

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Nikola B. Šutulović

**FUNKCIONALNE I BIOHEMIJSKE
PROMENE CENTRALNOG NERVNOG
SISTEMA U EKSPERIMENTALNOM MODELU
HRONIČNOG PELVIČNOG BOLA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Nikola B. Šutulović

**FUNCTIONAL AND BIOCHEMICAL
ALTERATIONS IN CENTRAL NERVOUS
SYSTEM IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF
CHRONIC PELVIC PAIN**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

MENTORI

1. **Prof. dr Dragan Hrnčić**, vanredni profesor i naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. **Doc. dr Sonja Šuvakov**, docent
Mayo Clinic, Rochester, USA

ČLANOVI KOMISIJE

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

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Realizacija ove doktorske disertacije ne bi bila moguća bez podrške mojih dragih učitelja i ostvarene saradnje sa uvažanim kolegama, te im se svima zahvaljujem na pruženoj pomoći:

Uvaženoj i dragoj *prof. dr Oliveri Stanojlović* dugujem veliku zahvalnost na bezuslovnoj podršci i ljubavi, požrtvovanosti, savetima, diskusijama o rezultatima, ali i kritikama tokom mog naučnog i stručnog razvoja, počevši još od studentskih dana, u Laboratoriji za neurofiziologiju Instituta za Medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ kojom rukovodi.

Uvaženoj *prof. dr Tatjani Simić* i njenom timu sa Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, posebno kolegini *dr Đurđi Jerotić* za pomoć u ovladavanju biohemijskim tehnikama i realizaciji eksperimenata vezanih za oksidativni stres.

Dragoj *prof. dr Neli Puškaš* sa Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ na pruženoj podršci tokom savladavanja imunohistohemijskih tehnika i evaluaciji njima dobijenih rezultata, kao i *doc. dr Sanji Despotović* za pomoć u radu sa ImageJ programom.

Dragoj *prof. dr Aleksandri Rašić-Marković* na sveukupnoj podršci, kao i pomoći tokom realizacije elektrofizioloških eksperimenata ove teze.

Uvaženom *prof. dr Đuri Macutu* za podršku i pomoć u evaluaciji hormonskih analiza.

Svim dragim kolegama sa Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“. Dragom *Jovanu Despotoviću*, *Katarini Živanović* i *Dragani Pavlović* za pomoć u laboratorijskom radu. Dragom *dr Željku Grubaču* za podršku i pomoć u realizaciji bihejvioralnih eksperimenata. Zahvalnost dugujem i cenjenim kolegama *prof. dr Dušanu Mladenoviću* i *doc. dr Mileni Vesković*, na savetima i pomoći u evaluaciji dobijenih rezultata.

Mojim studentima Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao i studentima na naučnoj razmeni iz celog sveta, koji su pod mojim mentorstvom u toku realizacije eksperimenata ove doktorske disertacije u Laboratoriji za neurofiziologiju napravili svoje prve istraživačke korake, posebno *dr Simone Pietro Marchini* i dragom kolegi *dr Aleksi Zubeliću* na pruženoj pomoći u obradi zapisa video monitoringa.

Svim uvažanim članovima komisije na korisnim savetima i sugestijama koje su mi pružili za vreme izrade i pisanja ove disertacije.

Dragoj *doc. dr Sonji Šuvakov*, svojoj mentorki, na podršci, savetima, zajedničkim naučnim poduhvatima, novim naučnim iskustvima koja sam savladao i prijateljstvu koje smo stekli.

Naposletku, *prof. dr Draganu Hrnčiću*, svom cenjenom i dragom mentoru, dugujem posebnu zahvalnost na neiscrpnj pomoći i učiteljskim savetima tokom istraživačkog rada, strpljenju, sistematičnosti i predanosti kojima me je naučio, na nesebičnoj podršci koju mi je pružao tokom više od 10 godina zajedničke i plodonosne saradnje, ali i na iskrenom prijateljstvu koje se iz ove saradnje rodilo.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, posebno majci Eleni, ocu Blaži i sestri Mariji koji su me bodrili, podržavali i hrabрили od početka školovanja do danas.

Ova doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta resornog Ministarstva za nauku br. 175032/200110 (rukovodilac O. Stanojlović) i međunarodnog projekta FA4LIN (MNTR i TUBITAK, rukovodilac D. Hrnčić), čiji članovi učestvuju u EU COST akcijama TEATIME i ANDRONET (MC: D. Hrnčić).

Posvećeno mojoj porodici

Naziv doktorske disertacije

FUNKCIONALNE I BIOHEMIJSKE PROMENE CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA U
EKSPERIMENTALNOM MODELU HRONIČNOG PELVIČNOG BOLA

Sažetak

Hronični prostatitis/sindrom hroničnog pelvičnog bola (CP/CPPS) je često udružen, nerazjašnjenim mehanizmima, sa poremećajima centralnog nervnog sistema (CNS).

Ciljevi ove studije su bili utvrđivanje funkcionalnih i biohemijskih promena koje nastaju u CNS kao posledica CP/CPPS, kao i ispitivanje potencijalnih mehanizama koji dovode do tih promena.

Funkcionalno su ispitani podložnost za razvoj konvulzija, prag nocicepcije, ponašanje povezano sa anksioznošću i depresijom i kognitivne sposobnosti. Biohemijskim ispitivanjem obuhvaćeni su parametri redoks statusa i nivo proinflammatoryh citokina i ICAM-1 u strukturama mozga, kao i nivo testosterona i kortikosterona u serumu. Imunohistohemijski je ispitan proces neurogeneze i gliogeneze u hipokampusu. Ispitivani su i potencijalni terapijski efekti modulacije nivoa gasotransmitera CO i hronične aerobne fizičke aktivnosti u ovom modelu.

Životinje sa eksperimentalnim CP/CPPS su razvile hiperekscitabilnost CNS, ali su povećano ispoljavale ponašanje povezano sa anksioznošću i depresijom, kao i kognitivnu disfunkciju. U hipokampusu, talamusu i korteksu životinja sa CP/CPPS došlo je do pojave oksidativnog stresa, a nivo proinflammatoryh citokina IL- β i IL-6 i ekspresija ICAM-1 bili su povećani u talamusu i korteksu, što ukazuje na neuroinflamaciju. Razvoj CP/CPPS je doveo do hormonskog disbalansa, u vidu povećanja kortikosterona i smanjenja testosterona u serumu. Adultna neurogeneza je bila smanjenog, a gliogeneza povećanog obima u hipokampusu, gde je utvrđen i smanjen broj inhibitornih interneurona. Hronični aerobni trening i CORM A1, donor CO, imali su antinociceptivno, anksiolitičko, antidepressivno, antiinflammatoryno i antikonvulzivno dejstvo u modelu CP/CPPS, što ukazuje na njihove potencijalne terapijske efekte.

Ključne reči: CP/CPPS, anksioznost, depresija, kognicija, oksidativni stres, hormoni, interleukini, ICAM-1, fizička aktivnost, ugljen-monoksid

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

UDK broj: _____

Title of doctoral dissertation

FUNCTIONAL AND BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC PELVIC PAIN

Abstract

Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS) is often associated with central nervous system (CNS) disorders by unelucidated mechanisms.

The aims of this study were to determine the functional and biochemical changes in the CNS induced by CP/CPPS, as well as the potential underlying mechanisms.

Functional study included assessment of seizure susceptibility, nociception threshold, anxiety- and depression-like behavior, and cognition. The biochemical analyses consisted of assessment of redox status parameters, pro-inflammatory cytokines, and ICAM-1 expression in the brain structures, and the concentration of testosterone and corticosterone in the serum. The process of hippocampal neurogenesis and gliogenesis were examined immunohistochemically. The potential therapeutic effects of the CO gasotransmitter level modulation and chronic aerobic physical activity in this model were also investigated.

Animals with experimental CP/CPPS developed CNS hyperexcitability, increased anxiety- and depression-like behavior, as well as cognitive impairment. Oxidative stress occurred in the hippocampus, thalamus, and cortex of animals with CP/CPPS, and the level of proinflammatory cytokines IL- β and IL-6, and ICAM-1 expression were increased in the thalamus and cortex, indicating neuroinflammation. Hormonal imbalance, as an increase in corticosterone and a decrease in serum testosterone concentration, was observed. Adult neurogenesis was reduced, while gliogenesis was increased in the hippocampus, and the lower number of hippocampal inhibitory interneurons was also found. Chronic aerobic training and CORM A1 (CO releasing molecule) had antinociceptive, anxiolytic, antidepressant, anti-inflammatory and anticonvulsant effects in the CP/CPPS model, indicating their potential therapeutic effects.

Key words: CP/CPPS, anxiety, depression, cognition, oxidative stress, hormones, interleukins, ICAM-1, physical activity, carbon monoxide

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Physiological sciences

UDC number: _____

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Sindrom hroničnog pelvičnog bola.....	2
1.1.1. Definicija i klasifikacija.....	2
1.1.2. Epidemiološke i demografske karakteristike.....	3
1.1.3. Klinička slika i dijagnostički kriterijumi.....	4
1.1.4. Etiopatogeneza.....	7
1.1.5. Terapija i prognoza.....	14
1.1.6. Eksperimentalni modeli.....	15
1.2. Komorbiditeti sindroma hroničnog pelvičnog bola.....	20
1.2.1. Anksioznost i testovi za njenu procenu u eksperimentalnim uslovima.....	20
1.2.2. Depresija i testovi za procenu depresije u eksperimentalnim uslovima.....	22
1.2.3. Kognicija i testovi za procenu kognitivnog ponašanja, učenja i pamćenja u eksperimentalnim uslovima.....	24
1.2.4. Hiperekscitabilnost CNS.....	25
1.3. Neuroinflamacija: CNS nije imunoprivilegovan.....	27
1.3.1. Aktivacija mikroglijalnih i astroglijalnih ćelija.....	29
1.3.2. Uloga citokina i hemokina u neuroinflamaciji.....	30
1.3.3. Krvno-moždana barijera u neuroinflamaciji: uloga ICAM-1.....	31
1.3.4. Disfunkcija endokrinih osovina.....	33
1.3.5. Uloga oksidativnog stresa.....	34
1.3.6. Alteracija adultne neurogeneze i astrocitoza hipokampusa.....	38
1.4. CO kao gasotransmiter.....	41
1.4.1. Endogena sinteza.....	41
1.4.2. Fiziološke uloge.....	43
1.5. Efekti fizičke aktivnosti na zdravlje.....	43
1.5.1. Uticaj fizičke aktivnosti na centralni nervni sistem.....	44
1.5.2. Fizička aktivnost u eksperimentalnim uslovima.....	45
1.5.3. Uloga fizičke aktivnosti u modulaciji bola.....	46
2. Ciljevi istraživanja	47
3. Materijal i metode	49
3.1. Eksperimentalne životinje.....	50
3.2. Eksperimentalni dizajn.....	50
3.2.1. Eksperimentalni model CP/CPPS: funkcionalne, bihevioralne, biohemijske i imunohistohemijske promene u CNS-u. Podložnost razvoju hiperekscitabilnosti.....	50
3.2.2. Modulacija nivoa ugljen monoksida (CO): efekat na etiopatogenezu CP/CPPS.....	53
3.2.3. Hronična aerobna fizička aktivnost na tredmilu: uticaj na etiopatogenezu CP/CPPS.....	55
3.3. Eksperimentalne metode.....	57
3.3.1. Indukcija CP/CPPS.....	57
3.3.2. Merenje dnevnog prirasta u telesnoj masi i dnevnog unosa hrane.....	58
3.3.3. Merenje skrotalnog praga bola na mehaničku draž.....	58

3.3.4. Bihevioralni testovi.....	59
3.3.4.1. Ponašanje povezano sa anksioznošću.....	59
3.3.4.2. Ponašanje povezano sa depresijom.....	62
3.3.4.3. Ispitivanje kognitivnog ponašanja.....	63
3.3.5. Biohemijske analize.....	64
3.3.5.1. Priprema uzoraka za biohemijsku analizu.....	64
3.3.5.2. Određivanje koncentracije proteina.....	65
3.3.5.3. Određivanje koncentracije interleukina 1 beta i interleukina 6.....	66
3.3.5.4. Određivanje koncentracije hormona u serumu.....	66
3.3.5.5. Oksidativni stres u strukturama mozga.....	67
3.3.5.6. Ekspresija proteina ICAM-1 u strukturama mozga.....	68
3.3.6. Bihevioralne i EEG karakteristike konvulzivnog ponašanja.....	69
3.3.6.1. Bihevioralne karakteristike konvulzivnog ponašanja.....	69
3.3.6.2. Elektroencefalografske karakteristike konvulzivnog ponašanja.....	69
3.3.7. Histološka analiza prostate.....	71
3.3.8. Imunohistohemijska analiza ekspresije markera gliogeneze i neurogeneze.....	71
3.3.8.1. Priprema isečaka za imunohistohemijsko bojenje.....	72
3.3.8.2. Imunohistohemijsko bojenje.....	72
3.3.8.3. Kvantifikovanje imunoreaktivnih ćelija.....	73
3.4. Statistička analiza i obrada podataka.....	76
4. Rezultati.....	77
4.1. Uticaj CP/CPPS na dnevni prirast u telesnoj masi.....	78
4.2. Uticaj CP/CPPS na dnevni unos hrane.....	79
4.3. Uticaj CP/CPPS na skrotalni prag bola na mehaničku draž.....	80
4.4. Bihevioralni testovi.....	81
4.4.1. Uticaj CP/CPPS na ponašanje povezano sa anksioznošću.....	81
4.4.2. Uticaj CP/CPPS na ponašanje povezano sa depresijom.....	89
4.4.3. Uticaj CP/CPPS na učenje i pamćenje.....	90
4.5. Biohemijske analize.....	92
4.5.1. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju IL-1 β i IL-6 u strukturama mozga, prostati i serumu.....	92
4.5.2. Uticaj CP/CPPS na koncentraciju kortikosterona i testosterona u serumu.....	96
4.5.3. Uticaj CP/CPPS na parametre oksidativnog stresa u strukturama mozga.....	97
4.5.4. Međusobna povezanost parametara oksidativnog stresa i kortikosterona sa bihevioralnim promenama.....	100
4.5.5. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju proteina ICAM-1 u strukturama mozga.....	102
4.6. Uticaj CP/CPPS na bihevioralne i elektroencefalografske (EEG) karakteristike konvulzivnog ponašanja izazvanog lindanom.....	103
4.6.1. Uticaj CP/CPPS na bihevioralne karakteristike konvulzivnog ponašanja.....	103
4.6.2. Uticaj CP/CPPS na EEG karakteristike konvulzivnog ponašanja.....	106
4.7. Uticaj CP/CPPS na histološke karakteristike tkiva prostate.....	109

4.8. Uticaj CP/CPPS na imunohistohemijsku ekspresiju markera neurogeneze i gliogeneze u hipokampusu.....	111
4.8.1. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju PV+ interneurona u hipokampusu.....	111
4.8.2. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju Ki-67+ ćelija u hipokampusu.....	114
4.8.3. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju DCX+ ćelija u hipokampusu.....	115
4.8.4. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju GFAP+ astrocita u hipokampusu.....	117
4.9. Uticaj modulacije nivoa CO na pacove sa eksperimentalnim CP/CPPS.....	119
4.9.1. Uticaj CORM-A1 na skrotalni prag bola.....	119
4.9.2. Uticaj CORM-A1 na ponašanje povezano sa anksioznošću.....	120
4.9.3. Uticaj CORM-A1 na ponašanje povezano sa depresijom.....	130
4.9.4. Uticaj CORM-A1 na bihevioralne i EEG karakteristike konvulzivnog ponašanja izazvanog lindanom.....	131
4.9.5. Uticaj CORM-A1 na histološke karakteristike prostate.....	138
4.10. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na pacove sa CP/CPPS.....	139
4.10.1. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na skrotalni prag bola na mehaničku draž.....	139
4.10.2. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ponašanje povezano sa anksioznošću.....	141
4.10.3. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ponašanje povezano sa depresijom.....	152
4.10.4. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na bihevioralne i EEG karakteristike konvulzivnog ponašanja.....	153
4.10.5. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na histološke karakteristike tkiva prostate.....	160
5. Diskusija.....	161
6. Zaključci.....	190
7. Literatura.....	192

1. UVOD

1.1. Sindrom hroničnog pelvičnog bola

Hronični pelvični bol podrazumeva postojanje hroničnog, dugotrajnog bola u regiji male karlice koji je glavni simptom strukturnih ili funkcionalnih patoloških procesa koji zahvataju anorektalnu regiju, mokraćnu bešiku, reproduktivni sistem ili nerve i mišiće karličnog dna (M. Potts 2016). U slučaju postojanja strukturnih promena male karlice, uzrok hroničnog pelvičnog bola se jasno može definisati, dok se kod funkcionalnih promena njegovo postojanje ne može objasniti poznatim organskim uzrokom (Clemens 2008).

Funkcionalni poremećaji se u zavisnosti od predominantne lokalizacije bola mogu klasifikovati u anorektalne sindrome, sindrome mokraćne bešike i prostatične bolne sindrome (Sadler i Kolber 2016). Intersticijalni cistitis (eng. interstitial cystitis, IC), kao reprezentativni primer bolnog sindroma povezanog sa mokraćnom bešikom se najčešće dijagnostikuje kod žena, dok je u populaciji muškaraca najčešće dijagnostikovani hronični bolni sindrom povezan sa prostatom nazvan hronični prostatitis/sindrom hroničnog pelvičnog bola (eng. chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome, CP/CPPS). Iako se IC i CP/CPPS razlikuju, u osnovi dele iste etiopatogenetske faktore i kliničke manifestacije, te se često svrstavaju pod zajedničkim pojmom urološkog hroničnog pelvičnog sindroma (Potts i Payne 2012).

1.1.1. Definicija i klasifikacija

Glavni simptom obolelih od CP/CPPS predstavlja hronični bol u regiji male karlice, koji traje najmanje 3-6 meseci, a lokalizovan je u predelu perineuma, skrotuma, rektuma, testisa ili penisa, a često se propagira u donji deo leđa ili abdomen (Nickel 2011). Bol može nastati spontano ili je provociran ejakulacijom kada se definiše kao ejakulatorni bol (John i sar. 2001). Hronični bol je često udružen i sa simptomima donjeg urinarnog trakta koji podrazumevaju opstruktivne ili iritativne probleme sa mokrenjem, ali i sa erektilnom disfunkcijom (Chen i sar. 2015).

Iako se danas zna da prostata nije glavno uporište bola u sindromu CP/CPPS, prema klasifikaciji Nacionalnog Instituta za zdravlje (eng. National Institutes of Health, NIH) koja je usvojena 1995. godine i publikovana 1999. godine, ovaj sindrom se svrstava u kategoriju III prostatitisa. Klasifikacija prostatitisa prema NIH obuhvata nekoliko dijagnostičkih grupa: I – akutni prostatitis, II- hronični bakterijski prostatitis, IIIA- inflamatorni tip CP/CPPS, IIIB- neinflamatorni tip CP/CPPS, IV – asimptomatski inflamatorni prostatitis (Krieger 1999). Osnovne kliničke manifestacije i laboratorijski nalazi karakteristični za pojedine NIH klase prikazani u Tabeli 1.

Inflamacija prostate ima bakterijsku etiologiju samo u 5-10% slučajeva, dok u ostalim slučajevima uzrok ostaje nerazjašnjen. S obzirom da se ranije mislilo da je zapaljenje prostate glavni uzrok bola, prema klasifikaciji iz 1978. godine, ovaj sindrom je nazvan i prostatodinija (Drach i sar. 1978). Termin sindrom hroničnog pelvičnog bola najbolje reflektuje udruženost skupa simptoma u ovom oboljenju. Kategorija IIIA prema NIH podrazumeva inflamatorni tip CP/CPPS koji se karakteriše prisustvom leukocita u eksprimatu prostate, ejakulatu i preseminalnoj tečnosti, dok su pacijenti sa odsustvom ovakvog nalaza svrstani u NIH IIIB kategoriju neinflamatornog CP/CPPS.

Tabela 1. NIH klasifikacija prostatitisa sa korespondentnim kliničkim nazivom i glavnim kliničkim manifestacijama i laboratorijskim nalazima

NIH klasa	Klinički naziv	Kliničke manifestacije i laboratorijski nalazi
Tip I	Akutni bakterijski prostatitis	<ul style="list-style-type: none"> Izraženi simptomi zapaljenja prostate i simptomi sistemske infekcije. Akutna bakterijska infekcija urinarnog trakta sa bakteriurijom i piurijom.
Tip II	Hronični bakterijski prostatitis	<ul style="list-style-type: none"> Hronično zapaljenje prostate sa ili bez simptoma. Rekurentne bakterijske infekcije urinarnog trakta uzrokovane istom bakterijom.
Tip IIIA	Inflamatorni CP/CPPS	<ul style="list-style-type: none"> Hronični pelvični bol uz moguće probleme sa mokrenjem bez prisustva bakterijske infekcije. Leukociti u eksprimatu prostate ili semenoj tečnosti su prisutni.
Tip IIIB	Neinflamatorni CP/CPPS	<ul style="list-style-type: none"> Hronični pelvični bol uz moguće probleme sa mokrenjem bez prisustva bakterijske infekcije. Leukociti u eksprimatu prostate ili semenoj tečnosti nisu prisutni.
Tip IV	Asimptomatski inflamatorni prostatitis	<ul style="list-style-type: none"> Dokazana inflamacija prostate, ali bez simptoma ili infekcije urinarnog trakta.

Tabela izrađena prema: Krieger 1999 i Vasdev 2011.

S obzirom na nerazjašnjenu etiopatogenezu i nestandardizovane terapijske postupke, ovaj bolni sindrom se ne može jasno svrstati u samo jednu kategoriju višeosovinskog klasifikacionog sistema koji je ustanovljen od strane Međunarodnog udruženja za izučavanje bola (eng. International Association for the Study of Pain, IASP) (Treede i sar. 2019). Najnoviji višeosovinski klasifikacioni sistem Evropskog udruženja urologa (eng. European Association of Urology, EAU) iz 2013. godine, koji je inspirisan IASP klasifikacijom, je CP/CPPS bliže definisao kroz sedam osovina. U osovini I koja hronični bol u karlici deli prema glavnom uzroku njegovog nastanka, CP/CPPS je definisan kao bolni sindrom, s obzirom da ne postoji jasni uzrok. U osovini II koja definiše zahvaćeni organski sistem, CP/CPPS se može definisati kao urološki sindrom, ali i kao neuropatski, psihosocijalni ili seksološki. Prema osovini III, glavno uporište bola mogu biti različiti pelvični organi, a najčešće su to: prostata, mokraćna bešika, skrotum, testisi, penis, ali i anus ili muskulo-skeletni elementi karličnog dna. Osovine IV-VII bliže definišu bolne senzacije u smislu prostorne i vremenske distribucije, jačine i karakteristika bola i udruženosti sa psihosocijalnim komorbiditetima (Engeler i sar. 2013). Ovakva sveobuhvatna i detaljna klasifikacija ima za cilj bliže definisanje podtipova CP/CPPS u cilju pronalaska personalizovanog terapijskog modaliteta za svakog pacijenta.

Imajući u vidu nerazjašnjenu etiopatogenezu, širok spektar simptoma i prisustvo komorbiditeta, koristili smo termin hronični prostatitis/sindrom hroničnog pelvičnog bola, kao sveobuhvatni termin koji najbliže definiše ovaj entitet.

