazani animalni modeli PTSP-a kategorisani u dve glavne grupe: modele zasnovane na

aplikaciji stresora/traumatskog agensa eksperimentalnoj životinji i modele zasnovane na pretpostavljenom patofiziološkom mehanizmu PTSP-a. Predstavljen je i model pojedinačnog produženog stresa (PPS), najviše validiran animalni model PTSP-a. Pored detaljnog opisa eksperimentalne procedure, naznačen je i najvažniji neuroendokrini korelat navedenog animalnog modela i humanog PTSP-a, koji se sastoji u povećanoj negativnoj povratnoj sprezi hipotalamo-hipofizeo-adrenalne osovine na male doze egzogenog deksametazona. Prikazane su i bihevioralne promene kod pacova tretiranih PPS procedurom koje mogu biti analogne odgovarajućim kliničkim karakteristikama PTSP-a. U trećem delu su opisana dosadašnja saznanja o biohemijским i histološkim supstratima PTSP-a. Opisana je potencijalna uloga oksidativnog stresa u nastanku posttraumatskog stresnog poremećaja. Prikazana je struktura i funkcija različitih reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i različitih komponenti antioksidativnog sistema zaštite mozga, te značaj oksidativnog stresa u PTSP-u. Predstavljena su i dva najvažnija izvora slobodnih radikala u biološkim sistema, koji uključuju mitohondrijalni respiratorni lanac i sistem NADPH oksidaze. Detaljno je prikazana struktura i funkcija različitih komponenti mitohondrijalnog respiratornog lanca, kao i subjedinična organizacija NADPH oksidaze. Predstavljena su najnovija saznanja o fiziološkim ulogama NADPH oksidaze, ali i njen patofiziološki značaj u neurodegenerativnim bolestima i PTSP-u. Potom su prikazani struktura i funkcija specifičnog neuronskog nuklearnog markera, NeuN proteina kao i karakteristike pojedinih GABA-ergičkih ćelija. Prikazane su različite subpopulacije interneurona, njihove morfološke karakteristike u prefrontalnom korteksu, amigdali i hipokampusu, kao i uloga GABA-ergičkog sistema u inhibiciji i orkestraciji neuronskih krugova. Opisana je i stresom indukovana strukturna reorganizacija principalnih neurona i interneurona. Na posletku uvoda, predstavljena je struktura i moždana distribucija tri neuropeptida, supstance P (SP), galanina (GAL) i enkefalina (ENK). Naznačena je i njihova uključenost u emocionalno procesiranje stresnog stimulusa, kao i njihov značaj u stresnom odgovoru i sa stresom povezanim psihijatrijskim nozološkim entitetima.

**Ciljevi istraživanja** su precizno definisani i uključuju ispitivanje uticaja pojedinačnog produženog stresa na (1) pokazatelje oksidativnog stresa uključujući nivo malondialdehida (MDA), sadržaj redukovano glutaciona (GSH), aktivnost glutacion peroksidaze (GPx), superoksid dizmutaze (SOD) i katalaze (CAT), i ekspresiju SOD1 i SOD2; (2) moguće generatore slobodnih radikala i to mitohondrijalni respiratorni lanac, (određivanje aktivnosti Kompleksa I i citohrom C oksidaze) i NADPH oksidazu (određivanje ekspresije membranskih (gp91phox i p22phox)) i citosolnih (p67phox) subjedinića ovog enzima) i (3) ukupan broj neurona (NeuN pozitivne ćelije), kao i broj parvalbumin (PV) i kalbindin (CB) pozitivnih GABA-ergičkih neurona i broj supstancija P (SP), enkefalin (ENK) i galanin (GAL) pozitivnih neurona u prefrontalnom korteksu (PFK), hipokampusu i amigdali mozga pacova.

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, procedura uzorkovanja tkiva i njihova analiza tehnikama spektrofotometrije, Western blot 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 221 reference.

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

Pojedinačni produžen stres, sedmog dana nakon aplikacije, dovodi do pojave oksidativnog stresa u amigdali i hipokampusu mozga pacova, koji se manifestuje povećanjem nivoa malondialdehida (MDA) i smanjenjem nivoa redukovano glutaciona (GSH) u obe navedene strukture, smanjenjem aktivnosti ukupne superoksid dizmutaze (SOD) u amigdali i smanjenjem aktivnosti glutacion peroksidaze (GPx) u hipokampusu. PPS i pored smanjenja aktivnosti glutacion peroksidaze i povećanja aktivnosti Kompleksa I,