1.1.2. Epidemiološke i demografske karakteristike

Novije studije procenjuju da incidencija simptoma koji upućuju na CP/CPPS iznosi 3,3 slučaja na 1000 odraslih muškaraca godišnje (Clemens i sar. 2005), što bi nakon ekstrapolacije ovog podatka na stanovništvo Srbije iznosilo više od 7000 slučajeva godišnje. Prevalencija simptoma povezanih sa prostatitisom se kreće od 2,2% do 25,3% širom sveta (Zhang i sar. 2019b) i razlikuje se među zemljama i populacijama. Ovakve velike razlike u prevalenciji CP/CPPS su povezane sa brojnim faktorima koji uključuju: genetske faktore, etničku pripadnost, kulturološki razvoj nacije, nivo obrazovanja, psihološki status, stil života, navike

vezane za ishranu, bračno stanje i socio-ekonomske uslove. Nejasno definisani dijagnostički kriterijumi za CP/CPPS predstavljaju glavnu prepreku za preciznu epidemiološku i demografsku karakterizaciju obolelih. Međutim, treba naglasiti da čak 35-50% muškaraca tokom životnog veka iskusi neke od simptoma CP/CPPS (Gao i sar. 2015). Simptomi vezani za CP/CPPS se najčešće javljaju kod muškaraca starosti između 35 i 45 godina, koji su Evropeidne rase, visoko obrazovani, zaposleni i žive u zajednici sa partnerkom (Schaeffer i sar. 2002). Srednja vrednost prevalencije u različitim studijama je pokazala da ona iznosi od 6,9% u Severnoj Americi do 12,2% u Africi, dok je u Evropi ona 8,6%, a oko 7,5% u Aziji i Australiji (Krsmanovic i sar. 2014). Relativno bliske vrednosti prevalencija na različitim kontinentima sugerišu da se CP/CPPS može razviti nezavisno od specifičnih faktora sredine kojima su pojedinci izloženi.

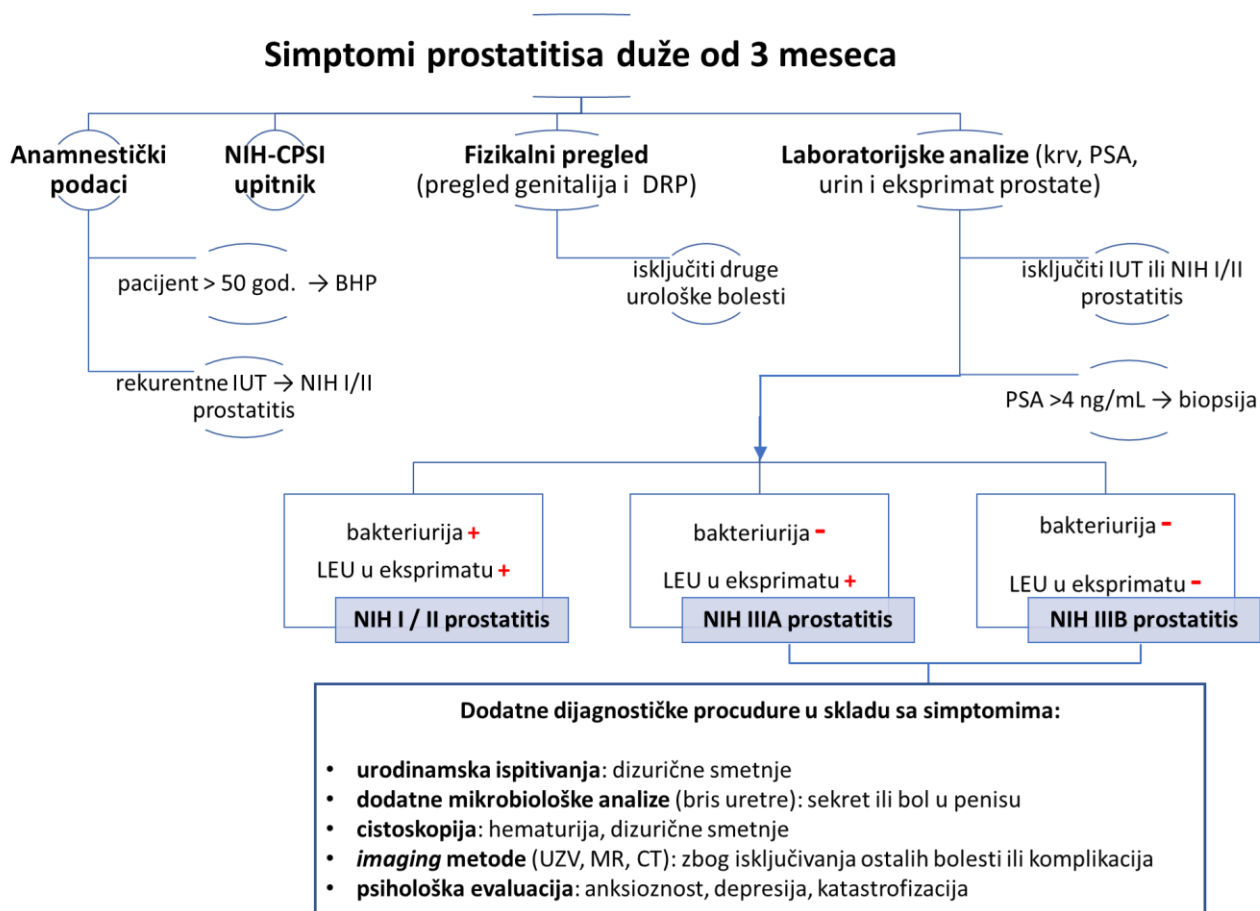
Većina farmakoloških terapijskih pristupa pokazuje nedovoljnu efikasnost u lečenju CP/CPPS. Usled dugotrajnog i progresivnog hroničnog bola kod ovih pacijenata česta je pojava novih psihosocijalnih komorbiditeta poput anksioznosti, depresije, radne nesposobnosti, koji uvode obolele u začarani krug koji neminovno vodi ka socijalnoj izolaciji, smanjenom samopoštovanju i posledičnom smanjenom kvaliteta života (Nickel i sar. 2007). Smanjenje kvaliteta života kod obolelih od CP/CPPS je uporedivo sa stepenom smanjenja kvaliteta života obolelih od infarkta miokarda ili Kronove bolesti, a čak veće od smanjenja kvaliteta života kod pacijenata sa dijabetesom ili srčanom insuficijencijom (Tripp i sar. 2006). Iako su brojne studije pokazale da psihosocijalni faktori dovode do smanjenog kvaliteta života obolelih od CP/CPPS, tačan mehanizam ove povezanosti, kao ni adekvatne strategije psihosocijalnog tretmana obolelih još uvek nisu razvijeni.

1.1.3. Klinička slika i dijagnostički kriterijumi

Ne postoje jasni dijagnostički kriterijumi i algoritmi koji bi na lak način doveli do dijagnoze CP/CPPS. Najčešći način postavljanja dijagnoze je isključivanje ostalih bolesti koje mogu imati sličnu simptomatologiju (Polackwich i Shoskes 2016). Prihvatljiv dijagnostički algoritam prikazan je na Slici 1.1.3.1.

Na CP/CPPS treba posumnjati u slučaju postojanja 4 esencijalna elementa: 1) simptomi su lokalizovani u regiji karlice ili donjeg dela abdomena; 2) postoje laboratorijski dokazane inflamatorne promene u prostati; 3) simptomi (najčešće bol i nelagoda) potiču od prostate ili donjeg urinarnog trakta; 4) identifikacija potencijalnog uzroka koji je posle dužeg ili kraćeg perioda inkubacije doveo do ispoljavanja simptoma (Zhang i sar. 2020a). Među najčešćim simptomima koji pacijente sa CP/CPPS dovode kod lekara su: spontani bol u karlici ili perineumu koji traje najmanje 3 meseca, bol u abdomenu, učestalo mokrenje, bol u predelu spoljašnjih genitalija ili donjem delu leđa, dispareunija, bol nakon ejakulacije, bol tokom sedenja, erektilna disfunkcija, neobjašnjivi umor (Nguyen i Shoskes 2008).

Za procenu ozbiljnosti simptoma i merenje ishoda lečenja u dugoročnom praćenju obolelih (Dun i sar. 2021) koristi se NIH upitnik za izračunavanje indeksa simptoma hroničnog prostatitisa (The NIH Chronic Prostatitis Symptom Index , NIH-CPSI) (Litwin i sar. 1999). Upitnik se sastoji od devet pitanja (ukupni skor 0-43) na koja ispitanik odgovara metodom samoprocene, a ona su grupisana u 5 pitanja o lokalizaciji, jačini, trajanju i karakteristikama bola (skor bola 0-21), zatim u 2 pitanja o karakteristikama pražnjenja mokraćne bešike i učestalosti mokrenja (skor mokrenja 0-10) i u 2 pitanja o kvalitetu života koja uzimaju u obzir limitacije u životnim aktivnostima i samoprocenjeni psihosocijalni distres (skor kvaliteta života 0-12) (Wagenlehner i sar. 2013). S obzirom da se pomoću rezultata ovog upitnika ipak ne može napraviti jasna granica između simptoma CP/CPPS i simptoma ostalih uroloških bolesti (Roberts i sar. 2004), njegova uloga u dijagnostikovanju CP/CPPS je diskutabilna.



Slika 1.1.3.1. Dijagnostički algoritam u postavljanju dijagnoze CP/CPPS sa prikazom dijagnostičkih postupaka.

Anamnestički treba identifikovati prisustvo faktora rizika koji su indikativni za CP/CPPS, kao što su prethodno postojanje bakterijskog prostatitisa, povreda kuka ili kostiju male karlice, hiperaktivnost zglobova, lečenje polno prenosivih bolesti, infekcija urinarnog trakta ili gljivičnih infekcija, urolitijaza, postojanje ingvinalne kile, prethodna radijaciona terapija, hiperaktivna mokraćna bešika, endokrinološki poremećaji, neuropatske bolesti i psihološke smetnje (anksioznost, depresija, poremećaji ličnosti) (Shoskes i sar. 2009). Starost pacijenta je najvažnija za odluku o daljem dijagnostičkom algoritmu, jer se kod starijih od 50 godina ide ka isključenju karcinoma prostate ili benigne hiperplazije prostate, dok je kod mlađih od 50 godina potrebno ići u pravcu infektivnog prostatitisa ili CP/CPPS (Zhang i sar. 2019b). Fizikalni pregled obolelog od CP/CPPS uključuje detaljan pregled penisa, skrotuma, perineuma, testisa, ingvinalnih regija i prostate. Najbitnije je isključiti postojanje ingvinalne hernije, muskuloskeletnih sindroma i uklještenje nerava (Doiron i Nickel 2018). Digitorektalni pregled prostate pruža orijentacioni uvid o veličini, konzistenciji, simetriji i turgoru prostate i kod najvećeg broja obolelih od CP/CPPS ovaj pregled daje uredan nalaz očekivan za starosnu dob (Magistro i sar. 2016). Takođe, pri fizikalnom pregledu se savetuje i palpacija muskulature karličnog dna, s obzirom da se kod ovih pacijenata može očekivati prisustvo hipertonusa ovih mišića ili postojanje specifičnih okidačkih tačaka čija palpacija provocira nastanak bolnih senzacija (Masterson i sar. 2017). Prema: Magistro i sar. 2016. BHP = benigna hiperplazija prostate, DRP = digitorektalni pregled, IUT = infekcija urinarnog trakta, PSA = prostata-specifični antigen, LEU = leukociti, UZV = ultrazvuk, MR = magnetna rezonancija, CT = kompjuterizovana tomografija

Rutinskim ultrazvučnim pregledom isključiti postojanje bilo kakvih patoloških procesa u maloj karlici, s obzirom da se kod obolelih od CP/CPPS ultrazvučnim pregledom konstatuje uredan nalaz uz eventualno prisustvo nespecifičnih promena poput mikrolitijaze prostate i *doppler* indeksa koji ukazuju na blago povišen protok krvi u prostati (Wee i Shoskes 2008).

Laboratorijska ispitivanja u smislu analize inflamatornih parametara i nivoa prostata-specifičnog antigena (eng. Prostate Specific Antigene, PSA) u serumu su sledeći korak u ispitivanju, ali u najvećem broju slučajeva daju vrednosti u granicama referentnih (Motrich i sar. 2020). U slučaju veoma izražene elevacije ovog markera, pacijente treba tretirati prema protokolu za dijagnostikovanje infektivnih bolesti prostate ili karcinoma. Određene studije su pokazale da kod obolelih od CP/CPPS postoji blaga elevacija PSA koja ne prelazi 4,0 ng/mL (Nadler i sar. 2006). Mikrobiološka ispitivanja (urinokultura, bris uretre, spermokultura i kultura eksprimata prostate) kod ovih pacijenata ne pokazuju prisustvo patogenih mikroorganizama (Choi i sar. 2000).

Za diferencijalnu dijagnozu prostatitisa se često izvodi Meares-Stameyev test 4 čaše (Nickel i sar. 2006b) koji podrazumeva uzorkovanje inicijalnih 10 mL urina u prvoj čaši u kome se očekuje mikrobiološka flora uretre. Potom se u drugoj čaši uzorkuje urin koji predstavlja srednji mlaz i u kome se analiziraju potencijalni mikroorganizmi porekla iz mokraćne bešike. Nakon toga se vrši masaža prostate u trajanju od jednog minuta i nakon nekoliko minuta se uzorkuje u trećoj čaši nekoliko kapi eksprimata prostate koji se pojavljuje na izlazu uretre. Na kraju testa se u četvrtoj čaši uzorkuje ostatak eksprimata prostate sa još 10 mL urina. Uzorak u trećoj i četvrtoj čaši se koristi za analizu prisustva mikroorganizma u prostati. Prisustvo leukocita u semenoj tečnosti (leukospermija) ili eksprimatu prostate je očekivan nalaz kod klase IIIA prostatitisa, dok je ovaj nalaz odsutan kod klase IIIB (Krieger i sar. 2003). Međutim, broj leukocita u uzorcima ne korelira sa jačinom simptoma (Nickel i sar. 2003). Pokazano je da ne postoji korelacija između stepena inflamatornih promena u tkivu prostate i ranijeg početka bolesti (Nickel i sar. 2007), kao i da se kod samo 5% do 33% obolelih mogu naći inflamatorne promene u tkivu prostate (True i sar., 1999 Pontari i Ruggieri, 2004), te se patohistološko ispitivanje u cilju postavljanje dijagnoze CP/CPPS ne radi rutinski.

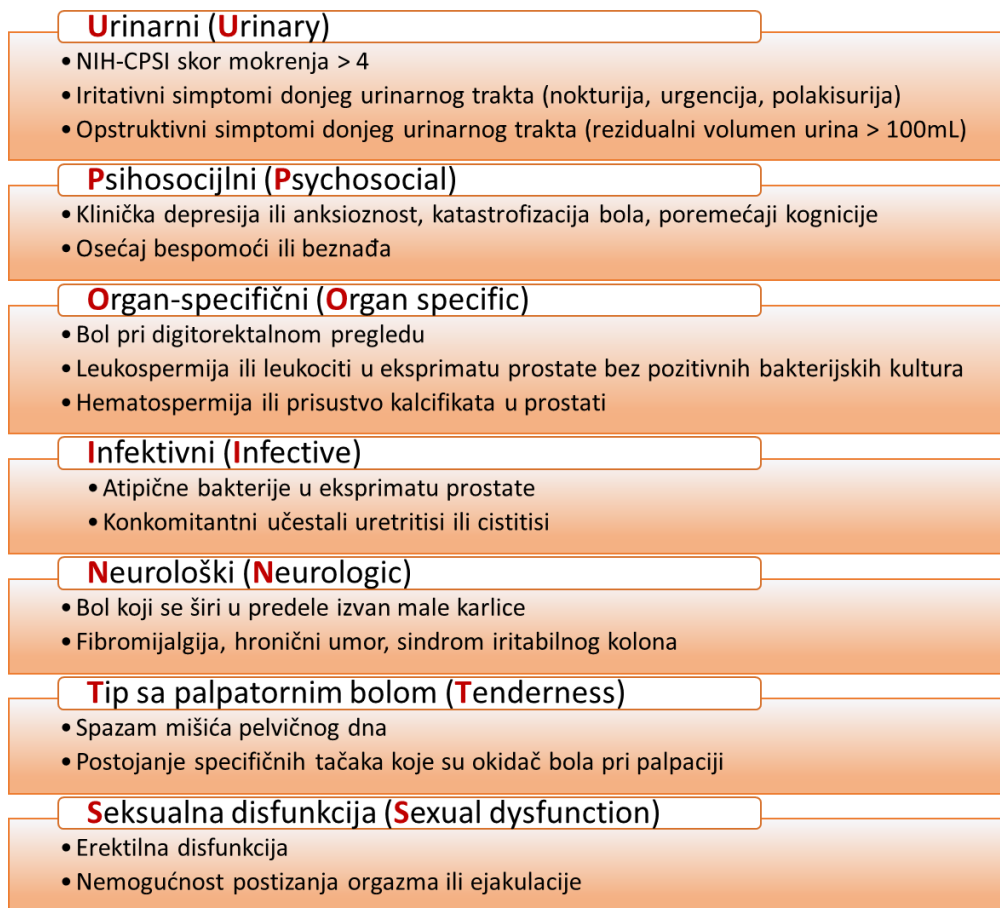
U slučaju da pacijent prijavljuje opstruktivne probleme sa mokrenjem, potrebno je uraditi cistoskopiju i urodinamska ispitivanja. U određenom procentu obolelih, ova ispitivanja mogu pokazati povećan tonus detrusora mokraćne bešike, povišen rezidualni volumen i smanjenu brzinu pražnjenja mokraćne bešike (Hruz i sar. 2003).

Složenije *imaging* metode poput kompjuterizovane tomografije i magnetne rezonancije male karlice nisu svrsishodne u primarnom dijagnostičkom postupku, jer se kod obolelih od CP/CPPS u najvećem broju slučajeva nailazi na normalan nalaz (Shukla-Dave i sar. 2004). S obzirom da se kod velikom broja obolelih sreću psihosocijalni problemi, kada oni dominiraju kliničkom slikom i ne mogu se kupirati terapijom, u cilju isključivanja primarnog psihološkog problema ili psihijatrijske bolesti, neophodna je i psihološka evaluacija (Magistro i sar. 2016).

Sve navedene činjenice koje su vezane za dijagnostički postupak u cilju postavljanja dijagnoze CP/CPPS navode na zaključak da je neophodno učiniti standardizaciju terminologije, reviziju dijagnostičkih kriterijuma, razvoj jasnog dijagnostičkog algoritma i akcenat u istraživanjima staviti na etiopatogenezu i prateće komorbiditete ovog sindroma, a sve u cilju pronalaženja novih medikamentoznih i nemedikamentoznih terapijskih protokola.

U cilju individualizovanog i što usmerenijeg terapijskog pristupa u lečenju CP/CPPS, Shoskes i sar. su 2009. godine, na osnovu kliničke prezentacije i subjektivne deskripcije simptoma, izvršili fenotipizaciju obolelih u 6 fenotipskih grupa i formirali „UPOINT“ sistem (Shoskes i sar. 2009). Prema prvom originalnom istraživanju (Shoskes i sar. 2009), procenat obolelih po UPOINTS fenotipskim grupama je bio redom: 52%, 34%, 61%, 16%, 37%, 53%.

Kasnije je ovom sistemu dodat i sedmi fenotip, te je kreiran modifikovani UPOINTS sistem, u kome je poslednji fenotip obeležen kao *(S)exual dysfunction* i u njemu dominira simptomatologija koja se odnosi na seksualnu disfunkciju i probleme sa erekcijom (Magistro i sar. 2016). Korišćenje UPOINTS sistema, čije je detaljno objašnjenje dato na Slici 1.1.3.2., se strogo preporučuje pri dijagnostičkom postupku obolelih od CP/CPPS jer pomera fokus dijagnoze i terapije koji je usmeren ka simptomima (Shoskes i sar. 2010).



Slika 1.1.3.2. UPOINTS fenotipizacija obolelih od CP/CPPS

Na osnovu ovog fenotipskog sistema, klinička prezentacija ovog sindroma se može opisati kao: *(U)rinarni* – urinarni, *(P)sychosocial* – psihosocijalni, *(O)rgan specific* – organ specifični, *(I)nfection* – infektivni, *(N)eurollogic* – neurološki tip, *(T)enderness* – tip u kome dominira bol provociran palpacijom, *(S)exual dysfunction* – tip u kome dominira seksualna disfunkcija. Prema: Shoskes i sar. 2009.

1.1.4. Etiopatogeneza

Efikasnošću trenutno poznatih terapijskih modaliteta za lečenje CP/CPPS nisu zadovoljni ni oboleli ni lekari. Jedan od glavnih razloga nedovoljno efikasnog lečenja je upravo nejasna etiopatogeneza ovog sindroma.

Poslednje dve decenije istraživanja na ovom polju su donekle doprinele identifikaciji pojedinih patofizioloških mehanizama. Oni su međusobno isprepletani i najčešće se zasnivaju na narušenom integritetu i funkciji uroepitela, skrivenoj infekciji, autoimunskom poremećaju, endokrinom disbalansu, disfunkciji muskuloskeletnih elemenata karličnog dna, disfunkcionalnom mokrenju, perifernoj i centralnoj senzitivizaciji i neuroplastičnosti i na neizostavnim psihosocijalnim faktorima (Clemens 2008).

Infekcija kao pretpostavljeni etiopatogenetski mehanizam CP/CPPS se danas smatra istorijskom pretpostavkom, s obzirom na to da antibiotici nemaju uspeha u lečenju ovog sindroma i da najveći broj studija nije uspeo da identifikuje mikroorganizme kod obolelih od ovog sindroma (Pontari 2013). Da prisustvo bakterija nije uzročnik CP/CPPS je pokazalo istraživanje u kome je upotrebom Meares-Stameyev testa 4 čaše konstatovano da oboleli od ovog sindroma i asimptomatski zdravi muškarci imaju sličan broj bakterija u urinu i eksprimatu prostate (Nickel i sar. 2003).

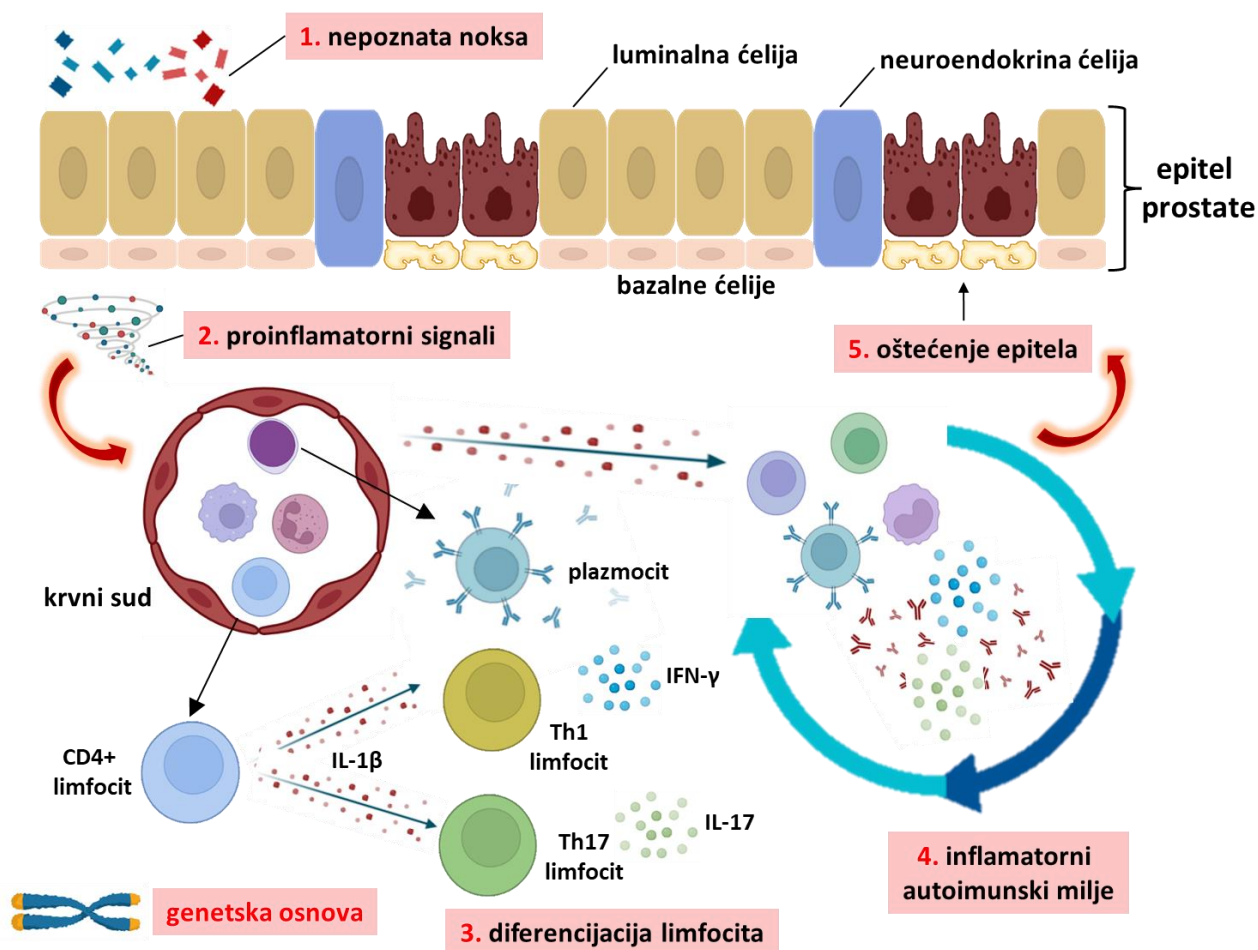
Standardne mikrobiološke tehnike zasejavanja bakterijskih kultura retko identifikuju porast patogenih mikroorganizama, ali se upotrebom molekularnih metoda kod određenog broja obolelih može identifikovati češće prisustvo *Burkholderia cenocepacia* bakterijskog soja u urinu (Nickel i sar. 2015). Još jedna pilot studija je ispitivala ulogu bakterije *H. Pylori*, te je na osnovu statistički značajno učestalije seropozitivnosti kod obolelih od CP/CPPS, u odnosu na zdrave pojedince, zaključeno da ova bakterije posredstvom indukcije autoimunskog poremećaja može imati ulogu u etiopatogenezi ovog sindroma (Karatas i sar. 2010).

Anamnestički podatak obolelih o ranije postojećem uretritisu i seksualno prenosivim bolestima izazvanim uzročnicima kao što su *M. hominis*, *U. urealyticum*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, *Herpes simplex virus*, *Candida spp.*, dovodi do zaključka da infekcija može biti samo precipitirajući faktor nastanka ovog sindroma (Kim i sar. 2011b). Bazična ispitivanja upotrebom animalnog modela CP/CPPS na dva različita soja genetski modifikovanih miševa su pokazala da je prisustvo uropatogenog soja *E. coli* dovelo do razvoja dugotrajnijeg i održivog bola samo kod miševa koji su bili genetski pogodni tome (Rudick i sar. 2011). Dakle, pretpostavka je da infekcija može biti potencijalno okidajući faktor da se kod genetski podložnih osoba, usled izmenjenog imunološkog odgovora, razvije inflamacija sa nervnim oštećenjem, što u prisustvu specifičnog inflamatornog miljea dovodi do hronične inflamacije prostate, disfunkcije muskulature pelvičnog dna, periferne i centralne senzitivacije i razvoja hroničnog neuropatskog bola (Breiser i sar. 2017).

Na **inflamaciju** kao pretpostavljeni etiopatogenetski mehanizam upućuje i sam termin „prostatitis“ u nazivu ovog sindroma, iako je dokazano da samo trećina pacijenata sa simptomima CP/CPPS ima dokazano zapaljenje prostate (Pontari i Ruggieri 2004). Brojni dokazi iz humanih i animalnih studija ukazuju da razvoj ovog sindroma može biti posledica disregulacije u inflamatornom odgovoru sa posledičnim razvojem **autoimunskog procesa** usmerenog prema antigenima prostate (Breiser i sar. 2017).

Autoimunski zapaljenski odgovor (videti Sliku 1.1.4.1.) u tkivu prostate je dokazan u nekoliko humanih studija koje su potvrdile da u eksprimatu prostate ili semenoj tečnosti postoje autoreaktivni T-limfociti usmereni prema enzimu prostatičnoj kiseloj fosfatazi (Kouivaskaia i sar. 2009), poznatijem kao PSA antigen. Takođe, nalaz IFN γ -sekretujućih Th1 limfocita usmerenih prema proteinima prostate (Motrich i sar. 2005) ili prisustvo povišenih serumskih nivoa monoklonalnih IgG antitela prema antigenima prostate (Maricque i sar. 2011) potvrđuju ovu teoriju. Patohistološka ispitivanja sa nalazom intraacinusnih T-ćelijskih infiltrata u tkivu prostate uz deponovanje IgM i IgA antitela potvrđuju teoriju neinfektivnog zapaljenskog odgovora (Murphy i sar. 2014). Analiza eksprimata prostate i semene tečnosti je kod IIIA tipa prostatitisa potvrdila postojanje ćelijskog zapaljenskog infiltrata sastavljenog od granulocita, makrofaga, aktiviranih T i B limfocita uz visok nivo inflamatornih citokina (IL-1 β , TNF α , IFN γ), hemokina i produkata degranulacije mastocita (John i sar. 2003).

Autoimunska hipoteza nastanka CP/CPPS podrazumeva postojanje IFN γ -sekretujućih Th1 ćelija specifičnih prema antigenima prostate (Chen i sar. 2021). Pojedine humane studije su proučavale i ulogu Th17 ćelija i IL-17 u patogenezi CP/CPPS, ali povećana koncentracija IL-17 nije dokazana kod svih obolelih od CP/CPPS (Murphy i sar. 2014).



Slika 1.1.4.1. Inflamacija kao pretpostavljeni etiopatogenetski faktor razvoja CP/PPS

Nepoznata noksa dovodi do inicijalnog oštećenja koje izaziva sekreciju proinflamatornih citokina. Usled specifične genetske predispozicije, sledi diferencijacija limfocita i nastanak Th1 i Th17 subpopulacije limfocita, kao i diferencijacija B limfocita u plazmocyte. Nastaje inflamatorni autoimuni odgovor koji dovodi do daljih oštećenja epitela prostate. IL-1β = interleukin 1-beta, IL-17 = interleukin 17, IFN-γ = interferon gama. Prema: Murphy i sar. 2014.

Istraživanja vršena na različitim animalnim modelima ovog sindroma su potvrdila da inflamacija i autoimuni procesi igraju značajnu ulogu u razvoju ovog sindroma (Vykhovanets i sar. 2007). Na mehaničkom modelu CP/PPS izazvanom parcijalnom opstrukcijom uretre *Wistar* pacova je pokazano da postoji limfocitna infiltracija prostate sa intersticijalnim edemom kao posledica refluksa urina (Takechi i sar. 1999). Hemijski modeli CP/PPS su takođe potvrdili inflamatornu osnovu razvoja ovog sindroma, jer je intraprostaticna injekcija botulinum toksina A dovela do edema tkiva prostate i limfocitne infiltracije, sa pratećom povećanom ekspresijom COX-2 u spinalnim senzornim i motornim neuronima (Chuang i sar. 2008), dok je intraprostaticna injekcija kapsaicina ekscitacijom C tipa senzornih vlakana dovela do neurogene inflamacije i razvoja hronične inflamacije proste i hroničnog pelvičnog bola, i to na dozno-zavistan način (Chuang i sar. 2007). Teoriju o neurogenoj inflamaciji kao bitnom etiopatogenetskom faktoru je potkrepila i eksperimentalna studija sa intraprostaticnom injekcijom formalina koja je pored inflamatornih promena prostate indukovala i povišenu ekspresije transkripcionog faktora c-Fos (marker hiperekscitabilnosti neurona) i supstancije P u lumbosakralnoj kičmenoj moždini (Ishigooka i sar. 2002). Istraživanja na animalnom modelu eksperimentalnog autoimunskog prostatitisa su potvrdila postojanje IFNγ-sekretujućih Th1 limfocita specifičnih za antigene prostate i povišen nivo citokina u ejakulatu životinja, a takođe

i postojanje inflamatornih lezija tkiva prostate (Rudick i sar. 2008). Dokazano je da postoji i povećana ekspresija transkripcionih faktora IRF1 i STAT1 koji su uključeni u IFN γ -posredovanom signalnom putu (Motrich i sar. 2010), uz povećanu ekspresiju hemokinskih receptora CXCR3 i CCR5 na limfocitima koji su ključni za infiltraciju tkiva prostate Th1 ćelijama (Bresler i sar. 2013). Kada je u pitanju citokinski profil prostatitisa, većina studija se bavila profilom IL17, međutim uloga IL-1 β i IL-6 nije do sada ispitana iako je poznat njihov značajan doprinos u inflamatornim procesima (Kozak i sar. 1998).

Veruje se da u osnovi razvoja hroničnog bola koji prati CP/CPPS leže **neurofiziološki mehanizmi** koji su u tesnoj vezi sa inflamacijom (Slika 1.1.4.2.). Kod obolelih od CP/CPPS bolne senzacije su rezultat kombinacije spontanog, primarnog, visceralnog bola i sekundarnog somatskog ili reflektovanog bola (Pontari i Ruggieri 2004). U inicijalnom stadijumu bolesti, kao posledica dejstva nepoznate nokse nastaje visceralni nociceptivni bol koji uporište ima u prostati, međutim, kao rezultat inflamacije i oštećenja nerava i drugih struktura nervnog sistema nastaje neuropatski bol koji perzistira u vidu hroničnog somatskog bola u odsustvu nokse koja ga je inicijalno izazvala (Silva i sar. 2017). Usled hronične inflamacije i oslobađanja neurotransmitera, lipidnih medijatora, komponenti sistema komplementa, citokina i hemokina, dolazi do razvoja neuropatskog bola kao centralnog mehanizma u CP/CPPS kroz procese centralne i periferne senzitivacije, što se kod obolelih manifestuje u vidu spontanog bola, hiperalgezije i alodinije (Grinberg i sar. 2020).

Periferna senzitivacija podrazumeva smanjenje praga depolarizacije primarnog perifernog senzornog neurona. Za nastanak periferne senzitivacije najodgovorniji su procesi koji se dešavaju u interakciji neurona sa ćelijama imunskog sistema (mastociti, makrofagi i limfociti). U prisustvu hronične inflamacije leukociti oslobađaju brojne citokine (IL-1 β , IL-6 i TNF α) koji se vezuju za receptore na ćelijskoj membrani dendrita primarnog senzornog neurona i tako vrše amplifikaciju prenosa signala (Kawasaki i sar. 2008). Dodatno, neuroni u prisustvu citokina oslobađaju u tkivo prostate supstanciju P (SP) i nervni faktor rasta (nerve growth factor, NGF) koji pored amplifikacije inflamatornih promena tkiva (edem, ekstravazacija proteina) dovode do **neurogene inflamacije** u smislu regrutovanja novih ćelija imunskog sistema (Seidel i sar. 2022).

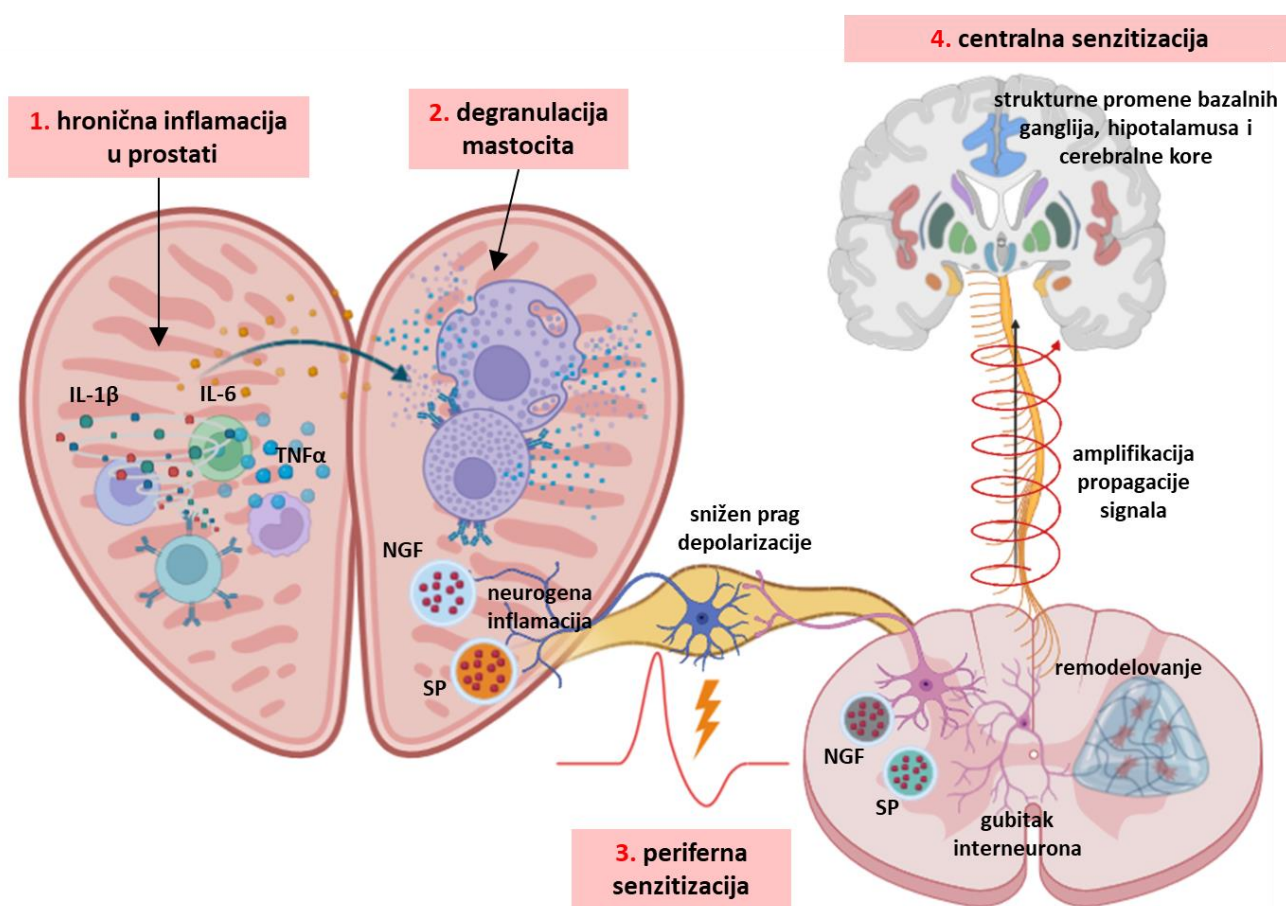
Smatra se da mastociti, kao tkivno-rezidentne ćelije imunskog sistema imaju centralnu ulogu u ovim procesima. U odgovoru na citokine i hemokine, SP i NGF, dolazi do degranulacije mastocita i oslobađanja histamina, serotonina, citokina, hemokina, prostaglandina, neuropeptida (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) i dodatno NGF i SP, što za posledicu ima degranulaciju još većeg broja mastocita i formiranja začaranog kruga zbog dalje promocije neurogene inflamacije (Done i sar. 2012). Teoriju o centralnoj ulozi mastocita u razvoju neurogene inflamacije i periferne senzitivacije potkrepljuju dokazi da mastociti ekspresiraju receptore za NGF i da se kod pacijenata sa CP/CPPS mogu pronaći u većem broju u biopsijama tkiva prostate, kao i u eksprimatu prostate i semenoj tečnosti (Roman i sar. 2014). Tretman obolelih od CP/CPPS stabilizatorom membrane mastocita, pentozan polisulfatom, dovodi do značajnog analgetskog dejstva i kontrole bolnih simptoma (Nickel i sar. 2005).

Osim procesa u tkivu prostate i perifernom nervnom sistemu, dolazi i do promena u kičmenoj moždini i višim delovima CNS, te se smatra da **centralna senzitivacija** u smislu smanjenja praga depolarizacije, povećane frekvencije akcionih potencijala i aktivacije većeg broja senzornih neurona u kičmenoj moždini, talamusu i cerebralnom korteksu ima neizmerno veliki udeo u razvoju hroničnog bola kod obolelih od CP/CPPS (Nickel i sar. 2006a). Biohemijske i morfološke promene unutar CNS su posledica salvi signala koji potiču od SP iz aferentnih C senzornih vlakana (M. Potts 2016). Iako su dokazane biohemijske i morfološke promene u talamusu i senzornom korteksu obolelih od CP/CPPS, najveću pažnju privlače promene u sivoj masi unutar dorzalnih rogova kičmene moždine, a najčešće se pominje

povećana ekspresija receptora za NGF i SP na membrani ovih neurona (Nickel i Touma 2012). Mehanizmi na kojima počiva centralna senzitivizacija se odnose na povećanu ekspresiju markera hiperekscitabilnosti (cFos), smanjen broj inhibitornih interneurona, uspostavljanje aberantnih sinapsi i razvoj dugotrajne potencijacije (Harter i sar. 2018).

Upotreba GABAergičkih lekova koji ispoljavaju antiepileptičko, anksiolitičko i analgetsko dejstvo delujući na interneurone kičmene moždine je opravdana kod pacijenata sa ovim sindromom (Chiechio i sar. 2009). Postoje i celularni mehanizmi koji leže u osnovi hiperekscitabilnosti, a najčešće se pominje fosforilacija receptora za neurotransmitere uključene u proces bolnih senzacija (Kawasaki i sar. 2008).

Prisustvo centralne senzitivizacije kod obolelih od CP/CPPS potkrepljuju *neuroimaging* ispitivanja koja su dokazala neuralno remodelovanje i funkcionalne promene unutar insularnog kortkese, prednjeg cingulatnog i postcentralnog girusa (Zhao i sar. 2022).



Slika 1.1.4.2. Neurofiziološki mehanizmi u osnovi CP/CPPS

Hronična inflamacija u tkivu prostate indukuje **degranulaciju mastocita**. Usled prisustva IL-1 β , IL-6 i TNF- α porekla leukocita i produkata degranulacije mastocita (histamin, serotonin, citokini, hemokini, prostaglandini, neuropeptidi), snižava se prag depolarizacije primarnog senzornog neurona i nastaje **periferna senzitivizacija**, a dodatno ti neuroni sekretuju NGF i SP, te nastaje i **neurogena inflamacija**. Usled salvi signala iz primarnih neurona, pod dejstvom SP i NGF nastaje **centralna senzitivizacija** koja podrazumeva smanjen broj inhibitornih interneurona, uspostavljanje aberantnih sinapsi i razvoj dugotrajne potencijacije u kičmenoj moždini uz amplifikaciju prenosa signala ka mozgu i posledično remodelovanje hipokampusu, talamusa i delova moždane kore. IL-1 β = interleukin 1-beta, IL-6 = interleukin 6, TNF- α = faktor nekroze tumora-alfa, NGF = neuronski faktor rasta, SP = supstancija P.

Među mehanizmima koji leže u osnovi CP/CPPS bitno mesto zauzima i **disfunkcija muskuloskeletnih elemenata karličnog dna** (Grinberg i sar. 2020). Kod određenog broja obolelih koji se svrstavaju u (T) fenotip bolesti, uočeno je postojanje povećanog tonusa i spazma mišića karličnog dna koji okružuju prostatu uz postojanje fibroznih promena u njima po tipu miogeloze, te se palpacijom mišića i navedenih promena mogu identifikovati tačke koje su okidači bolnih senzacija (Tadros i sar. 2017). Palpacija ovih tačaka prilikom digitorektalnog pregleda se strogo preporučuje u cilju diferencijacije inflamatornog bola poreklom iz prostate i miofascijalnog bola koji se provocira palpacijom okidačkih tačaka (Polackwich i Shoskes 2016). Kao patofiziološki mehanizam se navodi centralna senzitivizacija. U terapiji obolelih iz (T) fenotipa bitno mesto zauzima fizikalna terapija usmerena na mišiće karličnog dna, zajedno uz bihevioralne tehnike miorelaksacije i manuelne tehnike miofascijalnog oslobađanja, a zadovoljavajuće rezultate daju i vežbe sa istezanjem i određene injekcije miorelaksanata (Hetrick i sar. 2003).

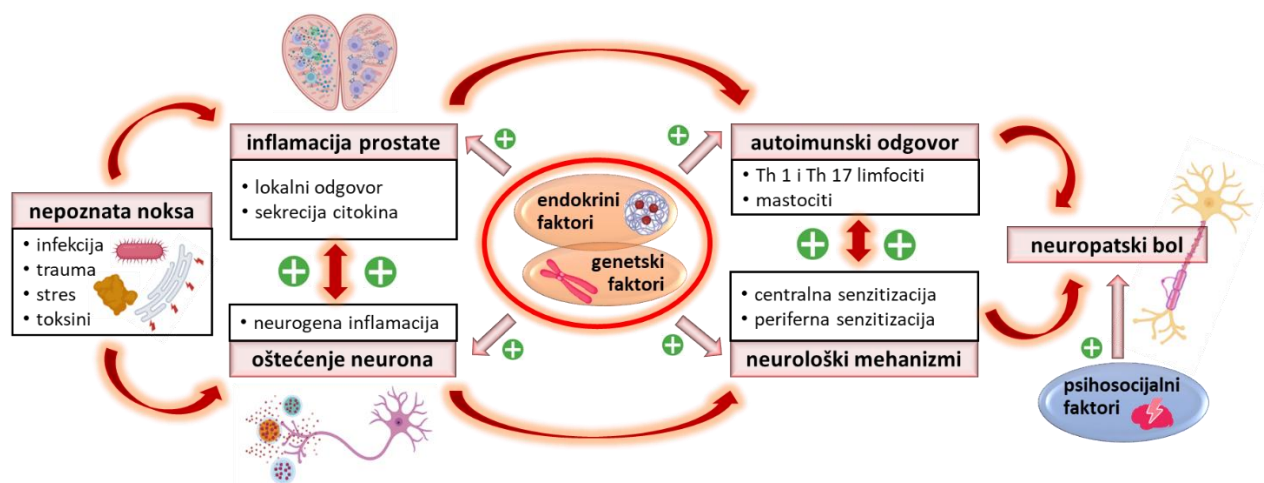
Endokrini faktori igraju značajnu ulogu u patogenezi CP/CPPS. Kod obolelih od ovog sindroma dolazi do neuroinflamatornih promena u CNS koje narušavaju HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) osovinu u smislu njene hiperaktivnosti ili smanjenog glukokortikoidnog odgovora (Anderson i sar. 2008). Kod obolelih od CP/CPPS postoji viši bazalni nivo kortizola i veći porast kortizola prilikom buđenja, u odnosu na zdrave osobe (Dimitrakov i sar. 2008b). Veruje se da je glavni faktor aktivacije HPA osovine upravo hronični stres kome su oboleli izloženi prvenstveno zbog bolnih senzacija, zatim zbog psihijatrijskih komorbiditeta koje razvijaju, ali i zbog narušenog stila i kvaliteta života (Anderson i sar. 2009). Usled povećanih koncentracija serumskog kortizola dolazi do disbalansa u celularnom i humoralnom imunskom odgovoru što pojačava proces inflamacije sa favorizacijom autoimunosti, a manifestuje se augmentacijom simptoma i razvojem komorbiditeta (Harpaz i sar. 2013). Sa druge strane, postoje studije koje su dale potpuno suprotne rezultate u smislu smanjenog nivoa adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i smanjene koncentracije serumskog kortizola kod obolelih od CP/CPPS, a kao glavni mehanizam se navodi smanjena aktivnost enzima CYP21A2 (P450c21), koji konvertovanjem progesterona stvara kortikosteron i kortizol (Dimitrakov i sar. 2008b). Disregulacija HPA osovine nema uticaj samo na inflamatorni odgovor, već se smatra i glavnim faktorom za razvoj anksioznosti, depresije, posttraumatskog stresnog poremećaja kod obolelih od ovog sindroma (Misiak i sar. 2020). Bitan faktor u razvoju prostatitisa jesu i polni hormoni, a postulat je da testosteron ima protektivni efekat, dok estrogen pospešuje razvoj inflamacije prostate (Pontari i Ruggieri 2004).