ne dovodi do promena u redoks statusu korteksa mozga, što se manifestuje u nepromenjenim nivoima MDA i GSH. PPS značajno povećava ekspresiju SOD1 u korteksu i SOD2 u sve tri ispitivane strukture. Mitohondrijalni respiratorni lanac nije izvor evidentiranog oksidativnog stresa u amigdali i hipokampusu, s obzirom da su aktivnost Kompleksa I i citohrom c oksidaze nepromenjeni u navedenim strukturama. U amigdali je sedmog dana registrovano povećanje ekspresije sve tri subjedinice NADPH oksidaze (gp91phox i p22phox i p67phox), što ukazuje da je NADPH oksidaza glavni izvor oksidativnog stresa u amigdali. PPS stresor uzrokuje statistički značajno smanjenje ekspresije NeuN u sve tri ispitivane moždane strukture od značaja za PTSP kao i alteracije GABA-ergičkog sistema u smeru smanjenja gustine neurona imunopozitivnih na parvalbumin u amigdali i hipokampusu (CA3 i girus dentatus), kao i smanjenje gustine kalbindin pozitivnih ćelija u hipokampusu (CA1 subregion), što sve ukazuje da bi oksidativni stres u amigdali i hipokampusu mogao biti značajan faktor oštećenja interneurona u PPS modelu. Takođe PPS uzrokuje i značajne izmene ekspresije neuropeptida supstance P i galanina u medijalnom prefrontalnom korteksu i amigdali. Naime, PPS uzrokuje povećanje gustine SP-imunopozitivnih ćelija i smanjenje gustine ćelija koje eksprimiraju galanin u obe navedene strukture. Ushodna regulacija ekspresije supstance P i nishodna regulacija ekspresije galanina u PPS modelu, mogu predstavljati značajan molekularni patogenetski mehanizam aberantnog emocionalnog procesiranja i emocionalne memorije u PTSP-u. Sedmog dana posle PPS procedure, u sve tri limbičke strukture od značaja za PTSP, nisu nađene statistički značajne promene u ekspresiji enkefalina.

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

Istraživanje ove doktorske disertacije i njeni rezultati ukazuju da ozbiljan stresor kao što je pojedinačni produženi stres uzrokuje oksidativni stres u amigdali i hipokampusu mozga pacova i implikuje NADPH oksidazu kao najznačajniji izvor oksidativnog oštećenja u amigdali, ali ne i u hipokampusu. U literaturi postoji samo jedna studija (Liu i sar., 2016) koja je koristila isti animalni PTSP model, u kojem je takođe pokazano da ekstremno okolinski stresor može izazvati oksidativni stres u hipokampusu, a da je izvor oksidativnog

stresa u hipokampusu sistem NADPH oksidaze. Ne postoje podaci o istraživanjima na PPS modelu koja su uključivala proučavanje redoks statusa i izvora eventualnog oksidativnog stresa u prefrontalnom korteksu i amigdali. Istraživanja u okviru drugih animalnih modela sa intenzivnim akutnim okolinskim stresorom kao što su imobilizacija i sputavanje (Liu et al., 1996; Madrigal et al., 2003), pokazala su povećanje markera lipidne peroksidacije u korteksu, međutim u istraživanju dr Petrović, nisu evidentirane promene koncentracije lipidnih peroksida u korteksu i pored registrovanog povećanja aktivnosti Kompleksa I i smanjenja aktivnosti glutation peroksidaze. Razlike u redoks statusu korteksa u odnosu na druge studije, se mogu objasniti razlikom korišćenog animalnog modela, razlikom u vremenu posle akutnog stresora u kom je obavljena analiza oksidativnih parametara. Odsustvo oksidativnog stresa u korteksu se može interpretirati i ipak suficijentnom antioksidativnom zaštitom u tom regionu mozga. Studija sa modelom ekspozicije mirisu predatora (Mejia-Carmona, 2014), demonstrirala je povećanje lipidnih peroksida (TBARS) u amigdali tretiranih pacova. NADPH oksidazom kao izvorom oksidativnog stresa bavili su se i Shiavone i saradnici (2009) u animalnom modelu stresa u vidu socijalne izolacije, kada su registrovali povećanje parametara oksidativnog stresa i povećanu ekspresiju NADPH oksidaze u korteksu tretiranih pacova. Istraživanje dr Petrović pokazuje da mitohondrijalni respiratorni lanac nije izvor oksidativnog stresa. U literaturi nema studija koje se bave ispitivanjem respiratornog lanca elektrona u PPS animalnom modelu. Madrigal i saradnici (2001) su u modelu hroničnog repetitivnog stresa mehaničkim sputavanjem, pokazali povećanje markera oksidativnog stresa, smanjenje aktivnosti Kompleksa I i neizmenjenost aktivnosti COX u korteksu tretiranih pacova dok je u studiji dr Petrović u korteksu pokazano povećanje aktivnosti Kompleksa I, bez povećanja parametara oksidativnog oštećenja. Navedene razlike su takođe mogu interpretirati korišćenjem različitog animalnog modela stresa. Kada je u pitanju ispitivanje uticaja okolinskog stresora na ekspresiju NeuN proteina u limbičkim struktura, ne postoje literaturni podaci za PPS animalni model. Drugi animalni modeli stresa, kao što je naprimer materalna deprivacija, dovode do smanjenja gustine NeuN imunopozitivnih neurona u hipokampusu i korteksu tretiranih pacova (Aksić et al., 2013). Istraživanje dr Petrović je pokazalo takođe smanjenje ekspresije NeuN u korteksu i hipokampusu, ali i u amigdali u okviru PPS modela. Evidentiran je mali broj studija koji se bavi uticajem okolinskog stresora na GABA-ergički sistem mozga. Studija sa