Poslednjih par decenija je obeležio razvoj metoda molekularne biologije, pa su identifikovani **genetski faktori** i predisponirajuće mutacije za razvoj velikog broja bolesti, a ujedno i CP/CPPS. U vezu sa ovim sindrom se najčešće dovode mutacije koje dovode do izmenjenog imunskog odgovora u smislu autoimunosti, neadekvatnog hormonskog odgovora i smanjenog antioksidativnog kapaciteta (Dimitrakov i sar. 2008b). Polimorfizam gena za sintezu IL-10 i TNF- α je ispitan kod obolelih od CP/CPPS, te se prisustvo alela koji dovode do snižene ekspresije antiinflamatornog IL-10 i povećane ekspresije TNF- α dovodi u vezu sa nastankom autoimunskog/inflamatornog okruženja koje predisponira razvoj prostatitisa (Shoskes i sar. 2002). Oko 40% pacijenata obolelih od CP/CPPS ima prateću autoimunsku bolest po tipu sistemskog lupusa, Sjogrenovog sindroma i alergijske astme, a kao potencijalni predisponirajući faktor se navodi mutacija u alelu za IL-4 (Sugaya i sar. 2002). Ispitivanje koje je analiziralo alele u regionu gena za enzim fosfoglicerat kinazu je pokazalo da kod obolelih od CP/CPPS postoje iste promene alela koje se nalaze i kod obolelih od ostalih uroloških bolesti kao što su karcinom prostate ili hipospadija (Riley i Krieger 2002b). Sem toga, pokazano je da su kod obolelih od CP/CPPS prisutne mutacije alela za citokin IFN- γ koje dovode do njegove povećane produkcije i time promocije Th1 limfocitima-posredovanog autoimunskog odgovora (Chen i sar. 2021). Analiza polimorfizma gena za β 2-adrenergički receptor je pokazala da

mutacije ovog gena dovode do nishodne regulacije receptora u detrusoru mokraćne bešike, što vodi ka disfunkcionalnom mokrenju (Nishijima i sar. 2006). Kod obolelih od CP/CPPS pokazana je i mutacija koja dovodi do snižene ekspresije SOD enzima i posledičnog smanjenja antioksidativnog kapaciteta (Arisan i sar. 2006). Mutacije androgenog receptora dovode do neosetljivosti tkiva prostate na testosteron i razvoja hronične inflamacije prostate, ali i erektilne disfunkcije ili muške neplodnosti (Riley i Krieger 2002b).

U skladu sa UPOINTS fenotipizacijom i razvojem brojnih komorbiditeta kod obolelih od ovog sindroma, učešće **psihosocijalnih faktora** poput katastrofizacije bola, stresa, individualnih karakteristika ličnosti i socijalnih aspekata u etiopatogenezi CP/CPPS se ne sme izostaviti (Riegel i sar. 2014). Nekoliko studija je proučavalo katastrofizaciju bola kod obolelih od ovog sindroma i pokazano je da se usled osećaja bespomoći i beznađa ona razvija kod 25% obolelih, kao i da u mnogome predisponira razvoj drugih komorbiditeta (Huang i sar. 2020). Pacijenti koji boluju od CP/CPPS imaju jaču percepciju stresa nego zdrave osobe, a to dovodi do začaranog kruga usled aktivacije HPA osovine (Ahn i sar. 2012). Usled postojanja hroničnog stresa, dolazi do razvoja psihijatrijskih komorbiditeta i jače percepcije bola na skalama samoprocene (Brünahl i sar. 2017). Kod obolelih čija je glavna crta ličnosti neuroticizam, percepcija bola je jača, a terapijski odgovor lošiji, dok potpuno suprotne efekte imaju crte ličnosti kao što su ekstrovertnost, saradljivost i savesnost (Koh i sar. 2014). Socijalni aspekti obolelih takođe utiču na razvoj simptoma, a ističu se slabija podrška ljudi iz okoline, veliki broj seksualnih partnera, nerazumevanje od strane seksualnog partnera i nezadovoljstvo seksualnim životom (Wang i sar. 2016). Mentalna oboljenja poput anksioznosti, depresije, posttraumatskog stresnog poremećaja, bolesti zavisnosti i somatizacionog poremećaja su češći u populaciji obolelih od CP/CPPS (Brünahl i sar. 2017) pa su antidepresivi i anksiolitici često uključeni u multimodalni tretman (Koh i sar. 2014). Kod 6% pacijenata zabeleženo je zlostavljanje u detinjstvu, te se smatra da se razvoj CP/CPPS može smatrati posttraumatskim stresnim poremećajem (Hu i sar. 2007). Pojačana konzumacija alkohola, kofeina i cigareta su takođe identifikovani kao faktori koji doprinose etiopatogenezi CP/CPPS (Herati i sar. 2013).

Dakle, etiopatogenetska osnova CP/CPPS je jako kompleksna i sačinjena od međusobno zavisnih faktora koji deluju aditivno ili sinergistički (Slika 1.1.4.3.).



Slika 1.1.4.3. Etiopatogenetski faktori CP/CPPS

Nepoznata noksa u tkivu prostate izaziva lokalnu inflamaciju prostate koja je praćena i neurogenom inflamacijom, a procesi su u međusobnom amplifikatornom odnosu. Usled endokrinih i genetskih faktora dolazi do razvoja autoimunskog odgovora koji je praćen centralnom i perifernom senzitivacijom. Kao krajnji rezultat se javlja hronični neuropatski bol koji je znatno pojačan psihosocijalnim faktorima. Prema: Cho i Min 2015.

1.1.5. Terapija i prognoza

Do sada još uvek nije pronađena kauzalna terapija za lečenje ovog sindroma, a većina poznatih terapijskih postupaka se odnosi na uklanjanje simptoma, ali ne i na izlečenje. S obzirom na heterogenost simptoma ovog sindroma i nedovoljno razjašnjene patogenetske mehanizme, monoterapija nikada ne dovodi do očekivanog učinka. U lečenju obolelih od CP/CPPS se koriste brojni lekovi i nefarmakološki postupci, a u literaturi se najčešće pominju: antibiotici, antiadrenergički α -blokatori, steroidni i nesteroidni antiinflamatorni lekovi, hormonska terapija, fitoterapija, neuromodulatorna, fizikalna i kognitivno-bihejvioralistička terapija (Magistro i sar. 2016).

Antibiotska terapija se nažalost i dalje često propisuje obolelima od CP/CPPS iako ne postoji izolovani mikrobiološki uzročnik, te korišćenje antibiotika u ovom slučaju predstavlja samo lošu praksu. Naime, nekoliko studija je pokazalo da primena tetraciklina i fluorohinolona nema terapijski učinak (Doiron i Nickel 2018). Primena α -adrenergičkih blokatora kao monoterapija ne dovodi do uklanjanja simptoma kod obolelih, ali u multimodalnom pristupu, kombinacija tamsulosina sa drugim medikamentima dovodi do poboljšanja kod obolelih sa predominacijom opstruktivnih uroloških smetnji (Chen i sar. 2011). Ideja o korišćenju antiinflamatornih agenasa potiče od nalaza inflamatornog supstrata kod obolelih od klase IIIA prostatitisa. Upotreba COX-2 inhibitora dovodi do kratkotrajnog poboljšanja, ali ubrzo nakon prestanka terapije dolazi do egzacerbacije bola (Zhao i sar. 2009). Upotreba prednizolona nije dala terapijske efekte (Bates i sar. 2007), dok je upotreba monoklonalnih antitela koja su antagonisti leukotrijena ili nervnog faktora rasta dala delimične efekte (Mykoniatis i sar. 2022). Upotreba hormonskih preparata poput finasterida (inhibitor 5α -reduktaze) ili antiestrogenskih lekova nije dala očekivane rezultate (Franco i sar. 2019). Istraživanja u oblasti primene fitoterapeutika u lečenju ovog sindroma su široko zastupljena u prethodnoj deceniji, te je dokazan povoljan efekat bioflavonoida kvercetina koji poseduje antioksidativne efekte, kao i cernitona koji je ekstrakt polena (Lee 2017). S obzirom da je bol dominantni simptom CP/CPPS, ispitivana je i efikasnost upotrebe antikonzulzivnog agenasa, pregabalina, te je pokazano da je efektivan u uklanjanju bola, ali su neurološka neželjena dejstva ograničavajući faktor njegove primene u populaciji ovih bolesnika (Aboumarzouk i Nelson 2012). Loš učinak medikamentozne monoterapije je doveo do uvođenja nefarmakoloških metoda u protokole lečenja ovih bolesnika. Određene procedure fizikalne terapije (miofascijalna relaksacija, transkutana stimulacija tibijalnog nerva, akupunktura i elektropunktura, perinealna ekstrakorporalna terapija šok talasima i sono-elektro-magnetna terapija) su dale povoljne efekte u otklanjanju simptoma, naročito u grupi obolelih kod kojih postoji muskuloskeletalna disfunkcija (Masterson i sar. 2017). Veliki procenat obolelih pokazuje postojanje psihosocijalnih smetnji i psihijatrijskih komorbiditeta, te je kod ovih pacijenata upotreba kognitivno-bihejvioralističke terapije učinkovita (Brünahl i sar. 2018).

Na osnovu prethodno navedenog zaključujemo da empirijska monoterapija ne dovodi do željenog učinka, da se kombinacijom farmakoloških i nefarmakoloških procedura postiže bolji učinak, a naročito uz što personalizovaniji pristup u lečenju. Sa tim u vezi, uvedeno je korišćenje UPOINTS sistema u odabiru najadekvatnijeg multimodalnog terapijskog pristupa (Slika 1.1.5.). Ovakav pristup daje veoma povoljne rezultate (Shoskes i sar. 2010).

CP/CPPS je hronični poremećaj u kome pojedinci ne pate samo od bola, već su prisutne dugoročne posledice i uticaj na njihov stil života. U poslednjoj deceniji, prognoza obolelih od CP/CPPS je blago poboljšana, naročito sa uvođenjem multimodalnog tretmana prema UPOINTS sistemu, a naročito zbog uvođenja nefarmakološke terapije (Bergman i Zeitlin 2007). Edukacija je esencijalna komponenta u poboljšanju prognoze i ne odnosi se samo na obolele pojedince, već i na njihove seksualne partnere i širu i užu porodicu (Zhang i sar. 2020a). Veliki uticaj na poboljšanje prognoze ima i promena stila života, s obzirom da su identifikovani određeni

faktori rizika koji doprinose egzacerbaciji simptoma (Gallo 2014), a među njima se ističu navike u vezi sa ishranom (alkohol, kofein, ljuta hrana, prekomerni unos hrane), u vezi seksualnog života (odlaganje ejakulacije, seksualna apstinencija, vrlo učestali seksualni odnosi, prekidanje snošaja), osnovnim životnim i radnim navikama (dugotrajno sedenje, uska odeća, sportske aktivnosti koje su traumatične za perineum).

U	<ul style="list-style-type: none"> • α-adrenergički blokatori • antimuskarinski agensi
P	<ul style="list-style-type: none"> • kognitivno-bihejvioralistička terapija • anksiolitici, antidepresivi
O	<ul style="list-style-type: none"> • kvercetin • ekstrakti polena
I	<ul style="list-style-type: none"> • antibiotici
N	<ul style="list-style-type: none"> • gabapentin, pregabalin, ticiklični antidepresivi • akupunktura
T	<ul style="list-style-type: none"> • fizikalna terapija • aerobni fizički trening
S	<ul style="list-style-type: none"> • inhibitori 5-fosfodiesteraze • intrakavernozne injekcije, topikalni preparati

Slika 1.1.5. UPOINTS sistem u multimodalnom lečenju CP/CPPS

Naime, odabir najbolje kombinacije lekova kod obolelih se zasniva na tome kojoj fenotipskoj grupi pripadaju, te se kod (U) fenotipa najčešće primenjuju α -adrenergički blokatori i antimuskarinski agensi, kod (P) fenotipa kognitivno-bihejvioralistička terapija, anksiolitici, antidepresivi i psihološko savetovanje, kod (O) fenotipa kvercetin i ekstrakti polena, kod (I) fenotipa antibiotici, kod (N) fenotipa gabapentin, pregabalin, ticiklični antidepresivi i akupunktura, kod (T) fenotipa fizikalna terapija i aerobni fizički trening, dok se kod (S) fenotipa primenjuju inhibitori 5-fosfodiesteraze, intrakavernozne injekcije, topikalni i intrauretralni preparati, kao i selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (eng. selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI). Prema: Magistro i sar. 2016.

1.1.6. Eksperimentalni modeli

Ne postoji jedan savršeni eksperimentalni model ovog sindroma. Veliki broj eksperimentalnih modela je razvijen upotrebom infektivnih, mehaničkih, hemijskih ili hormonskih agenasa, a sve u cilju urgentnih potreba da se rasvetle etiopatogenetski faktori koji leže u osnovi ovog sindroma. Različiti modeli omogućavaju ispitivanje uticaja genetskih faktora i faktora okruženja na podložnost ka razvoju CP/CPPS, a sve u nadi da se otkriju novi terapijski modaliteti (Wang i sar. 2018b). Svaki pojedinačni eksperimentalni model je specifičan na svoj način, ima prednosti i mane, a odabir određenog modela zavisi od cilja istraživanja i vrste simptomatologije koja je u fokusu istraživanja (Vykhovanets i sar. 2007). Pregled eksperimentalnih modela ovog sindroma prikazan je u Tabeli 2.

Dok je kod ljudi prostata jedinstvena anatomska struktura, kod glodara je ona podeljena u 4 para lobusa: ventralni, dorzalni, anteriorni i lateralni, no ove razlike ipak omogućavaju translaciju rezultata na humanu populaciju i svaki eksperimentalni model se karakteriše predominantnom lokalizacijom procesa (Oliveira i sar. 2016). Razni sojevi glodara su korišćeni za razvoj ovih modela i odabir soja životinja zavisi od svrhe istraživanja, a među najčešćima su: *Wistar albino*, *Lewis* i *Sprague Dawley* (S-D) pacovi, kao i *C57BL/6* i *Non-obese diabetic* (NOD) miševi.

Spontani modeli prostatitisa su zasnovani na činjenici da veliki broj sojeva glodara kada navrši određenu starost razvije inflamatorne promene u tkivu prostate za koje se smatra da imaju autoimunsku osnovu usled smanjenih mehanizama tolerancije na sopstvene antigene koji nastaju zbog starenja (Wang i sar. 2018b). Naime, dokazano je da umerena mononuklearna ćelijska infiltracija sastavljena uglavnom od CD4+ T limfocita postoji u intersticijumu lateralnih lobusa prostate kod 60-70% *Lewis* pacova starosti 12 nedelja, 16% S-D pacova starosti 22-24 nedelje, 27% *Wistar* pacova i 88% *Copenhagen* pacova starosti 20 nedelja (Keith i sar. 2001). Izlaganje *Kunming* miševa pasivnoj dugotrajnoj seksualnoj apstinenciji takođe dovodi do razvoja spontanog prostatitisa (Lv i sar. 2010). Pre više od dvadeset godina je otkriveno da su NOD miševi podložni razvoju autoimunskih poremećaja pankreasa, tireoidne, nadbubrežne i paratireoidne žlezde, a kasnije je otkriveno da ovi miševi sa navršениh 20 nedelja starosti počinju da razvijaju inflamatorne promene u prostati i da čak 70% ovih miševa starosti 40 nedelja ima celularnu i humoralnu inflamaciju prostate (Penna i sar. 2007).

Prednosti ovog modela su stabilnost i dugotrajno samoodržavanje, a u patohistološkom i simptomatskom smislu dobro oponiraju humanu bolest te su pogodni za izučavanje terapijskih pristupa. Mane su dugo vreme koje je neophodno da se model uspostavi, relativno visoki troškovi i niska reproducibilnost, te se zato nešto ređe upotrebljavaju (Jackson i sar. 2013).

Infektivni modeli prostatitisa se najčešće koriste kako bi se sproveda translaciona istraživanja u vezi sa NIH I i II klasom prostatitisa. Dok je akutni bakterijski prostatitis jasno definisana bolest u smislu etiologije, simptoma i lečenja, hronični bakterijski prostatitis ima još uvek nedovoljno rasvetljenu patogenezu u kojoj ne učestvuje samo infekcija već i udruženi, neidentifikovani faktori.

Jedan od infektivnih modela na S-D pacovima podrazumeva intraprostaticnu injekciju *E.coli* izolovane iz sekreta prostate obolelih ljudi, te dolazi do razvoja akutnog prostatitisa koji traje nekoliko dana, a razvoj hroničnog prostatitisa se zapaža u lateralnim lobusima u odsustvu pozitivnih bakterijskih kultura ako su pacovi prethodno kastrirani i deprivirani od androgena (Kim i sar. 2011a). U modelu verifikovanom od strane Nickela i sar. (1991) je pokazano da transuretralna inokulacija *E.coli* u prostatu putem katetera dovodi razvoja prostatitisa koji se u inicijalnoj fazi koja traje 14 dana karakteriše polimorfonuklearnom infiltracijom prostate uz prisustvo bakterija, dok se u hroničnoj fazi inflamacije karakteriše limfocitnom infiltracijom i fibrozom tkiva prostate u odsustvu bakterijskih patogena. Kasnija istraživanja prostatitisa izazvanog pomoću *E.coli* kod *Wistar* pacova su pokazala ulogu hormona u razvoju hroniciteta. Pacovi koji su tretirani estradiolom su pokazivali veću podložnost ka razvoju hroničnih inflamatornih promena prostate, dok je tretman finasteridom smanjio ovu predispoziciju (Seo i sar. 2003).

Prednost infektivnih modela je sličnost sa patofiziološkim sledom u humanoj populaciji u smislu akutne inflamacije koja vodi ka hroničnoj u slučaju dejstva predisponirajućih faktora, dok je glavna mana što čak 50% životinja tretiranih infektivnim agensom ne razvije prostatitis zbog spontanog klirensa bakterija ili pak smrti usled sistemske inflamacije i sepse (Vykhovanets i sar. 2007).

Postoji veliki broj modela **eksperimentalnog autoimunskog prostatitisa (EAP)**, ali do danas univerzalni metod za indukciju nije prihvaćen.

Prvi koji su započeli sa ovim modelima jesu Pacheco-Rupil i sar. koji su subkutanom injekcijom prečišćenog proteina gonada uz CFA kod *Wistar* pacova izazvali autoimunske zapaljenje prostate koje se razvija 21 dan nakon injekcije (Pacheco-Rupil i sar. 1984). Ovaj model je uz određene izmene ostao u upotrebi sve do danas. Međutim, glavna limitacija ovog modela je što ne postoji konsenzus oko broja i mesta subkutanih injekcija i što inflamatorni odgovor ne korelira uvek sa koncentracijom proteinskog purifikata. Pokazano je da u slučaju male koncentracije ne dolazi do razvoja inflamacije, dok prevelika koncentracija dovodi do smrti životinje (Liu i sar. 2022).

Drugi problem se odnosi na karakteristike same inflamacije. Pojedini autori navode da se u tkivu prostate izaziva samo humoralni imunski odgovor bez prisustva T ćelijskog odgovora koji je karakterističan za autoimunske inflamacije (Donadio i Depiante-Depaoli 1997). Noviji model iz ove grupe je uspostavljen subkutanom injekcijom homogenata prostate sa CFA i pokazano je da su patohistološke promene u prostati životinja slične onima koje se mogu naći kod obolelih humanih subjekata. Inflamatorni infiltrat se pojavljuje od 7., a maksimalan je 28. dana nakon injekcije i sačinjen je od mononukleara (T limfociti i makrofagi) koji su raspoređeni u intersticijumu uz prisustvo hemoragije i fibroze uz pojavu i mastocitne degranulacije (Zhou i sar. 2007). Upotreba steroid-vezujućeg proteina prostate (prostate steroid-binding protein, PSBP) za imunizaciju životinja u cilju indukcije prostatitisa je dala oprečne rezultate i nije široko prihvaćeni model bolesti s obzirom na to da kod *Lewis* pacova osim razvoja antitela na PSBP ne dolazi do razvoja inflamacije prostate, dok su *Wistar* pacovi pokazali celularnu i humoralnu inflamaciju prostate (Maccioni i sar. 1998).

Opisan je i model EAP kod C57BL/6 miševa koji se indukuje inokulisanjem miševa homogenatom prostate uz CFA i pertusis toksin, nakon čega nastaje mononuklearna ćelijska infiltracija prostate koja je dozno-zavisna (Jackson i sar. 2013). Na NOD soju miševa je razvijen EAP upotrebom subkutane injekcije homogenata akcesornih polnih žlezda uz CFA, a dodatno je pokazano da dolazi do celularnog, ali i do humoralnog odgovora u tkivu prostate 20 dana nakon injekcije (Penna i sar. 2006). Takođe, na istom soju miševa je razvijen i model pomoću subkutane imunizacije (1., 14. i 28. dan) T2 peptidom iz prostate uz CFA i Al(OH)₃, koji je pokazao da postoji T ćelijska i makrofagna infiltracija prostate uz povećanu produkciju TNF- α i IL- β koja je inače zapažena i kod ljudi (Tang i sar. 2019).

Prednosti ovih modela jesu to što na zadovoljavajući način oponašaju histopatološke promene koje se mogu sresti i kod ljudi sa CP/CPSP uz relativno sličan leukocitni infiltrat. Mana ovih modela je to što nije ustanovljen precizni antigen, niti njegova doza, koji se koristi za imunizaciju i to što je inflamatorni odgovor različit kod različitih animalnih vrsta, te je reproducibilnost ovih modela upitna. Takođe, brojni istraživači, zbog indukcije autoimunskog odgovora u organizmu, oklevaju da odaberu EAP modele, s obzirom da se kod ovih životinja usled tretmana mogu razviti i drugi autoimunski poremećaji (Vykhovanets i sar. 2007).

Dobro je poznato da su rast, razvoj, funkcija i razvoj bolesti prostate zavisni od polnih hormona, te je uspostavljen veliki broj **hormonskih modela prostatitisa**. Suprafiziološke doze testosterona kod životinja neće dovesti do daljeg rasta prostate, ali je poznato da hormonski disbalans polnih hormona u perinatalnom periodu može dovesti do veće predispozicije za preterani rast ove žlezde u odrasloj dobi (Naslund i sar. 1988). Obzirom na ovu činjenicu, razvijen je hormonski model prostatitisa kod *Wistar* pacova i to injekcijom 17 β -estradiola u neonatalnom periodu uz dvonedeljni tretman testosteronom počevši od 12. nedelje starosti (Prins i Korach 2008). Promene koje se javljaju u prostati se odnose na fibrozu i idem tkiva uz mononuklearnu i monocitnu infiltraciju. Ipak, s obzirom da se sličnim tretmanom kod S-D

pacova ne izaziva prostatitis, genetska osnova je uključena u sklonost ka nastanku prostatitisa (Seethalakshmi i sar. 1996). Slični rezultati su postignuti i nakon uzastopnog tridesetodnevno tretmana Lewis pacova injekcijama 17β -estradiola (Naslund i sar. 1988). Kod ovih modela je pokazano da je tretman dihidrotestosteronom doveo do rezolucije prostatitisa, dok je istovremena kastracija pacova ili ablacija androgena medikamentima dovela do izraženijih inflamatornih promena, te ove činjenice implikuju protektivnu ulogu testosterona u bolestima prostate (Wright i sar. 1999). Pokazano je da ovi modeli nemaju u osnovi autoimunski poremećaj i da je tretman estrogenom praćen hiperprolaktinemijom, ali mehanizam kojim prolaktin izaziva inflamaciju prostate kod životinja nije dokazan (Reiter i sar. 1999).

Prednosti ovih modela su što se prostatitis lako indukuje uz relativno lako dostupne supstance i niske troškove, a patološke promene u prostati su slične promenama u humanoj populaciji i promenama koje se sreću u modelima spontanog prostatitisa. Mana ovih modela je što se radi boljeg eksperimentalnog dizajna i konzistentnijih rezultata preporučuje istovremena kastracija koja zahteva operaciju životinja, aseptične uslove u laboratoriji i hirurške sposobnosti istraživača. Takođe, prepreku predstavlja to što hormonski disbalans androgena može uzrokovati istovremen poremećaje kako drugih hormona, a tako i drugih tkiva izvan prostate (Wang i sar. 2018b), te drugi sistemski efekti hormonskog disbalansa mogu izmeniti ili maskirati simptome koji su važni za evaluaciju sindroma hroničnog pelvičnog bola.

U literaturi je opisana upotreba nekoliko različitih supstanci koje se direktnom intraprostatičnom injekcijom u aseptičnim uslovima koriste u cilju indukcije **hemijskih modela prostatitisa**, a najčešće se pominju karagenin, glicerol, 2% agar, formaldehid, CFA, amidrapan i krotonovo ulje (Wang i sar. 2018b).

Svi navedeni modeli imaju sličan ishod sa 100% uspešnošću u indukciji prostatitisa, ali se model sa upotrebom λ -karagenina (polisaharid iz algi) koji je na S-D pacovima uveden od strane Radhakrishnan i Nallu (Radhakrishnan i Nallu 2009) posebno ističe među ovim modelima jer izaziva najmanje iritativno oštećenje tkiva, a inflamacija koja nastaje je najbližnja hroničnoj inflamaciji proste kod ljudi. Bol koji nastaje kod hemijskih animalnih modela prostatitisa se razvija kao neuropatski bol, a njegov intenzitet i lokalizacija su dobro ispitani u eksperimentalnim uslovima uz brojne testove za procenu bola na mehaničke i termalne stimuluse. Patohistološke promene koje nastaju u tkivu prostate se ogledaju u monocitnoj i limfocitnoj infiltraciji uz hiperplaziju vezivnog tkiva i hiperemiju i edem prostate. Određene forme karagenina koriste se i u prehrambenoj industriji. Sem toga, *in vivo* studije na laboratorijskim životinjama su dokazale da λ -karagenin ne poseduje potencijal da izazove patofiziološke promene udaljenih organskih sistema izvan mesta aplikacije, alteracije u hematopoezi ili da ugrozi sveobuhvatno zdravstveno stanje životinje (Weiner 2014).

S obzirom da se bol razvija u potpunosti unutar prvih 24-48h nakon intraprostatične injekcije i perzistira dugo, ovi modeli, a naročito model sa upotrebom karagenina, oponašaju karakteristike sindroma hroničnog pelvičnog bola sa akutnom i hroničnom bolnom komponentom. Mane ovih modela jesu što zahtevaju aseptične uslove za rad uz hirurške performanse istraživača i što pojedina hemijska sredstva u određenim slučajevima mogu izazvati ekstenzivna oštećenja tkiva prostate (Wang i sar. 2018b).

Osim navedenih modela, postoje i **ostali modeli prostatitisa** koji se izazivaju dejstvom specifičnog štetnog agensa. U literaturi je opisan model koji se izaziva transuretralnom intraprostatičnom instilacijom dinitrobenzensulfonske kiseline S-D pacovima (Lang i sar. 2000) ili lipopolisaharida C57Bl/6 miševima (dos Santos Gomes i sar. 2018), nakon čega nastaje inflamacija praćena porastom sinteze IL- 1β u tkivu prostate uz ekstenzivna oštećenja epitela prostate. Takođe postoji i model bolesti koji se izvodi desetodnevnom izlaganjem S-D pacova stresnim stimulusima (izgladnjavanje, niska temperatura, mali kavez), a rezultat je nastanak

inflamatornih histopatoloških promena prostate kod 10 nedelja starih životinja (Zhang i sar. 2020b). Pokazano je da u mehaničkom modelu koji se izaziva parcijalnom opstrukcijom uretre najlonom kod *Wistar* pacova starosti od 12 nedelja dolazi do razvoja inflamatornih promena u vidu limfocitne infiltracije i edema prostate, a posledica su intraprostatičnog refluksa urina i imunskog odgovora na hemijske materije urina (Takechi i sar. 1999).

Modeli sa promenom ishrane u smislu jedaneastonedeljne deprivacije od soje (Sharma i sar. 1992) ili ishrane bogata sojom (Kwon i sar. 2001) su dali nekongruentne rezultate, u smislu da se u oba slučaja razvija inflamacija prostate bez promena serumskih nivoa androgena uz promenljivu urinarnu ekskreciju fitoestrogena, te ovi modeli nisu zaživeli u širokoj upotrebi.

U našoj studiji smo se opredelili za hemijski model eksperimentalnog CP/CPPS na *Wistar albino* pacovima upotrebom intraprostatične injekcije λ -karagenina. Razlozi koji su nas opredelili za ovaj model se odnose na to da on pokazuje veliku pouzdanost jer 100% životinja razvija CP/CPPS, promene u inflamatornom smislu i histopatološkom pogledu oponašaju promene kod ljudi, λ -karagenin je neštetni polisaharid koji indukuje sterilnu inflamaciju i ne deluje iritativno na okolne strukture, ne izaziva ekstenzivna oštećenja tkiva prostate i ne poseduje toksični ili teratogeni potencijal (Necas i Bartosikova 2013). Upotrebom hemijskog modela se izaziva usko organ-specifično oboljenje, a izbegava se uticaj autoimunskog odgovora u telu, hormonskog disbalansa ili infekcije koji se mogu sresti kod ostalih modela.

Tabela 2. Pregled eksperimentalnih modela CP/CPPS

Model	Životinje	Način indukcije	Prednosti i mane
Spontani	Pacovi: Wistar, Lewis, Copenhagen, Sprague-Dawley Miševi: Kunming, NOD	<ul style="list-style-type: none"> Navršavanjem određene starosti razvija se spontana inflamacija u tkivu prostate. 	<ul style="list-style-type: none"> Stabilni i samo-održivi modeli koji dobro patohistološki oponiraju humanu bolest. Dugotrajno uspostavljanje modela, visoki su troškovi i niska reproducibilnost.
Infektivni	Pacovi: Wistar, Sprague-Dawley	<ul style="list-style-type: none"> Intraprostatična injekcija ili transuretralna inokulacija <i>E.coli</i> dovodi do akutnog bakterijskog, a potom i hroničnog prostatitisa. 	<ul style="list-style-type: none"> Sličnost sa patofiziološkim sledom kod ljudi: akutna inflamacija koja vodi ka hroničnoj. 50% životinja ne razvije prostatitis zbog klirensa bakterija ili smrti usled sepsa.
Autoimunski	Pacovi: Wistar, Lewis Miševi: C57BL/6, NOD	<ul style="list-style-type: none"> Injekcija prečišćenog proteina gonada/homogenata prostate ili akcesornih polnih žlezda/steroid-vezujućeg proteina uz CFA dovodi do autoimunskog odgovora u prostati. 	<ul style="list-style-type: none"> Oponašaju histopatološke promene koje se mogu sresti i kod ljudi. Nije ustanovljen precizni antigen, niti doza za imunizaciju, a inflamatorni odgovor se razlikje kod različitih vrsta, uz moguće i druge autoimunske poremećaje.
Hormonski	Pacovi: Wistar, Lewis	<ul style="list-style-type: none"> Tretman 17β-estradiolom sa ili bez dihidrotosterona uz ili bez propratne kastracije, dovodi do inflamacije prostate i hiperprolaktinemije. 	<ul style="list-style-type: none"> Indukovanje uz dostupne i jeftine agense. Poželjna istovremena kastracija životinja zahteva operaciju, aseptične uslove i hirurške sposobnosti istraživača, a disbalans androgena remeti druge hormone.
Hemijski	Pacovi: Wistar, Sprague-Dawley	<ul style="list-style-type: none"> Intraprostatičnom injekcijom karagenina, glicerina, 2% agra, formaldehida, CFA, amidrapana i krotonovog ulja se izaziva hronična inflamacija prostate. 	<ul style="list-style-type: none"> Bol je po tipu akutnog i hroničnog, a inflamatorni infiltrat odgovara humanom. Neophodni aseptični uslovi i hirurška obučenost istraživača, a pojedina hemijska sredstva izazivaju ekstenzivna oštećenja.
Ostali	Pacovi: Wistar, Sprague-Dawley,	<ul style="list-style-type: none"> Stres, mehanička opstrukcija uretre, promene ishrane ili transuretralna instilacija hemikalija dovode do hronične inflamacije prostate. 	<ul style="list-style-type: none"> Modeli nisu dobro definisani u pogledu karakteristika i trajanja inflamacije i bola. Aplikacija mehaničkih stimulusa ili izlaganje stresu dovodi i do promena izvan prostate.

CFA = complete Freund's adjuvant

1.2. Komorbiditeti sindroma hroničnog pelvičnog bola

U pokušaju da se razgraniči da li su simptomi CP/CPPS samo deo sistemske bolesti, veliki broj studija je proučavao psihosocijalne faktore i psihijatrijske komorbiditete obolelih koji višestruko pogoršavaju postojeće simptome. Pogoršanje osnovnih simptoma bolesti mehanizmom pozitivne povratne sprege može da izazove i psihijatrijske simptome (Passavanti i sar. 2017). Usled prisustva psihijatrijskih komorbiditeta, oboleli retko diskutuju o svojoj bolesti sa okolinom, drže je u tajnosti što na kraju dovodi do stigmatizacije obolelih i višestrukog pogoršanja kvaliteta života (Fu i sar. 2014). Kod obolelih od klase III prostatitisa se češće mogu dijagnostikovati druge bolesti za koje se smatra da u njihovoj osnovi leži disfunkcija nervnog sistema, a prema jednoj studiji čak više od 30% obolelih je imalo jedan ili više somatskih sindroma, među kojima su sindrom iritabilnog kolona, fibromijalgija i sindrom hroničnog umora (Liao i sar. 2016). Psihijatrijski komorbiditeti kod obolelih od CP/CPPS se najčešće odnose na anksioznost, depresiju, katastrofizaciju bola, posttraumatski stresni poremećaj i probleme sa kognitivnim procesima, a neretko se mogu sresti i promene ličnosti ili razvoj zavisnosti od lekova i drugih supstanci (Brünahl i sar. 2017). S obzirom da se jačina stresnog stimulusa interpretira individualno i da zavisi od lične percepcije, više nego od učestalosti stresnog stimulusa i njegove prirode, podložnost ka razvoju mentalnih poremećaja kod obolelih od CP/CPPS najviše zavisi od individualnih strategija za borbu protiv stresora i kognitivnog doživljaja same stresne situacije (Lazarus 1975). Dakle, razvoj strategije za borbu protiv stresnog stimulusa najviše zavisi od kognitivnih i bihevioralnih napora koje pojedinac ulaže kako bi održao homeostazu organizma u uslovima stresa (Smith i sar. 2016).

1.2.1. Anksioznost i testovi za njenu procenu u eksperimentalnim uslovima

Anksiozni poremećaj predstavlja najčešći tip psihijatrijskih poremećaja u svetskoj populaciji sa prevalencijom koja se tokom životnog veka kreće između 9,2% i 28,7% (Marques i sar. 2011). Nije retko da se anksioznost javlja udruženo sa ostalim mentalnim poremećajima, a pokazano je da razvoju anksioznosti predisponira postojanje neke bolesti koja je nedovoljno medicinski objašnjena (Marciniak i sar. 2005). Sindrom hroničnog pelvičnog bola predstavlja idealno područje za razvoj mentalnih poremećaja poput anksioznosti ili paničnog poremećaja (de la Rosette i sar. 1992). Jedna od studija navodi da oboleli od CP/CPPS imaju duplo veću šansu da iskuse simptome anksioznog poremećaja u odnosu na asimptomatske kontrole (Passavanti i sar. 2017). Novija studija je pak pokazala da oboleli od ovog sindroma imaju čak 62% veću šansu da obole od anksioznosti u odnosu na po godinama i edukaciji uparene kontrolne osobe, a kao glavni predisponirajući faktori se navode loša kontrola simptoma bolesti, nerazumevanje od strane seksualnog partnera, porodice i okoline i seksualna disfunkcija (Zhang i sar. 2011). Iako su brojne studije preseka pokazale visoku prevalenciju anksioznosti kod obolelih od CP/CPPS na osnovu skala samoprocene, postoji mali broj studija koji je pokušao da rasvetli tačan mehanizam nastanka ove povezanosti (Chung i Lin 2013, Brünahl i sar. 2017) i tačan oblik međuzavisnosti hroničnog bola i anksioznosti (Hu i sar. 2016). Osim studija koje su dokazale da se tokom života kod obolelih od ovog sindroma može razviti anksioznost, postoje istraživanja koja su pokazala da osobe koje boluju od anksioznosti imaju veću šansu da obole od CP/CPPS tokom svog životnog veka, te je ovo još jedan od faktora koji dovodi u fokus povezanost ovog sindroma sa anksioznošću (Clemens i sar. 2008a). Disfunkcija hipokampalne GABAergičke inhibitorne interneuronske mreže je dokazana u brojnim psihijatrijskim bolestima, uključujući i anksioznost, depresiju i posttraumatski stresni poremećaj (Pelkey i sar. 2017). Među ovim neuronima bitnu ulogu igraju parvalbumin-pozitivni (PV+) interneuroni koji su široko rasprostranjeni u hipokampusu i regulišu ekscitabilnost i brzinu protoka signala kroz ovu strukturu (Pelkey i sar. 2017). Istraživanja su pokazala da se broj PV+ interneurona smanjuje u stanjima hroničnog stresa i hroničnog bola

(Tajerian i sar. 2018), u humanim psihijatrijskim bolestima (Pelkey i sar. 2017) i tokom neuroinflamacije indukovane oksidativnim stresom (Steullet i sar. 2017).

Uspostavljanje dijagnoze anksioznosti kod ljudi se zasniva na analizama skala samoprocene koje pacijenti popunjavaju, na upitnicima i razgovoru sa pacijentom (Muhammad i Al-Ahmadi 2022). Objektivna analiza anksioznosti kod životinja predstavlja pravi izazov za istraživače, s obzirom da se anksioznost razvija udruženo kroz procese emocionalnog doživljaja stimulusa i jasno ispoljavanje znaka i simptoma kod ljudi, a da ovi procesi nisu svojstveni životinjama (Lezak i sar. 2017). Kako bi se izbegla pogrešna interpretacija rezultata testova koji imaju za cilj procenu anksioznosti kod životinja, termin anksioznost je zamenjen sintagmom „ponašanje povezano sa anksioznošću“. Upotreba objektivnih etoloških testova za procenu ponašanja povezanog sa anksioznošću je bazirana na činjenici da postoji slična manifestacija anksioznosti i straha kod životinja u smislu povećane budnosti i pažnje, „zamrzavanja“ u jednom mestu i prestanka kretanja, lokomotorne hipoaktivnosti i smanjene konzumacije hrane (Bailey i Crawley 2009). Opisano je da postoji razlika, ali i međuzavisnost regiona mozga koji su zaduženi za percepciju straha i kratkotrajni averzivni odgovor (amigdala) i odgovora koji se manifestuje ponašanjem povezanim sa anksioznošću (donje jedro strije terminalis) koji predstavlja dugotrajno stanje koje prati zabrinutost (Crestani i sar. 2013). Rezultat ove međuzavisnosti je aktivacija oba jedra koje daje sličnu promenu ponašanja kod životinja (Crane i sar. 2021)

Klasični testovi za ispitivanje ponašanja povezanog sa anksioznošću kod glodara se odnose na postavljanje životinje u situaciju gde treba da izabere između dve oprečne opcije i da se u tom konfliktu odluči za istraživanje nepoznatog (prirodna težnja glodara) ili za izbegavanje nepoznatog (Bailey i Crawley 2009). Paradigma ovih testova je da novi stimulus ili okolina mogu biti percipirani od strane životinje kao pretnja, što je u konfliktu sa prirodnom težnjom životinje da istražuje novi stimulus ili okolinu. Glodari imaju težnju da se sklone u tamni i zaklonjeni prostor što smanjuje rizik da budu napadnuti od strane predatora, a sa druge strane imaju težnju da istraže novi nezaklonjeni prostor u cilju pronalaska hrane.

Test svetlo/tama (sastavljen od svetlog i tamnog kompartmana koji su međusobno povezani) i test uzdignutog krstastog lavirinta (čini ga par otvorenih i par zatvorenih krakova koji se stiču u centralnom polju pod pravim uglom) su reprezentativni primeri za analizu konflikta između istraživanja i izbegavanja. Kao indikatori izraženijeg ponašanja povezanog sa anksioznošću, u ovim testovima se nailazi na sledeća zapažanja: duže vreme provedeno u tamnom kompartmanu testa svetlo/tama, smanjen broj tranzicija iz tamnog u svetli kompartman i snižena latenca ulaska u tamni iz svetlog kompartmana testa svetlo/tama, duže vreme provedeno u zatvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta, smanjena latenca ulaska u zatvoreni krak i smanjen broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova (Bailey i Crawley 2009). Sličan ovim testovima je i test socijalne interakcije koji meri latencu uspostavljanja kontakta životinje sa drugom životinjom, kao i vreme koje životinja provodi u blizini stimulusa-nove životinje (File i Hyde 1978). Test otvorenog polja pripada takođe ovoj grupi testova koji osim parametara ponašanja povezanog sa anksioznošću ispituje i lokomotornu aktivnost. Smanjenje lokomotorne aktivnosti, kako horizontalne (ukupno vreme ambulatornih pokreta i ukupna distanca), tako i vertikalne (propinjanje na zadnje ekstremitete), dobar je indikator ponašanja povezanog sa anksioznošću u čiji prilog postojanja ide smanjenje ovih parametara mernih u vremenu kada životinje pokazuju eksplorativnu aktivnost. Veliki udeo vremena tokom perioda eksplorativne aktivnosti proveden u perifernim zonama polja blizu zaklona uz duge periode imobilnosti znak je postojanja ponašanja povezanog sa anksioznošću (Seibenhener i Wooten 2015). Među ovom grupom testova se pominje i novinom-indukovana hipofagija u kome se kao indikator anksioznosti procenjuje dužina latentnog perioda koji je potreban da glodar u sredini gde se nalazi nova vrsta hrane počne da je istražuje ili konzumira (Deacon 2011). Takođe, u specifičnim situacijama se koriste

i testovi defanzivnog ponašanja kao indikatori anksioznosti, kada se životinja draži stresnim stimulusom i meri se jačina defanzivnog odgovora koja je proporcionalna stepenu ponašanja povezanog sa anksioznošću (Davis i sar. 1997).

1.2.2. Depresija i testovi za procenu depresije u eksperimentalnim uslovima

Depresija predstavlja drugo po učestalosti psihijatrijsko oboljenje, koje se manifestuje poremećajima raspoloženja sa dominantnim osećajem tuge i zabrinutosti, kao i gubitkom interesovanja za svakodnevne aktivnosti uz smanjeno samopouzdanje i samopoštovanje (Ormel i sar. 2019). Prema najnovijoj klasifikaciji, depresivni poremećaj se može klasifikovati kao depresivni poremećaj raspoloženja, veliki depresivni poremećaj, perzistentni depresivni poremećaj (distimija) ili sekundarni depresivni poremećaj zbog drugog medicinskog oboljenja ili stanja (Otte i sar. 2016). Studije koje su proučavale distribuciju mentalnih poremećaja kod obolelih od CP/CPPS prijavljuju da čak 78% obolelih oseća simptome i pokazuje znake depresije, a da 60% obolelih ispunjava kriterijume za klasifikaciju u okviru velikog depresivnog poremećaja (Egan i Krieger 1994). Među najbitnijim psihosocijalnim faktorima koji kod obolelih od ovog sindroma predisponiraju razvoj depresije se navode gubitak podrške okoline, nedostatak seksualnog partnera i prisustvo katastrofizacije bola (Tripp i sar. 2006). Smatra se da je u osnovi i kao najjači prediktor depresivnog poremećaja upravo katastrofizacija bola koja podrazumeva ispoljavanje specifičnih kognitivnih obrazaca u percepciji hroničnog bola u smislu da postoji fokusiranost na bol, njegova magnifikacija i osećaj bespomoći pri njegovoj anticipaciji (Quartana i sar. 2009). Sa druge strane, razvoj depresivnog poremećaja uz negativne emocionalne procese je veliki faktor rizika za nastanak „psihogenog“ bola, što je razlog za još jaču percepciju bola na skalama samoprocene kod obolelih (Brünahl i sar. 2017).

Brojne epidemiološke studije su za cilj imale da otkriju koji su to faktori rizika i prediktori za razvoj depresivnog poremećaja. Kohortna studija NIH je pokazala da je prisustvo simptoma depresije kod obolelih direktno proporcionalno ozbiljnosti osnovnih simptoma sindroma koje oboleli navode u upitnicima za procenu kvaliteta života (McNaughton Collins i sar. 2001). Jedna studija je identifikovala da je rizik za razvoj depresije proporcionalan izraženosti simptoma vezanih za disfunkcionalno mokrenje (Dybowski i sar. 2018), dok je druga studija razvoj depresije dovela u najsnažniju vezu sa jačinom percepcije bola (Tripp i sar. 2006). Postoji realna osnova da obe grupe simptoma utiču na razvoj depresije, bol prvenstveno kroz proces katastrofizacije bola, a disfunkcionalno mokrenje kroz izražen negativni uticaj na kvalitet života (Kwon i sar. 2001). Lečenje depresije kod obolelih od CP/CPPS predstavlja pravi izazov jer je usled multifaktorijalne prirode često rezistentna na primenjenu terapiju (Chung i sar. 2011).

Iako su brojne studije demonstrirale veliki rizik za razvoj depresije kod obolelih od CP/CPPS, mali je broj humanih i eksperimentalnih studija koje su pokušale da rasvetle ovu vezu, a o potencijalnim mehanizmima se često govori u kontekstu paradigme. Naime, smatra se da je razvoj depresije rezultat udruženog dejstva hroničnog bola i stresa, genetske predispozicije i hormonskog disbalansa uz neurološke procese remodelovanja koji nastaju kao posledica hronične inflamacije (Kwon i Chang 2013).

Postojanje dugotrajnog bola u sklopu bilo kog hroničnog oboljenja je praćeno osećajem bespomoći i nesposobnosti, što u slučaju smanjene podrške okoline, porodice ili partnera vodi ka narušenju mentalnog procesuiranja situacije u kojoj se oboleli nalazi (Garbi i sar. 2014). U slučaju neadekvatne strategije za racionalizaciju situacije u kojoj se oboleli nalazi, kroz pomenute procese katastrofizacije bola, zajedno uz tegobe koje se tiču mokrenja i seksualnu disfunkciju, konačno dolazi do razvoja depresivnog poremećaja (Tripp i sar. 2006). Postojanje hroničnog inflamatornog procesa samo po sebi može biti razlog za razvoj depresije. Naime, u humanim i eksperimentalnim studijama je pokazano da kod obolelih od CP/CPPS postoji

hronična periferna inflamacija u tkivu prostate uz često prisutan sistemski odgovor koji se ogleda u povišenoj koncentraciji proinflammatoryh citokina i prostaglandina u serumu (Jang i Schaeffer 2003). Sa druge strane, poznato je da hronična inflamacija i promena u citokinskom miljeu može biti etiopatogenetski faktor u razvoju depresije (Felger i Lotrich 2013). Takođe, pokazano je da morfološke promene različitih moždanih struktura (moždana kora, talamus, hipokampus, amigdala) mogu da nastanu kao posledica CP/CPPS (Sadler i Kolber 2016), te se u ovim delovima mogu identifikovati parametri inflamatornog odgovora i oksidativnog stresa (Shoskes i sar. 2021). Sa druge strane, poznato je da proinflammatory medijatori porekla iz udaljenih organa prolaze krvno-moždanu barijeru (KMB) (Hrncic i sar. 2018), zajedno sa strukturnim promenama unutar CNS mogu biti direktni uzrok za razvoj depresije (Catena-Dell'Osso i sar. 2011). Već je pomenuto da se kod obolelih od CP/CPPS često ustanovljuje disfunkcija HPA osovine sa dijametralno suprotnim posledicama u smislu povišenih ili sniženih koncentracija kortizola u serumu (Lutgendorf i sar. 2002). Sa druge strane, pokazano je da se hiperkorticizam povezuje sa rizikom od nastanka depresije i da se depresivni simptomi mogu kontrolisati medikamentima koji smanjuju hiperkorticizam (Pruessner i sar. 2003).