modelom socijalne izolacije (Schiavone i saradnici, 2009) je pokazala statistički značajno smanjenje broja parvalbumin pozitivnih neurona u prefrontalnom korteksu udruženo sa oksidativnim stresom, dok je studija sa PPS modelom (Liu et al., 2016) pokazala smanjenje gustine parvalbumin imunopozitivnih neurona u hipokampusu takođe udruženo sa povećanjem markera oksidativnog stresa. Doktorska disertacija dr Petrović je pokazala smanjenje gustine parvalbumin pozitivnih neurona u amigdali i hipokampusu udruženo sa oksidativnim stresom u obe moždane strukture u okviru PPS modela. Kada je u pitanju ispitivanje uticaja PPS stresora (kao najviše validiranog animalnog modela PTSP-a) na supstancu P, galaninski i enkefalinski neuromodulatorni sistem u mozgu, u dostupnoj literaturi nema raspoloživih uporednih studija. Studija dr Petrović je pokazala ushodnu regulaciju ekspresije supstance P i nishodnu regulaciju ekspresije galanina u mPFK i amigdali u PPS modelu. U drugim animalnim modelima kao što je imobilizacioni stres (Ebner et al., 2004), nađene su povećane koncentracije supstance P u mozgu pacova dok su aplikacijom antagonista neurokinin 1 receptora, prevenirane bihevioralne alteracije slične anksioznosti posle imobilizacionog stresa (Kramer et al., 1998). Kozlovsky i saradnici (2009) su u animalnom modelu sa aplikacijom mirisa predatora, registrovali sniženje ekspresije mRNK za galanin u CA1 subregionu hipokampusu i frontalnom korteksu. Kada je u pitanju enkefalinski sistem u mozgu, drugi modeli sa aplikacijom stresora u vidu hroničnog imobilizacionog stresa, hroničnog nepredvidivog stresa i hronične socijalne izolacije, su demonstrirali značajan uticaj stresora na izmene ekspresije mRNK preproenkefalina u hipokampusu i amigdali tretirani pacova (Chen et al., 2004; Berube et al., 2013; Berube et al., 2014). Studija dr Petrović nije evidentirala promene u gustini enkefalin-pozitivnih neurona u sve tri ispitivane strukture mozga pacova od značaja za PTSP u PPS modelu, što se može interpretirati i metodološkom razlikom u tome što se PPS model može kategorizovati više kao model sa akutnim stresorom.

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

1. Petrović, R., Puskaš, L., Jevtić Dožudić, G., Stojković, T., Velimirović, M., Nikolić, T., Živković, M., Đorović, Đ., Nenadović, M., Petronijević, N., 2018. "NADPH oxidase and redox status in amygdala, hippocampus and cortex of male Wistar rats in an animal model

of post-traumatic stress disorder.” *Stress*, vol. 2018, Article ID 1474874, 9 pages.  
<https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1474874>.

## **E) Zaključak**

Doktorska disertacija mr sci med Romane Petrović, pod nazivom „Morfološke i biohemijske promene u prefrontalnom korteksu, amigdaloidnom telu i hipokampalnoj formaciji mozga pacova uslovljene pojedinačnim produženim stresom” predstavlja originalni naučni doprinos. Prema našim saznanjima ovo je prva studija koja se bavila ispitivanjem uticaja modela pojedinačnog produženog stresa na pojavu oksidativnog stresa u amigdali i korteksu, aktivnost enzima mitohondrijalnog respiratornog lanca, ekspresiju NADPH oksidaze kao izvora oksidativnog stresa u amigdali, gustinu NeuN, parvalbumin kalbindin, supstanca P, galanin i enkefalin imunopozitivnih neurona u sve tri neuroanatomske strukture od značaja za PTSP i gustinu parvalbumin pozitivnih ćelija u amigdali. Disertacija je pokazala da u ovom visoko validiranom animalnom modelu PTSP-a, PPS stresor uzrokuje oksidativni stres u amigdali i hipokampusu sa NADPH oksidazom kao glavnim izvorom oksidativnog oštećenja u amigdali. PPS stresor redukuje ekspresiju NeuN proteina u svim ispitivanim regionima mozga. Oksidativni stres u PPS modelu, oštećuje GABA-ergičke neurone u amigdali i hipokampusu. Navedeni stresor uzrokuje i povećanje ekspresije supstance P i smanjenje ekspresije galanina u mPFK i amigdali i ne menja denzitet enkefalin-pozitivnih neurona u sve tri ispitivane strukture. Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu u razumevanju mehanizama koji učestvuju u patogenezi posttraumatskog stresnog poremećaja i da ukažu na moguće nove strategije u prevenciji i lečenju. 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 Romane Petrović i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 27.06.2018. god.

**Članovi Komisije:**

Doc. dr Maja Ivković

---

Doc. dr Milan Aksić

---

Prof. dr Ljubica Stojšić-Džunja

---

**Mentor:**

Prof. dr Nataša Petronijević

---

**Komentor:**

Prof. dr Laslo Puškaš

---