Dijagnostikovanje depresije kod ljudi se, kao i za ostale mentalne poremećaje, zasniva na simptomima i znacima. Na osnovu aspekta koji odaje pacijent, simptoma koje navodi i znakova koje ispoljava, a zajedno sa informacijama dobijenim kroz razgovor i psihološku evaluaciju upotrebom testova i skala samoprocene, dijagnoza depresije se kod humanih subjekata uspešno uspostavlja (Joiner i sar. 2005). U cilju evaluacije pacijenata koriste se razni instrumenti, a među najčešće pominjanim su: Bekova skala depresije (upitnik koji sadrži 21 samoprocenjujuće pitanje), skala depresije Centra za epidemiološke studije (upitnik koji sadrži 20 samoprocenjujućih pitanja), EQ-5D upitnik za procenu kvaliteta života, Hamiltonova skala za procenu depresije, itd. Osnov većine testova je samoprocena pacijenta i odgovor na pitanja koje se tiču njihovog kvaliteta života, emocija i problema (Smarr i Keefer 2011). Nakon inicijalnog postavljanja dijagnoze na osnovu ovih instrumenata, sledi detaljna psihološka evaluacija i definitivna potvrda bolesti uz dodatna ispitivanja ukoliko su potrebna.

Kao i za ostale tipove psihijatrijskih komorbiditeta kod ljudi, bio je pravi izazov naći instrumente i testove za procenu depresije kod životinja, te je translacija ovih istraživanja sa pacova na ljude i sa ljudi na pacove posebno osetljiva. Određeni simptomi i znaci kod ljudi se teško uočavaju ili ne postoje kod životinja, a dodatni problem je što većinu simptoma i znakova ljudi samostalno prijavljuju, dok to kod životinja nije moguće (Planchez i sar. 2019). Simptomi depresije kao što su manjak zadovoljstva i gubitak interesovanja, socijalna izolacija se mogu posmatrati kroz određene bihevioralne manifestacije kod životinja. Anhedonija ili manjak zadovoljstva se kod životinja reperkutuje kroz smanjeno interesovanje za hranu koja sadrži šećer, te je na osnovu toga dizajniran test smanjene preferencije saharoze (Liu i sar. 2018). Kao direktni znaci apatije i gubitka interesovanja, kod životinja se smatra postojanje smanjenog interesovanja za brigu o sebi koje se ispoljava kroz smanjeno doterivanje (eng. grooming) kada oni izgledaju zapušteno ili kroz tendenciju da grade skloništa (Bölükbas i sar. 2020). Sa druge strane, teže je naći pandan složenijim simptomima depresije kod ljudi, kao što je osećaj tuge koji se kod životinja delimično reperkutuje kroz socijalno povlačenje ili kroz spor hod (Levy i Dubois 2006). Postoje i simptomi bolesti ljudi koji se ne mogu proceniti kod životinja i koristiti kao krajnje tačke u dizajnu testa za procenu, a među njima su osećaj zabrinutosti, krivice, misli o smrti i suicidalne ideje. (Planchez i sar. 2019). Dakle, translacijom simptoma i znaka depresije kod ljudi na određene karakteristike ponašanja kod životinja je kreirana ideja o ponašanju povezanom sa depresijom (Hennessy i sar. 2017).

U želji da se objektivno proceni što više ključnih karakteristika ponašanja povezanog sa depresijom, razvijen je veliki broj testova. Najčešće korišćeni u eksperimentalnim studijama je test forsiranog plivanja (eng. forced swimming test, FST), koji je 1977. godine originalno uveo Porsolt sa saradnicima (Porsolt i sar. 1979). Test se zasniva na činjenici da pacov koji je izložen

bezizlaznoj situaciji koja je potencijalno i opasna (zatvoreni cilindar sa vodom) je prinuđen da pliva jer nema mogućnost da pobjegne. Tokom ovog testa se opisuju tri tipa ponašanja i računa se koji je udeo vremena proveden u svakom od njih tokom petominutnog testiranja. Ponašanje se opisuje kao aktivno plivanje sa hiperaktivnošću ekstremiteta i pokušajima da se izbegne voda, mirno plivanje sa ronjenjem do dna cilindra i flotiranje ili odsustvo pokreta uz postavljanje samo vrha njuške iznad površine vode kako respiracija ne bi bila narušena (Can i sar. 2012). Udeo vremena proveden u flotiranju je direktno proporcionalan stepenu izraženosti ponašanja koje je kod životinja povezano sa depresijom (Porsolt i sar. 1979). Flotiranje tokom ovog testa koje se opservira kao imobilnost životinje koja shvata da ne može da pobjegne se direktno povezuje sa osećajem beznađa i očaja kod ljudi (Yankelevitch-Yahav i sar. 2015). Takođe, veliki udeo vremena provedenog u flotiranju i imobilnosti se tumači i kao gubitak motivacije i zainteresovanosti da se izbegne opasnost, dok je aktivno plivanje direktno proporcionalno prisustvu aktivnih strategija za borbu protiv stresnog stimulusa (Bogdanova i sar. 2013). Dakle, ovaj test je baziran na proceni aspekata depresije koji se viđaju i kod ljudi, te se upotrebom ovog testa može postići visok stepen translacije zaključaka iz animalnih studija na humanu populaciju. Osim ovog testa, u literaturi se najčešće navodi i test suspenzije o repu koji se predominantno koristi u ispitivanjima na miševima. Test suspenzije, zasniva se na podizanju životinje za rep čime se izlaže stresnom stimulusu i postavlja u bezizlaznu situaciju dok se posmatra vreme koje provodi u aktivnoj borbi da izbegne ovu situaciju i vreme koje provodi u pasivnoj imobilnosti koje direktno korelira sa stepenom izraženosti ponašanja povezanog sa depresijom (Cryan i Mombereau 2004).

1.2.3. Kognicija i testovi za procenu kognitivnog ponašanja, učenja i pamćenja u eksperimentalnim uslovima

Većina kliničkih i epidemioloških studija komorbiditeta je kod obolelih od CP/CPPS ispitala 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. Takođe, mali broj skorašnjih eksperimentalnih studija je kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS dokazao postojanje kognitivnog deficita i pokušao da delimično identifikuje potencijalne patofiziološke mehanizme u njegovoj osnovi (Hu i sar. 2016, Du i sar. 2020). Pad kognitivnih funkcija je očekivan i dokazan u stanjima u kojima postoji hronični bol (Zhang i sar. 2021b). Dodatno, pad kognitivnih funkcija sa sobom nosi rizik za smanjenu komplijansu pacijenata u lečenju, smanjenu radnu sposobnost i narušenje interpersonalnih odnosa, što sve zajedno dosta pogoršava kvalitet života (Whitlock i sar. 2017). Najdetaljnije podatke o narušenju kognitivnih funkcija je navela studija Naliboff i sar. (2015) koja je pokazala da su kod obolelih od CP/CPPS narušene sledeće kognitivne funkcije: sposobnost vizuelne percepcije, verbalna memorija, vizualno-specijalna memorija, jezičke performanse, kao i pažnja i koncentracija.

U odnosu na humanu populaciju gde su kognitivne funkcije složenije, postoji nekoliko različitih testova kod životinja koji mogu testirati razne aspekte kognitivnih funkcija: kratkotrajnu radnu memoriju, srednjoročnu i dugoročnu memoriju, spacijalnu memoriju i učenje (Tanila 2018). Većina testova kod životinja se zasniva na ispitivanju njihove sposobnosti da upotrebom vizuelne i spacijalne orijentacije kreiraju dugoročnu memoriju na osnovu prvog iskustva sa određenim stimulusom, što bi se pri ponovnom izlaganju koristilo da bi se stimulus izbegao ukoliko je neprijatan ili da bi se do stimulusa lakše došlo ukoliko on izaziva zadovoljstvo kod životinje (Crystal 2012). Jedan od često upotrebljivanih testova za ispitivanje različitih aspekata kognicije kod pacova je modifikovani test uzdignutog krstastog lavirinta (Itoh i sar. 1990). Ovaj test se bazira na prirodnoj težnji pacova da nakon eksploracije nepoznatog i otvorenog prostora (otvoreni krak), svoje sklonište nađe u jednom od zatvorenih

krakova. S obzirom da se test radi u dva akta između kojih je razmak u trajanju od 24 časa, ovaj test procenjuje nekoliko aspekata kognicije. Prvog dana testiranja (pretest), kada se životinja postavlja na kraju otvorenog kraka, dopušta joj se da istražuje lavirint do momenta ulaska u zatvoreni krak i to vreme se beleži kao latentna transfera. Dakle, tokom pretesta ispituju su kognitivne funkcije koje se odnose na spacijalnu orijentaciju, radnu memoriju i mogućnost donošenja odluke. Nakon 24 časa se vrši ponovno testiranje na isti način (retencija), a zabeleženo vreme transfera u zatvoreni krak direktno pokazuje kakve su kognitivne mogućnosti po pitanju učenja i dugoročne memorije (Mutlu i sar. 2015). Dakle, upotreba ovog testa je pogodna jer daje podatke o nekoliko aspekata kognicije, ali i primarno o spacijalnoj orijentaciji i memoriji.

1.2.4. Hiperekscitabilnost CNS

Iako je veći broj kliničkih studija koje su bazirane na funkcionalnoj magnetnoj rezonanciji, pokazao da oboleli od CP/CPPS imaju izmenjenu neuronsku aktivnost u čak 39 regiona mozga, a predominantno u predelu levog i desnog cingulatnog korteksa, desne insule, levog postcentralnog i precentralnog girusa, povećana prevalencija epilepsije kod obolelih od ovog sindroma nije prijavljena (Zhao i sar. 2022). U literaturi je kroz procese epileptogeneze objašnjeno da razvoj hiperekscitabilnosti CNS podrazumeva da prethodno zdravi nervni sistem pređe u stanje povećane bioelektrične aktivnosti usled funkcionalnih i morfoloških promena (Hrncic i sar. 2018). Već je pomenuto da je jedan od osnovnih etiopatogenetskih faktora u razvoju epilepsije upravo neuronsko remodelovanje, koje kroz procese centralne i periferne senzitivacije, dovodi do povećane ekscitabilnosti neurona usled uspostavljanja patoloških interneuronskih sinapsi i reorganizacije neuronskih mreža (McNamara i sar. 2006). Posledica ovog procesa je predominacija ekscitatornih nad inhibitornim fenomenima unutar CNS (Stanojlović i sar. 2007).

Najznačajnije patofiziološke promene koje rezultiraju nastankom hiperekscitabilnosti su neurodegeneracija, narušena neurogeneza, neuroinflamacija, astrogliozna, aksonsko oštećenje, dendritska plastičnost, disfunkcija KMB, infiltracija nervnog tkiva perifernim inflamatornim ćelijama i molekularne ultrastrukturne promene neurona (Tzeng i sar. 2013). Smatra se da je neuroinflamacija, koja se ogleda kroz promenu ćelijskog mikrokruženja neurona, uključujući aktivaciju mikroglije, astrocita, oligodendrocita uz prodor perifernih inflamatornih ćelija kroz narušenu KMB, jedan od osnovnih mehanizama u nastanku hiperekscitabilnosti CNS (t Hart i den Dunnen 2013).

Neuroinflamacija, koja se dokazano javlja kod obolelih od CP/CPPS, sa posledičnom hiperekscitabilnošću CNS, može biti osnovni patofiziološki mehanizam, kako hroničnog neuropatskog bola, a tako i nastanka neuroloških i psihijatrijskih komorbiditeta obolelih od ovog sindroma (Lurie 2018).

Smatra se da je jedan od osnovnih mehanizama nastanka anksioznosti hiperekscitabilnost neurona koji su deo neuronskih krugova u kojima nastaje osećaj straha. Usled senzitivacije i hiperekscitabilnosti, oni progresivno postaju sve aktivniji što vodi ka promeni koja osećaj straha pretvara u anksioznost (Rosen i Schulkin 2022). Pokazano je da hiperekscitabilnost neurona hipokampusa i amigdale generiše patološki odgovor na stimulse koji se zbog preterano usmerene pažnje na stimulus i preterane reakcije na isti klinički manifestuje kao anksiozni poremećaj (Rosen i sar. 1996).

Prema hipotezi hiperekscitabilnosti višestrukih neuronskih mreža u psihijatrijskim poremećajima, psihijatrijski simptomi depresije se razvijaju kada se neuronska kola u mozgu previše lako ili predugo aktiviraju (Binder 2022), a ovu činjenicu dokazuju najnoviji dokazi o

efikasnosti GABAergičkih lekova u tretmanu depresije, koji su zamenili tradicionalni pristup po kome se depresija leči samo lekovima koji imaju stimulišući efekat (Duman 2014).

Hiperekscitabilnost neurona je prepoznata kao osnova hroničnog neuropatskog bola pre više decenija, a patološke adaptivne promene neuronskih kola u kičmenoj moždini, moždanom stablu, delovima limbičkog sistema, bazalnim ganglijama i cerebralnom korteksu u kojima se uočava patološka spontana i dugotrajna aktivnost i preterana razdražljivost neurona sa facilitirajućom transmisijom nociceptivnih signala jesu uzrok razvoja dugotrajnog bola u odsustvu primarnog etiološkog faktora koji je pokrenuo kaskadu hiperekscitabilnosti (Kang i sar. 2020). Hiperaktivnost neurona je takođe primećena i kod pacijenata sa kognitivnim poremećajima. Naime, ispitivanja koja su aktivnost neurona merila funkcionalnom magnetnom rezonancijom su pokazala da kod pacijenata sa kognitivnim deficitom u inicijalnoj fazi bolesti postoji hiperekscitabilnost i hiperaktivnost neurona u hipokampusu i parahipokampalnim regijama mozga koja dovodi do oštećenja mozga pre nastanka simptoma, a da se simptomi kognitivnog deficita razvijaju kasnije kada je funkcija tih neurona u potpunosti izgubljena (Dickerson i sar. 2005). Stoga je opravdano pretpostaviti da kod CP/CPPS dolazi do razvoja hiperekscitabilnosti. Ovaj fenomen nije dovoljno ispitan u savremenoj literaturi, a njegovo objašnjenje bi dalo potencijalne nove mehanizme kojima bi se objasnili komorbiditeti vezani za mentalno zdravlje i trasirao put novim terapijskim pristupima.

Narušavanje ravnoteže između ekscitacijske i inhibicijske neurotransmisije je osnova patoloških procesa koji dovode do nastanka epileptiformne moždane aktivnosti, ali u obzir treba uzeti i druge potencijalne mehanizme (Stanojlović i sar. 2009a). S obzirom na to, jedan od pogodnih načina za ispitivanje hiperekscitabilnosti CNS je upotreba animalnog modela epilepsije (Hrncić i sar. 2007). Opisan je veliki broj animalnih modela eksperimentalne epilepsije koji imaju primat kada je u pitanju ispitivanje mehanizama hiperekscitabilnosti u brojnim patofiziološkim stanjima, ali i u razvoju antikonvulzivne terapije, uz neprikosnovenu ulogu u rasvetljavanju mehanizama sinhronizacije neurona i ispitivanju prokonvulzivnog ili antikonvulzivnog efekta brojnih medijatora (Fisher i sar. 2005).

Epilepsija je jedno od najzastupljenijih hroničnih neuroloških entiteta od koje boluje više od 1% svetske populacije. Osnovni simptom ove bolesti su ponovljeni epileptični napadi kao rezultat ekscitacijsko/inhibicijskog disbalansa CNS, koji se ispoljavaju motornim fenomenima (konvulzijama), a praćeni su pojavom karakteristične patološke EEG aktivnosti neurona (Sander 2003). Sa druge strane, izolovani napadi, bez postojanja epilepsije, mogu nastati usled provokacije CNS različitim patološkim stanjima kao što su zapaljenje, povrede i neoplazme (Stephen i Brodie 2000), te je mnogo veći broj pacijenata koji tokom životnog veka iskuse izolovanu konvulziju koja je prolazni znak patološke sinhronizacije aktivnosti neurona u mozgu (Duncan i sar. 2006). Tranzitorna, iznenadna, paroksizmalna, hipersinhrona aktivnost moždanih neurona je glavni supstrat u nastanku konvulzivnog napada, koji se manifestuje brzim i ponavljajućim kontrakcijama i relaksacijama skeletnih mišića (Fisher i sar. 2005).

Zlatni standard u otkrivanju patološke bioelektrične aktivnosti mozga tokom epileptičkih napada, ali i tokom interiktalnog perioda između dva napada je EEG (Wang i sar. 2019). Pored brojnih prednosti, najbitnije mane ovog dijagnostičkog metoda su beleženje lokalnih postsinaptičkih potencijala koji su rezultat sumarne aktivnosti većeg broja piramidanih neurona moždane kore, a ne pojedinačnih, kao i neophodna neuronska aktivnost širih zona moždane kore da bi se detektovao signal (Useinović i sar. 2018). U cilju otklanjanja navedenih nedostataka, upotreba matematičkog metoda po tipu FFT koja konvertuje signal iz vremenskog u frekventni domen, kao izlazne varijable daje podatak o PSD i o spektralnoj snazi delta, teta, alfa i beta frekvencijskih domena, što pruža dodatne podatke koji se koriste u naprednoj analizi EEG. Takođe omogućava i korelaciju kliničkih fenomena napada sa epileptičnim EEG

pražnjenjima, a ujedno omogućava da se iktalni EEG fenomeni iz vremenskog transformišu u frekventni domen i karakterističan spektralni obrazac (Rampil 1984).

Lindan (γ -heksahlorcikloheksan) je organohlorni pesticid i skabacid čija je upotreba zabranjena u većini zemalja zbog potencijalnih neurotoksičnih i kardiotoksičnih efekata (Singal i Thami 2006). U manje razvijenim zemljama, lindan je i dalje u medicinskoj upotrebi, a lečenje skabijesa je glavno indikaciono područje njegove upotrebe (Wooltorton 2003). Epilepsija izazvana lindanom kod pacova je eksperimentalni model generalizovane epilepsije koji se može koristiti u cilju rasvetljavanja potencijalnih prokonvulzivnih i antikonvulzivnih efekata brojnih medijatora čija je ekspresija narušena u različitim patofiziološkim stanjima (Vučević i sar. 2008). Epileptiformna pražnjenja izazvana lindanom su definisana elektroencefalografski, a ispitane su i konvulzije, kao motorni fenomen.

Eksperimentalni model generalizovanih epileptičnih napada izazvanih lindanom koji se ispoljavaju konvulzijama i specifičnom EEG iktalnom aktivnošću je pogodan za FFT analizu. Najčešća tri tipa EEG iktalne aktivnosti u ovom modelu epileptičnih napada se definišu kao: 1) niz šiljaka visoke voltaže koji nastaju neposredno pre konvulzija, 2) bioelektrični talasi niske frekvencije i 3) desinhronizovana bioelektrična aktivnost neurona (Wang i sar. 2019). Kvantifikovanje ovih fenomena u smislu broja i trajanja EEG iktalnih perioda, kao i računanje incidencije, latence i gradusa konvulzivnih napada direktno korelira sa stepenom ekscitabilnosti CNS (Hrncić i sar. 2009). Na osnovu dosadašnjih rezultata, zaključeno je da je doza lindana od 4mg/kg subkonvulzivna i pogodna za ispitivanje potencijalno proepileptogenih medijatora (Vučević i sar. 2008).

1.3. Neuroinflamacija: CNS nije imunoprivilegovan

Termin neuroinflamacija podrazumeva skup inflamatornih promena u CNS koje mogu biti posledica mnogobrojnih faktora, a prevashodno se odnose na aktivaciju mikroglijalnih ćelija koje su rezidentne imunske ćelije CNS (Gendelman 2002), ali i astrocita, oligodendrocita, kao i imunskih ćelija koje su u CNS dospеле iz drugih područja (Campbell i sar. 2014). Krvno-moždana barijera koju sačinjavaju endotelne ćelije okružene astrocitima je značajan izolator koji omogućava da CNS bude delimično izolovan od inflamatornih ćelija u slučaju postojanja perifernog inflamatornog procesa (Das Sarma 2014).

Periferni inflamatorni proces izvan CNS putem prisustva proinflamatornih medijatora imunskih ćelija (granulociti i limfociti) dovodi do disrupcije KMB ili njene funkcionalne kompromitovanosti, te nakon migracije ovih medijatora u CNS dolazi do aktivacije rezidentnih (glijna ćelije), ali i do regrutovanja inflamatornih ćelija iz cirkulacije, te se pokreće posledična neuroinflamacija (t Hart i den Dunnen 2013).

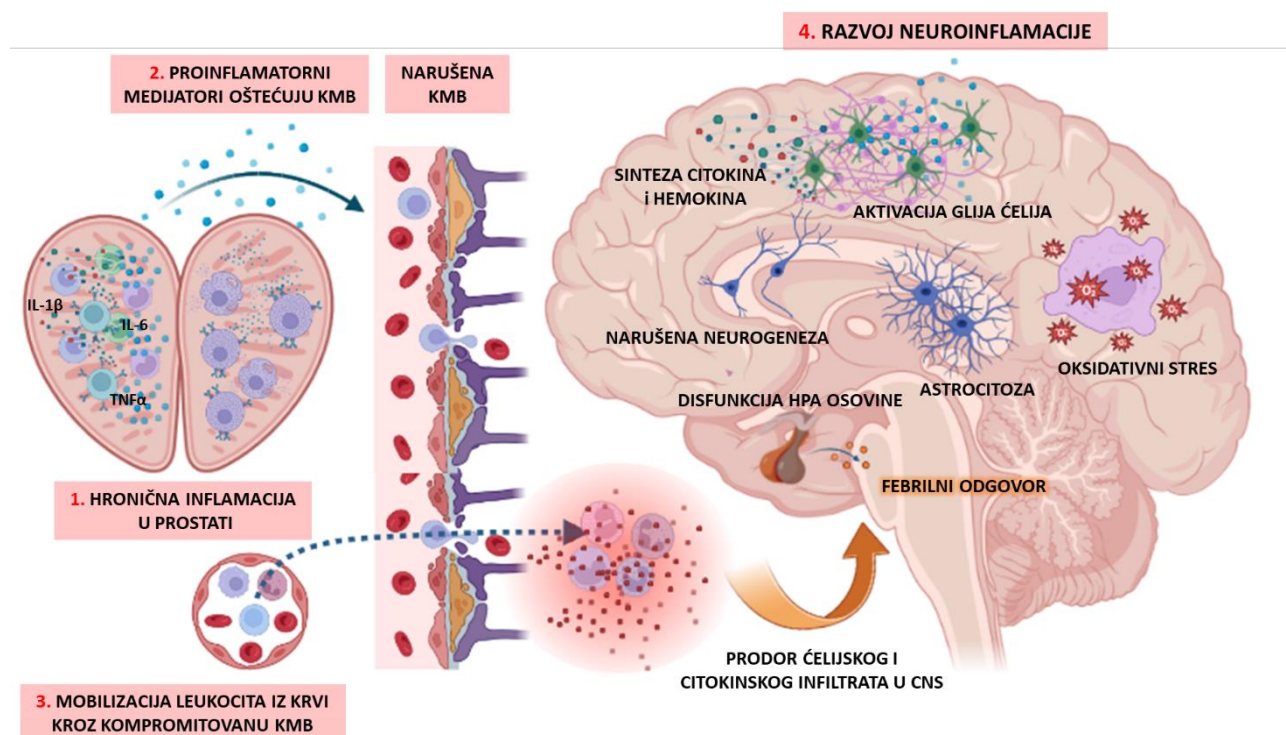
S obzirom da je hronična periferna inflamacija prostate u sklopu CP/CPPS praćena sintezom brojnih citokina u tkivu prostate, bilo je neophodno razmotriti na koji način se u sklopu ovog sindroma može desiti indukcija neuroinflamacije putem cirkulišućih imunskih medijatora. Disrupciju KMB pokreću cirkulišući citokini (IL-1 β , IL-6 i TNF- α) koji su u cirkulaciju dospeli iz izolovanog fokusa periferne inflamacije (Wardill i sar. 2016)). Mehanizam kojim cirkulišući citokini deluju na endotelne ćelije, pericite ili astrocite u sklopu KMB i dovode njenog kolapsa su mnogobrojni, a najčešće se govori o narušenju čvrstih veza (eng. tight junction, TJ) između endotelnih ćelija (Capaldo i Nusrat 2009).

Mehanizmi kojima se objašnjava disrupcija TJ putem citokina se odnose prvenstveno na to da citokini u endotelnim ćelijama indukuju sintezu enzima endotelne NO sintaze (eNOS) koji produkuje NO u preteranim količinama. Novosintetisani NO dovodi do nishodne regulacije brojnih proteina koji sačinjavaju TJ, te se dešava inicijalna migracija citokina u CNS (Peteccchia

i sar. 2012). Citokini, delujući na glija ćelije dovode do fagocitoze produžetaka astrocита u KMB od strane mikroglialnih ćelija što nastavlja kaskadni proces disrupcije KMB i ubrzava proces migracije toksičnih molekula, jona i imunskih ćelija iz cirkulacije u CNS (Takata i sar. 2021). Opisan je i prodor citokina u CNS, kroz fiziološki propustljiviju KMB u predelu cirkumventrikularnih organa, kroz proteinske transportere na endotelnim ćelijama ili paracelularno (Fabis i sar. 2008).

Nakon prodora u CNS citokini dovode do pokretanja kaskadnih reakcija neuroinflamacije sa neurotoksičnim procesima poput sinteze proinflamatornih citokina od strane rezidentnih ćelija CNS, generisanja visoke koncentracije reaktivnih kiseoničnih radikala i aktivacije reparacionih procesa (Campbell i sar. 2014). Dakle, neuroinflamatorni proces (Slika 1.3.) je posledica udruženog dejstva brojnih patogenetskih mehanizama, među kojima se ističu: aktivacija glija ćelija, sinteza proinflamatornih medijatora u CNS (citokini, hemokini), vaskularna disfunkcija KMB, oksidativni stres, region-specifična narušena neurogeneza i izražena asrocitoza, kao i disfunkcija HPA i ostalih endokrinih osovina (Hrncic i sar. 2018).

Neuroinflamacija je prepoznata kao jedan od vodećih patogenetskih supstrata u brojnim poremećajima i oboljenjima CNS, među kojima su: epilepsija, Alchajmerova bolest, multipla skleroza, anksioznost, depresija, shizofrenija, demencije, povrede CNS i dr. (Graeber i sar. 2011). Ne postoje kliničke, dok je broj pretkliničkih studija koje ispituju uticaj neuroinflamacije na razvoj simptoma i komorbiditeta CP/CPPS mali. Stoga, postoji realna osnova za ispitivanjem elemenata neuroinflamacije u eksperimentalnom modelu CP/CPPS.



Slika 1.3. Razvoj neuroinflamacije kao posledice periferne inflamacije

Hronični inflamatorni proces u prostati dovodi do citokinima-posredovane disrupcije KMB. Kroz oštećenu KMB migriraju leukocita iz krvi i citokini iz prostate u CNS, što dovodi do febrilnog odgovora. U CNS se razvija neuroinflamacija koja podrazumeva međuzavisnost nekoliko procesa: aktivacija glija ćelija, sinteza rezidentnih citokina i hemokina, oksidativni stres u tkivu mozga, narušenje neurogeneze i stimulacija astrocitoze i disfunkcija HPA osovine. KMB = krvno-moždana barijera, HPA =hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis. Prema: Sun i sar. 2022.

U cilju razumevanja uloge neuroinflamacije kao medijatora dešavanja na periferiji (prostatitisa i aktivacije nociceptora i periferne neuropatije) sa manifestacijama vezanim za aktivnost i promene u mozgu, bilo strukturne, bilo funkcionalne, potrebno je ispitati određene aspekte aktivacije mikroglijalnih ćelija, ulogu citokina i narušene krvno moždane barijere, te ulogu disregulacije HPA osovine i ulogu oksidativnog stresa.

1.3.1. Aktivacija mikroglijalnih i astroglialnih ćelija

Glija ćelije predstavljaju ne-neuronsku populaciju ćelija koje su u odnosu na neurone zastupljene u visokom procentu širom CNS, tako da taj odnos u cerebralnom korteksu dostiže čak 3:1 (Azevedo i sar. 2009). Najveći procenat glija ćelija čine oligodendrociti (oko 75%) zatim astrociti (oko 17%), dok je subpopulacija mikroglijalnih ćelija zastupljena sa oko 6,5% (Pelvig i sar. 2008).

Mikroglijalne ćelije su rezidentni makrofagi unutar CNS i imaju kritičnu ulogu u odbrambenim i reparacionim procesima. Prvi znak neuroinflamacije je aktivacija mikroglijalnih ćelija koja se obično dešava u prisustvu patogena, tkivnog oštećenja različitog porekla, prekomerne stimulacije, infekcije ili povrede (Carson i sar. 2006). Aktivacija mikroglijalnih ćelija podrazumeva promenu oblika, proliferaciju, migraciju, prezentaciju antigena limfocitima i sekreciju brojnih citokina (predominantno IL-1 β i TNF- α), reaktivnih oblika kiseonika, uz povećanu aktivnost enzima COX-1 i COX-2 (Park i sar. 2011). Takođe, dolazi do aktivacije signalnog puta posredovanog transkripcionim faktorom nuklearni faktor kapa-B (NF- κ B) koji je važan regulator apoptoze, preživljavanja ćelija i imunskog odgovora (Diamant i Dikstein 2013). NF- κ B u astrocitima dovodi do povećane sinteze enzima inducibilne NO sintaze (iNOS), što dovodi do povišenih koncentracija NO i progresije inflamacije (Linnerbauer i sar. 2020).

Eksperimentalno je dokazano da u prisustvu perifernog inflamatornog procesa dolazi do povećane ekspresije Iba1 (marker mikroglijalne aktivacije) u CNS (Hoogland i sar. 2015). Istraživanja na animalnom modelu CP/CPPS su pokazala da se kao patološki supstrat u CNS može konstatovati aktivacija mikroglijalnih ćelija sa posledičnim patološkim interakcijama sa okolnim neuronima, predominantno u hipokampusu (Du i sar. 2020).

Pored homeostatskih funkcija, kao odgovor na određeni inflamatorni stimulus, astrociti ispoljavaju genetske, morfološke i funkcionalne promene u procesu reaktivne astrocitoze (Kim i sar. 2019). Astrocitoza je najčešće indukovana povredom, zapaljenjem i stresom, a karakteristična je po tome što samu sebe pojačava, bez obzira na patološki faktor koji ju je inicijalno indukovao (Zhang i sar. 2010). Nakon genomske analize astrocita i analize molekularnih medijatora koje sintetišu, izvršena je podela astrocita na inflamatorne i neuroprotektivne astrocite. Inflamatorni astrociti su u fokusu istraživanja koja se bave neurodegenerativnim i neuroinflamatornim oboljenjima CNS jer odgovoru na citokine (IL-1 β i TNF- α) i faktore komplementa, dolazi do gubitka njihove fiziološke uloge u promociji neurogeneze i sinaptogeneze, preterane aktivacije i nastanka reaktivne astrocitoze i astroglioze (Zhang i sar. 2010).

Eksperimentalne studije su pokazale da u prisustvu perifernog inflamatornog procesa u CNS dolazi do povećane ekspresije glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (eng. glial fibrillary acidic protein, GFAP). GFAP se smatra markerom aktivacije astrocita (Yang i Wang 2015), te se merenjem ekspresije ovog markera može zaključiti o stepenu astrocitne aktivacije i astrocitoze. Istraživanja na animalnom modelu CP/CPPS su pokazala da se kao jedan od vidova patoloških promena u CNS javlja patološka aktivacija astrocita, predominantno u hipokampusu (Du i sar.

2020), međutim, oskudan je broj studija koje su pokušale da rasvetle vezu između promene aktivnosti astrocita i simptoma i komorbiditeta CP/CPPS.

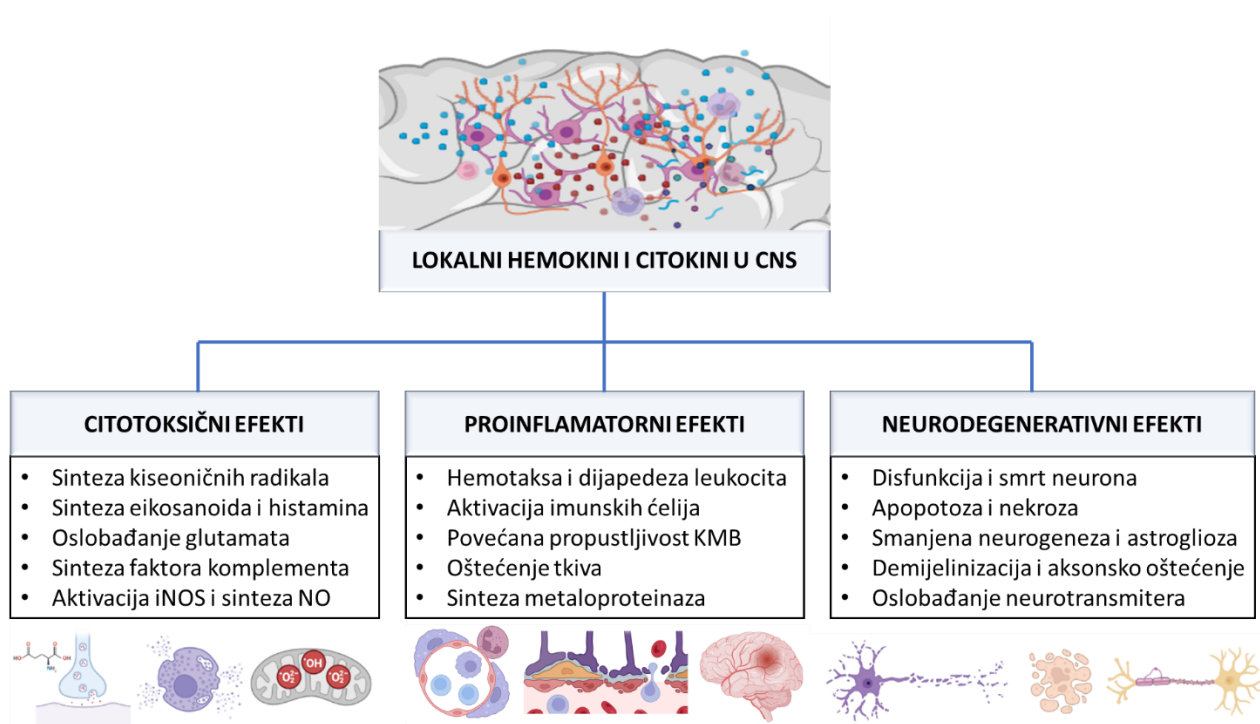
1.3.2. Uloga citokina i hemokina u neuroinflamaciji

Citokini i hemokini su mali signalni proteini koji u nanomolarnim koncentracijama vrše regulaciju imunskog sistema. Glavna uloga citokina koji mogu ispoljavati proinflamatorni ili antiinflamatorni efekat je regulacija rasta, preživljavanja i diferencijacije ćelija imunskog sistema. Hemokini mogu biti homeostatski ili inflamatorni i imaju ulogu u hemoatrakciji ćelija imunskog sistema u područje inflamacije (Borish i Steinke 2003).

Kao rezultat vezivanja citokina ili hemokina za svoj receptor, dolazi do aktivacije signalnog puta i modifikacije ćelijskih procesa kao što su adhezija ćelija, fagocitoza, sekrecija proinflamatornih medijatora, aktivacija i proliferacija ćelija, ćelijsko preživljavanje ili smrt, apoptoza i angiogeneza (Ramesh i sar. 2013). U kontekstu neuroimunologije, CNS se smatra imunoprivilegovanim područjem sve dok postoji integritet KMB. Pokazano je da kompromitovanost KMB postoji u brojnim neuropatološkim procesima koji uključuju sintezu citokina i hemokina. Medijatori sintetisani od strane leukocita koji su u CNS regrutovani, mikroglijalnih ćelija, astrocita, oligodendrocita, endotelnih ćelija, Švanovih ćelija, pa čak i neurona mogu narušiti integritet KMB (Hrncic i sar. 2018). U patološkim stanjima narušenog balansa između proinflamatornih i antiinflamatornih medijatora u CNS, postoji povišena produkcija citokina, hemokina, reaktivnih kiseoničnih radikala i povećana sekrecija neurotransmitera (Ramesh i sar. 2013). U fiziološkim uslovima, uloga citokina sintetisanih od strane ćelija CNS je diferencijacija glija i inflamatornih ćelija u cilju indukcije reparacionog odgovora i uklanjanja patološkog procesa (Borish i Steinke 2003). Međutim, kada je ovaj proces prolongiran ili izmakne kontroli, on postaje nesvrshodan, pa dolazi do hiperprodukcije proinflamatornih medijatora koji regrutuju nove ćelije u inicijalno područje neurodegeneracije i neuroinflamacije (Le Thuc i sar. 2015). Ovaj proces je praćen i posledičnom astrogliozom, mikrogliozom i remodelovanjem vaskularnih struktura. Usled oslobađanja velike količine trofičnih faktora i hemokina, nastaje začarani krug, te se regrutuju nove ćelije i nastaje stanje prolongirane neuroinflamacije i konkomitantne progresivne neurodegeneracije koji se pojačavaju po principu pozitivne povratne sprege (Kempuraj i sar. 2017). Krajnji ishod ovog procesa je patološka funkcija ćelija CNS uz ćelijsku smrt i gubitak funkcije, što je u literaturi navedeno kao osnov brojnih neuropatoloških procesa (Sandhir i sar. 2004).

U neuroinflamatornom supstratu se najčešće konstatuje povišena sinteza IL-6, IL-1 β , IFN- γ i TNF- α (Ramesh i sar. 2013). Razumevanje uloge IL-6 je ponekad teško zbog njegove dualne uloge. Naime, ukoliko je eksprimiran od strane astrocita u sklopu reaktivne astrocitoze, on promovise preživljavanje ćelija, dok eksprimiran od strane mikroglije dovodi do neuropatoloških efekata (Erta i sar. 2012). Poznato je da IL-1 β i TNF- α indukuju neurotoksičnost putem ekscitativnog oslobađanja glutamata, te se javlja ekscitotoksična ćelijska smrt. Poznati su i drugi neurodegenerativni efekti IL-1 β i TNF- α , kao što su vazogeni edem nervnog tkiva, smrt oligodendrocita kalcijum-posredovanim signalnim putem, patološka astrogliozna (Shaftel i sar. 2008).

Osim orkestriranja neuroinflamacije, hemokini imaju ulogu i u migraciji neurona, njihovoj proliferaciji u procesu adultne neurogeneze, a takođe i u maturaciji sinapsi. U slučaju njihove preterane ekspresije, osim indirektnog oštećenja ćelija unutar CNS putem regrutovanja inflamatornih ćelija, ovi medijatori vezivanjem za receptore na glija ćelijama i neuronima mogu i direktno narušiti njihovu funkciju (Cartier i sar. 2005).



Slika 1.3.2. Uloga lokalnih citokina i hemokina u neuroinflamaciji: citotoksični, proinflamatorni i neurodegenerativni efekti

Prema: Ramesh i sar. 2013.

Poznato je da su citokini i hemokini uključeni u patogenezu brojnih bolesti CNS kao što su epilepsija, Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, multipla skleroza, anksioznost, depresija i ostale psihijatrijske bolesti, ali su uključeni i u reakciju CNS na stres, bol, traumau, infekciju i vaskularne insulte (Stephenson i sar. 2018). Kliničke studije zbog limitirane metodologije po pitanju humanih subjekata nisu ispitivale ulogu ovih medijatora u patogenezi komorbiditeta CP/CPPS. U samo jednoj studiji je analizirana ekspresija citokina i hemokina u CNS kod pacova sa eksperimentalnim CP/CPPS (Hu i sar. 2016), ali tačni etiopatogenetski mehanizmi uticaja ovih medijatora na simptome i komorbiditete CP/CPPS nisu dovoljno ispitani.

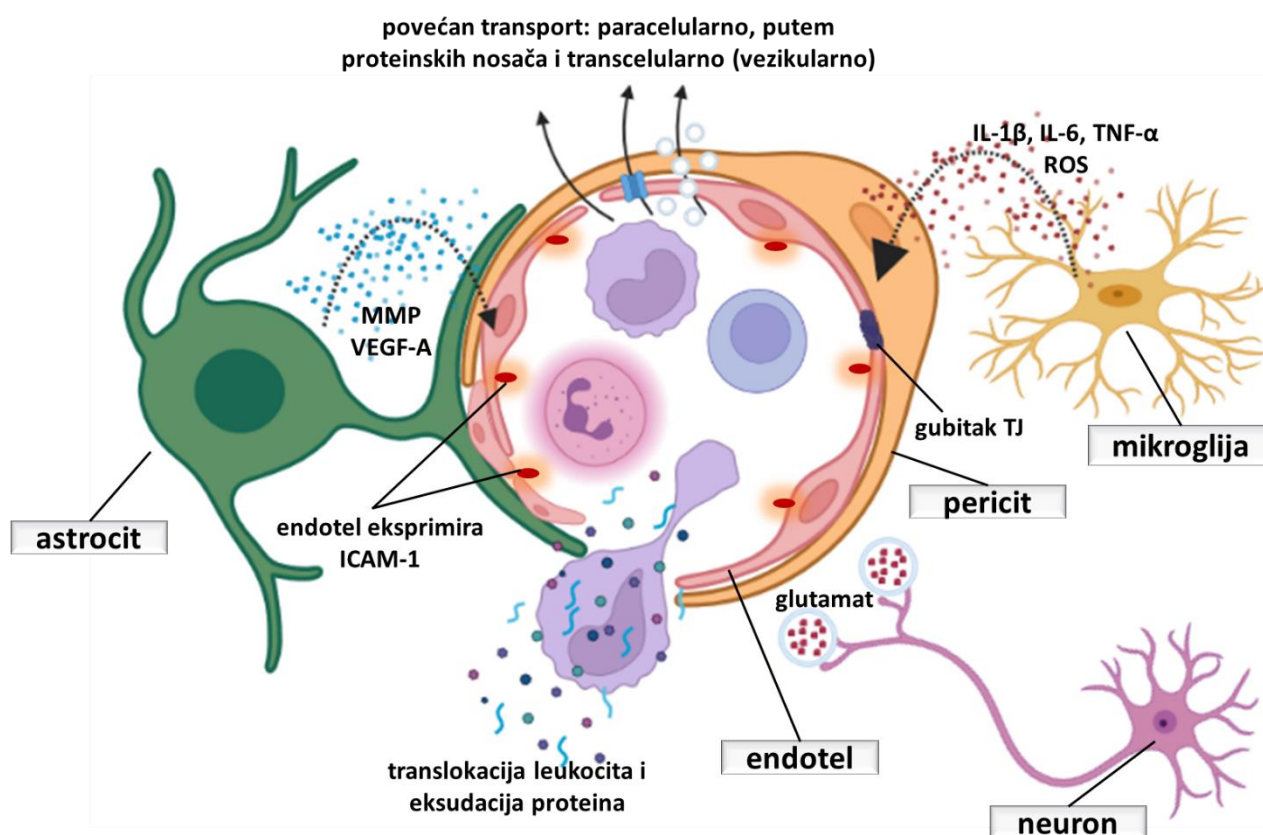
1.3.3. Krvno-moždana barijera u neuroinflamaciji: uloga ICAM-1

Krvno-moždana barijera je integralni deo CNS i formira visoko-selektivno propustljivu barijeru između krvi i ekstracelularne tečnosti CNS. Sačinjena je od endotelih ćelija, pericita, stopalastih produžetaka astrocita, a na njenu funkciju uticaj vrše i okolne mikroglialne ćelije i neuroni (Ballabh i sar. 2004). U fiziološkim uslovima ima primarnu ulogu da izoluje tkivo CNS od ostatka tela i kreira mikrookolinu za stabilnu funkciju neurona i sinapsi, dok je narušenje njenog integriteta povezano sa brojnim patološkim stanjima u CNS (Persidsky i sar. 2006).

Narušenje integriteta KMB i gubitak svih njenih funkcija se može opisati kao disruptivno i nedisruptivno oštećenje KMB u zavisnosti od prisustva ili odsustva fizičkih promena u strukturama KMB. Disruptivno oštećenje KMB se manifestuje vidljivim oštećenjem koje se konstatuje histološkim pregledom (Varatharaj i Galea 2017). Nedisruptivno oštećenje KMB se ogleda u odsustvu morfoloških promena, ali sa prisustvom alteracija u funkciji ćelija koje sačinjavaju KMB, a najčešće su: poremećena funkcija astrocita, sinteza citokina od strane endotelih ćelija, ushodna regulacija transportera i receptora na endotelnim ćelijama i

promocija invazije neuropatogena u CNS (Obermeier i sar. 2013). Poznato da molekularni medijatori porekla aktiviranih glija ćelija indukuju disrupciju KMB, koja potom omogućava prelazak induktora neuroinflamacije iz krvi i time višestruko amplifikuje već postojeći neuroinflamatorni proces (Takata i sar. 2021).

Medijatori porekla mikroglije, kao što su citokini (IL-1 β , IL-6, TNF- α) i kiseonični slobodni radikali, zajedno sa glutamatom oslobođenim od strane neurona u blizini KMB, kao i matriks metaloproteinazom (MMP) i vaskularnim faktorom rasta A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A) porekla astrocita, dovode do narušavanja integriteta KMB (Slika 1.3.3.) (Sun i sar. 2022). Promene na endotelnim ćelijama se ogledaju kroz povišenu ekspresiju transmembranskog proteina ICAM-1 (eng. Intercellular Adhesion Molecule 1), smanjenu ekspresiju kladina i okcludina uz gubitak TJ i pojavu transcelularnog i paracelularnog transporta kroz endotel koji dovodi do transmigracije leukocita i eksudacije proteina u tkivo mozga (Takata i sar. 2021).



Slika 1.3.3. Narušen integritet krvno-moždane barijere

U procesu neuroinflamatornog odgovora dolazi do patološke funkcije svih ćelija koje sačinjavaju KMB. Aktivirani astrociti luče MMP i VEGF-A, mikroglijalne ćelije sintetišu citokine i ROS, dok neuroni oslobađaju glutamat. Odgovor endotelnih ćelija se sastoji u povećanoj ekspresiji ICAM-1, gubitku TJ i promenama u transportnim procesima, te je posledica disfunkcije KMB translokacija leukocita i eksudacija proteina u tkivo mozga, kao i različitih medijatora iz krvi koji se kroz endotel transportuju paracelularno, putem proteinskih nosača ili transcelularno (vezikularno). KMB = krvno-moždana barijera, TJ = tesne veze (eng. tight junctions), ROS = kiseonični slobodni radikali (eng. reactive oxygen species), IL-1 β = interleukin 1-beta, IL-6 = interleukin 6, TNF- α = faktor nekroze tumora alfa, MMP = matriks metaloproteinaze, VEGF-A = vaskularni endotelni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor A), ICAM-1 = intercelularni adhezioni molekul (eng. ICAM-1 (eng. intercellular adhesion molecule 1). Prema: Takata i sar. 2021.

Ekspresija ICAM-1 u cerebralnim krvnim sudovima, na luminalnoj strani endotela, u fiziološkim uslovima je niska, ali se drastično povećava u prisustvu proinflammatoryh medijatora TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IFN- γ (Wertheimer i sar. 1992). ICAM-1 ima ključnu ulogu u ćelijskoj adheziji koja je posredovana imunskim sistemom, a dokazana je jaka korelacija između ekspresije ICAM-1 i permeabilnosti KMB. Smatra se da ICAM-1 ima ulogu i u gubitku TJ i reorganizaciji citoskeleta endotelnih ćelija, te se povećana ekspresija ICAM-1 smatra primarnim događajem u slomu integriteta KMB (Bui i sar. 2020).

Iako je narušen integritet KMB prepoznat kao patološki supstrat brojnih neurodegenerativnih i neuroinflammatoryh oboljenja (Takata i sar. 2021), njegova uloga u etiopatogenezi komorbiditeta i simptoma CP/CPPS do sada nije ispitivana.

1.3.4. Disfunkcija endokrinih osovina

Osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (eng. hypothalamus–pituitary–adrenal, HPA) je kompleksni neuroendokrini sistem koji održava parametre homeostaze u fiziološkom opsegu prilikom izlaganja stresnom stimulusu. U odgovoru na stres, iz paraventricularnog jedra hipotalamusa oslobađa se kortikotropin-oslobađajući hormon (eng. corticotropin-releasing hormone, CRH) koji se vezuje za receptore u adenohipofizi koja oslobađa adrenokortikotropni hormon (eng. adrenocorticotrophic hormone, ACTH). ACTH putem cirkulacijskog sistema biva transportovan do nadbubrežne žlezde gde stimuliše sintezu i sekreciju glukokortikoida (Smith i Vale 2006).

U stanjima hronične inflamacije koja je praćena hroničnim bolom, stres kao ključni faktor putem aferentnih vlakana *n.vagusa* dovodi do oslobađanja citokina u područja *nc. tractus solitarius* i hipotalamusa, što je inicijalni događaj aktivacije HPA osovine (Hosoi i sar. 2000). Aktivacija HPA osovine stimuliše neuroinflammatory procese, ali i obratno (O’Callaghan i Miller 2019). Povećana sinteza CRH regrutuje nadbubrežnu žlezdu, pa se u serumu pacijenata koji pate od hroničnih bolesti može naći povišen nivo kortizola. Hormon nadbubrežne žlezde, kortizol, ima brojne uloge u ljudskom telu, a između ostalog u CNS dovodi do povećane aktivacije glija ćelija (Duque i Munhoz 2016). Indirektno, u stanjima hroničnog stresa i bola dolazi i do povećane sinteze mineralokortikoida u nadbubrežnoj žlezdi (ter Heegde i sar. 2015). Glukokortikoidi i mineralokortikoidi se vezuju i za glukokortikoidne (GR) i mineralokortikoidne receptore (MR) različitim afinitetom i utiču na različite procese u neuroinflammatory u zavisnosti od distribucije ovih receptora u različitim regionima mozga (Endedijk i sar. 2020). MR su prevashodno distribuirani na ćelijama hipokampusu, amigdale, i paraventricularnog jedra hipotalamusa, te povišena koncentracija kortizola čini ove neurone posebno osetljivim na neuroinflammatory promene (Gomez-Sanchez 2014). GR su predominantno ekspimirani u hipokampusu, prefrontalnoj moždanoj kori i strijatumu, te njihova ekscesivna aktivacija u slučaju povišenih koncentracija glukokortikoida vodi ka smanjenoj sintezi moždanog neurotrofičnog faktora (eng. brain-derived neurotrophic factor, BDNF) u ovim regionima mozga, te dolazi do smanjene neurogeneze, alteracija neuronske plastičnosti i aktivacije mikroglije i astrocita (Wang i sar. 2013)

Iako se zbog tradicionalno prihvaćenog antiinflammatory dejstva glukokortikoidi koriste u terapiji brojnih patoloških stanja koja su praćena povećanom aktivnošću imunskog sistema, postoje podaci koji pokazuju da u CNS mogu imati proinflammatory region-specifične efekte. Dokazano je da povišene vrednosti kortizola u plazmi indukuju u frontalnoj moždanoj kori povišenu ekspresiju proinflammatory citokina (IL-1 β i TNF- α) i enzima iNOS, dok istovremeno dovode do smanjene ekspresije antiinflammatory citokina kao što je IL-10 (Munhoz i sar. 2006). Takođe, pokazano je da kortizol stimuliše sintezu mnogobrojnih hemokina u hipokampusu i to od strane aktiviranih mikroglijalnih ćelija, kao i IL-1 β u hipokampusu i

hipotalamusu (Sorrells i sar. 2014). Iako su mehanizmi proinflammatory efekata glukokortikoida nepoznati, smatra se da je glavni cilj ovog dejstva aktivacija glija ćelija i stvaranje alarmne reakcije u CNS kako bi se obezbedile neuroplastične promene u cilju preživljavanja i zaštite neurona. Međutim, u stanjima neuroinflamacije ovaj proces prevazilazi granice fiziološkog odgovora, te se proinflammatory efekti kortizola u CNS odražavaju neurodegeneracijom, astrogliozom i oštećenjem funkcije neurona. Činjenica da u osnovi brojnih psihijatrijskih bolesti leži disfunkcija HPA osovine je poznata, ali involviranost ovog patogenetskog mehanizma u razvoju simptoma i komorbiditeta CP/CPPS je slabo ispitana.

Sa druge strane, kliničke (Lee i Lee 2016a), ali i animalne (Wu i sar. 2021) studije su pokazale da je snižena serumska koncentracija testosterona jedan od endokrinih pratilaca CP/CPPS. Međutim, disregulacija HPA osovine u sklopu CP/CPPS nije ispitana, dok su podaci o tome u kontekstu neuroinflamacije oskudni (Foster i sar. 2003). Poznata je činjenica da se citokinski receptori za TNF- α , IL-6 i IFN- γ nalaze na Lajdigovim ćelijama testisa i da njihova stimulacija inhibira produkciju testosterona (Hong i sar. 2004), a da se takođe dejstvom TNF- α i IL-1 β na receptore hipokampusa inhibira sinteza i oslobađanje gonadotropin-oslobađajućeg hormona (gonadotropin-releasing hormone, GnRH), te je smanjena sekrecija luteinizirajućeg hormona (LH) iz hipofize, kao i testosterona iz testisa (Wu i Wolfe 2012). S obzirom da je niska koncentracija testosterona povezana sa brojnim neurodegenerativnim procesima i poremećajima raspoloženja i ponašanja, pa sve do kliničke anksioznosti, depresije i kognitivnih smetnji, ne sme se izostaviti i uticaj HPA osovine na razvoj neuroinflamacijom-posredovanih neurodegenerativnih stanja CNS (Blair i sar. 2015).

1.3.5. Uloga oksidativnog stresa

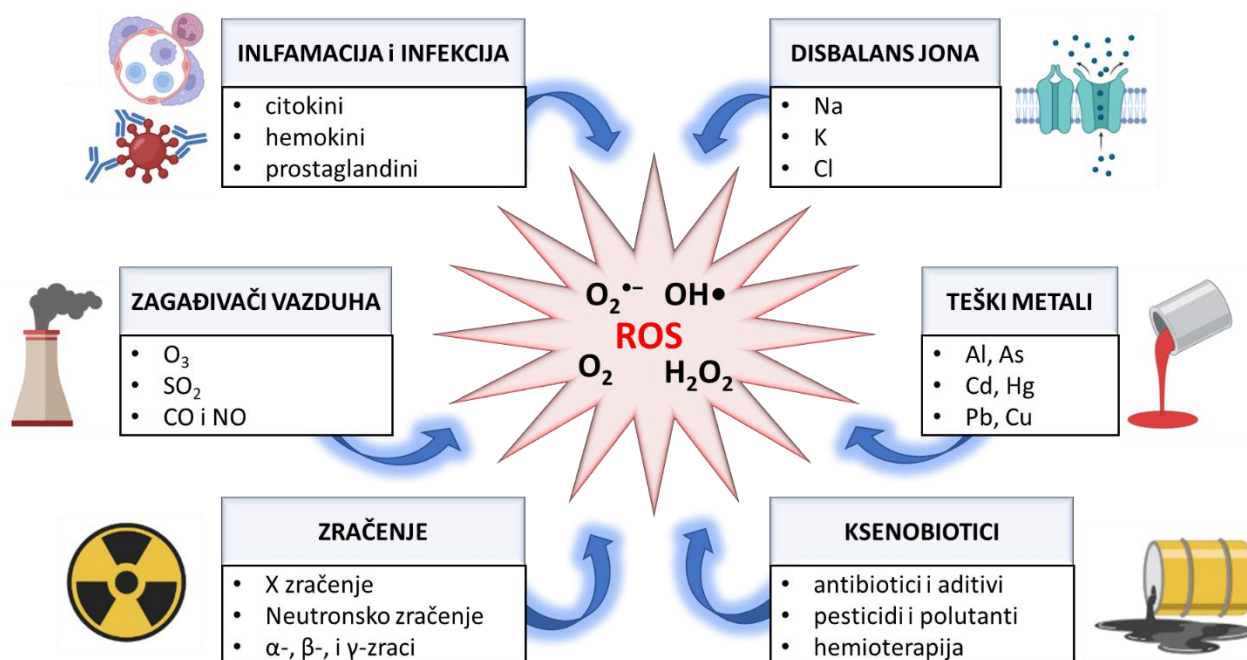
Narušena ravnoteža mehanizama antioksidativne zaštite i stvaranja slobodnih radikala se naziva **oksidativni stres**, odnosno redoks disbalans. Slobodni radikali su podeljeni u reaktivne azotne vrste (eng. reactive nitrogen species, **RNS**) i reaktivne kiseonične vrste (eng. reactive oxygen species, **ROS**). ROS je heterogena grupa hemijskih jedinjenja i elemenata koji nastaju u procesima oksidativnog metabolizma i u fiziološkim okolnostima imaju funkciju signalnih molekula (Finkel 2011). U zavisnosti od toga da li imaju nesporene elektrone mogu se podeliti u slobodne radikale i neradikalske oblike.

Slobodni radikali su vrlo reaktivni sa drugim hemijskim jedinjenjima usled prisustva jednog ili više nesporenih valentnih elektrona, a mogu se naći u obliku atoma, jona i molekula. Među najznačajnije azotne i kiseonične slobodne radikale spadaju: azot monoksid ($\text{NO}\bullet$), hidroksilni radikal ($\text{OH}\bullet$), kiseonik ($\text{O}_2\bullet\bullet$), superoksid anjon ($\text{O}_2^{\bullet-}$) i peroksil ($\text{ROO}\bullet$). Najznačajniji **neradikalni oblici kiseonika** su: ozon (O_3), vodonik peroksid (H_2O_2), aldehyd (HCOR), hipohlorna kiselina (HOCl) i peroksinitrit (ONOO^-) (Pizzino i sar. 2017).

Tokom različitih **enzimskih reakcija** u telu mogu nastati ROS, a najčešće su to enzimske reakcije respiratornog lanca, enzimska aktivnost citohroma P450, fagocitoza i sinteza prostaglandina. **Superoksidni anjon ($\text{O}_2^{\bullet-}$)** nastaje enzimskom aktivnošću NADPH oksidaze, ksantin oksidaze i različitih peroksidaza prilikom aerobne respiracije, a po svom nastanku se uključuje u lance hemijskih reakcija i dovodi do nastanka vodonik peroksida (H_2O_2), hidroksilnog radikala ($\text{OH}\bullet$), peroksinitrita (ONOO^-) i hipohlorne kiseline (HOCl). $\text{O}_2^{\bullet-}$ može biti sintetisan i u endoplazmatskom retikulumu tokom sinteze proteina i tokom hemijske modifikacije egzogenih i endogenih materija (Murphy i sar. 2022). Od neradikalnih oblika najčešći je **H_2O_2** produkovan od enzima oksidaza. Iako nema nesporene elektrone, njegova uloga u produkciji slobodnih kiseoničnih radikala nije zanemarljiva.

Najreaktivniji radikalski oblik ROS je **hidroksilni radikal (OH•)**, koji nastaje u Fentonovoj reakciji $O_2^{\bullet-}$ sa H_2O_2 , uz katalitičko dejstvo Fe^{2+} ili Cu^+ (Walling i sar. 2021). NO radikal (NO•), u fiziološkim koncentracijama igra bitne fiziološke uloge, a nastaje pri sintezi NO prilikom oksidacije arginina do citulina pod dejstvom enzima NOS (Porasuphatana i sar. 2003). Prekomerna sinteza $O_2^{\bullet-}$ u interakciji sa NO• stvara ONOO⁻, koji ispoljava snažna prooksidativna svojstva s obzirom na mogućnost difuzije i do 5µm do susjednih ćelija (Radi 2018). Takođe, HOCl i $O_2^{\bullet-}$ imaju odbrambenu funkciju kada su sintetisani u vezikulama od strane fagocita (Dupré-Crochet i sar. 2013). Molekulski kiseonik, vrlo je stabilan, ali je biradikal jer poseduje 2 neuparena elektrona u dve različite orbitale, te može dovesti do oksidacije i denaturacije proteina. O_3 sam po sebi nije radikal, ali je snažan oksidujućii agens jer degradacijom daje O^2 i atom kiseonika (O) koji jeste slobodni radikal i može direktno oksidovati organske komponente (Pryor 1994). ROS mogu nastati i putem **neenzimskih reakcija** kada se ćelija izloži npr. jonizujućem zračenju ili kada molekulski kiseonik reaguje sa organskim materijama (Pizzino i sar. 2017).

Nastanak ROS može biti rezultat dejstva endogenih i egzogenih uzročnika (Slika 1.3.5.1.). Među najčešće **endogene uzročnike** se ubrajaju procesi unutar imunskih reakcija, zapaljenje, ishemija tkiva, infekcija, neoplazme, ekscesivna fizička aktivnost, starenje i hronični stres. Među najčešće **egzogene uzročnike** nastanka ROS se ubrajaju zagađivači iz životne sredine, teški metali, pojedini medikamenti (ciklosporin), organski rastvarači, radijacija i konzumacija duvana i alkohola (Zhang i sar. 2021a). U svojim fiziološkim koncentracijama ROS imaju brojne fiziološke uloge kao što su uništenje patogena u fagolizozomima nakon fagocitoze i učešće u brojnim signalnim putevima u vidu signalnih molekula. Multipla uloga ROS se ogleda u involviranosti NO u brojne procese kao što su regulacija protoka krvi u određenim područjima cirkulacije, održavanje fiziološke sinaptičke aktivnosti, destrukcija patogena i tumorskih ćelija (Beckhauser i sar. 2016).



Slika 1.3.5.1. Najčešći uzroci nastanka kiseoničnih slobodnih radikala

Prema: Das i Roychoudhury 2014.

Za sprečavanje produkcije novih ROS i degradaciju već stvorenih je zadužen sistem **antioksidativne zaštite** koji može biti enzimski i neenzimski.

Prva linija odbrane podrazumeva **enzimsku antioksidativnu zaštitu** koja se sastoji od nekoliko enzima: superoksid dismutaza, katalaza, glutation reduktaza i glutation peroksidaza i glutation-S-transferaza (Slika 1.3.5.2.).

Drugu liniju odbrane čini **neenzimska antioksidativna zaštita** koju čine sve materije koje mogu da zaustave oksidaciju supstrata, a nazivaju se **antioksidansi** (Irshad i Chaudhuri 2002).

Superoksid dismutaza (SOD) je metaloproteinski enzim koji katalizuje dismutaciju $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 i O_2 . U zavisnosti od toga koji metal sadrži, u ćelijama sisara razlikujemo tri tipa SOD koji imaju specifičnu lokalizaciju: bakar/cink SOD (Cu/Zn-SOD) je intracelularni enzim i nalazi se u citoplazmi, mangan SOD (Mn-SOD) je zastupljena u mitohondrijama, ali i kao ekstracelularna Mn-SOD u likvoru, plazmi i limfi. Kao krajnji produkt transformacije $O_2^{\cdot-}$, novonastali H_2O_2 usled svojih oksidativnih sposobnosti se dalje uklanja enzimskim dejstvom katalaze i glutation peroksidaze (Assady i sar. 2011).

Katalaza (CAT) je takođe metaloproteinski enzim koji razgrađuje H_2O_2 do H_2O i O_2 . Njena funkcija počiva na specifičnoj strukturi koja podrazumeva 4 proteinske subjedinice i 4 hem prostetične grupe sa Fe^{3+} u centru. Prilikom hemijske reakcije sa prvim molekulom H_2O_2 dolazi do oksidacije Fe^{3+} u Fe^{4+} , te nastaje „komponenta I“ koja potom reaguje sa novim molekulom H_2O_2 koji joj predaje još jedan elektron (Scibior i Czczot 2006).

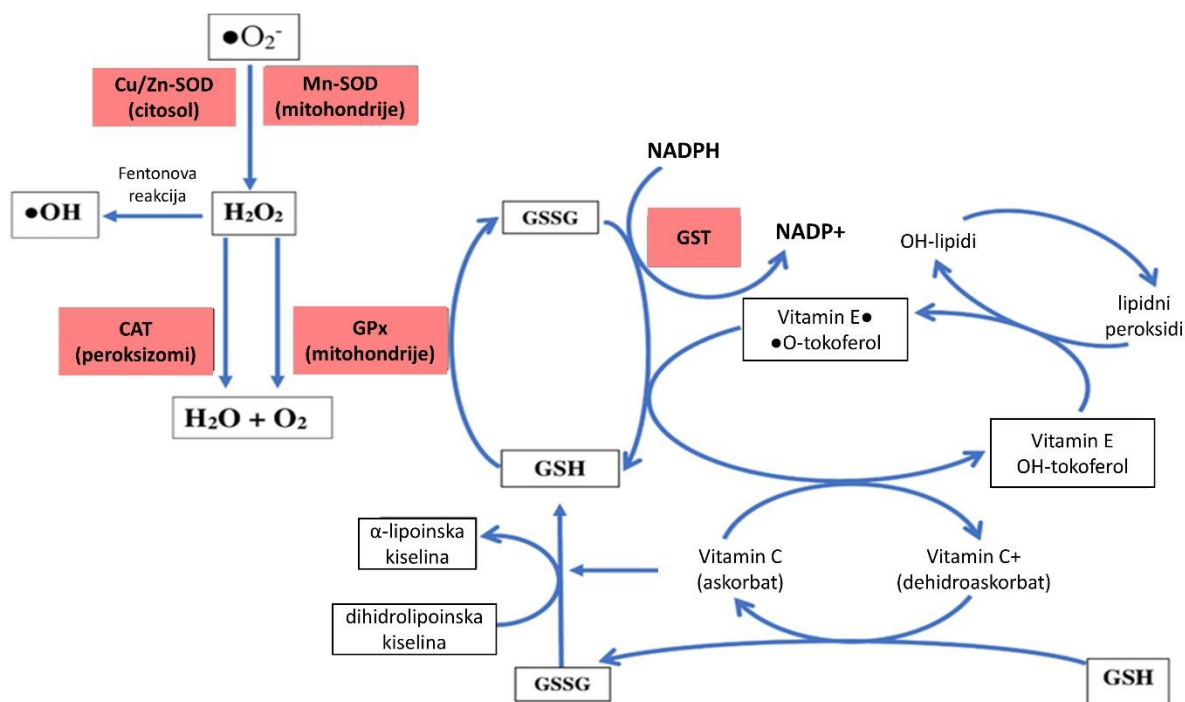
Glutation peroksidaza (GPx) za razliku od katalaze, uklanja H_2O_2 i pri niskim koncentracijama. Donor elektrona je glutation (GSH), molekul koji pri niskim koncentracijama degradira H_2O_2 uz utrošak dva molekula glutationa, a završni produkt reakcije su voda i oksidovani glutation (glutation disulfid-GSSG) i voda. U situacijama intenzivnog oksidativnog stresa, ovaj mehanizam se iscrpljuje i dolazi do smanjenja količine GSH, uz istovremeno povećanje količine GSSG.

Obnavljanje zaliha GSH se nadoknađuje sintezom novih molekula, ili pak redukcijom GSSG do GSH pomoću enzima **glutation reduktaza (GR)** uz utrošak NADPH u svojstvu redukujućeg faktora (Dalvi i sar. 2012).

Glutation-S-transferaza (GST) je enzim koji posreduje u konjugaciji GSH i elektrofilnih ksenobiotika (Nebert i Vasiliou 2004). Proteini koji sadrže tiol (-SH, sulfihdrilne) grupe unutar cisteinskih aminokiselinskih bočnih lanaca su vrlo raznovrsni, a pored GSH postoje i drugi proteinski tioli (P-SH) koji se ponašaju kao akceptor elektrona, te redukuju nestabilne slobodne radikale u enzimskim reakcijama (Ulrich i Jakob 2019).

Neenzimske antioksidanse čini velika grupa heterogenih hemijskih jedinjenja koja se sintetišu organizmu, ili većinski unose putem hrane. Bilirubin, proteini (ceruloplazmin, transferin, karnozin), glutation i mokraćna kiselina su endogeno sintetisani antioksidansi, dok se u egzogene ubrajaju vitamini (C i E), koenzim Q10, α -lipoinjska kiselina i N-acetil-cistein (Irshad i Chaudhuri 2002).

Vrlo nestabilni i visokoreaktivni ROS poseduju nesparene elektrone, a kada postoji njihova hiperprodukcija, reaguju sa biološkim makromolekulima (ugljeni hidrati, proteini, lipidi), te se generišu novi molekuli slobodnih radikala koji na dalje ulaze u hemijske reakcije sa novim intaktnim molekulima. Najreaktivniji slobodni radikal jeste $OH\cdot$ koji vrlo brzo reaguje sa bilo kojim biološkim makromolekulom i oštećuje ga.



Slika 1.3.5.2. Mehanizmi antioksidativne zaštite

Kiseonični superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$) nastao redukcijom jednog elektrona u molekulskom kiseoniku (O_2) se katalitičkim dejstvom (Cu/Zn-SOD ili Mn-SOD) prevodi u vodonik peroksid (H_2O_2) koji se do H_2O i O_2 prevodi aktivnošću katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx). U Fentonovoj reakciji, od H_2O_2 nastaje hidroksilni radikal (OH^{\bullet}) koji dalje učestvuje u lancu reakcija slobodnih kiseoničnih radikala. U reakciji koju katalizuje GPx, ali i u reakciji sa slobodnim radikalima, troši se redukovani glutation (GSH) i nastaje oksidovani glutation (GSSG). GSSG se može ponovo redukovati do GSH pomoću enzima glutation transferaze (GST) uz utrošak NADPH i nastanak NADP+. Vitamin C i α -lipoinjska kiselina mogu da oksidovani GSSG prevedu u redukovani GSH. Vitamin E otklanja lipidne peroksidi i završava lanac oksidativnih reakcija, a takođe i redukuje Vitamin C. Modifikovano prema Sindhu i sar. 2022.

Dužina poluživota slobodnih radikala je izuzetno kratka pa u standardnim laboratorijskim uslovima njihova koncentracija nije laka za određivanje. Usled toga se za procenu stepena oksidativnog stresa koriste biomarkeri oksidativnog stresa u vidu produkata oksidativnog oštećenja lipida, proteina i DNK (Irshad i Chaudhuri 2002), čije merenje koncentracije pomaže u rasvetljavanju patofizioloških mehanizama oštećenja tkiva dejstvom oksidativnog stresa (Sandhu i Birnboim 1997).

Lipidna peroksidacija podrazumeva oštećenje lipoproteina ćelijskih membrana, a manifestuje se generisanjem velike količine primarnih visokoreaktivnih međuprodukata (alkil radikali, konjugovanih dieni, peroksi i alkoksi radikali i lipidni hidroperoksid), od kojih daljom degradacijom nastaju sekundarni produkti lipidne peroksidacije (kratkolančani isparljivi ugljovodonici i aldehidi), dok su krajnji proizvodi lipidne peroksidacije: izoprostani, MDA, 4-hidroksi-2,3-transnonenal i 4,5-dihidroksidecenal (Yavuzer i sar. 2016). Merenje koncentracije ovih jedinjenja koja su markeri lipidne peroksidacije, vrši se u cilju određivanja intenziteta oksidativnog stresa (Gaweł i sar. 2004). ROS ispoljavaju i citotoksično dejstvo jer strukturnim oštećenjem lipida u ćelijskoj membrani dolazi do promena njene propustljivosti. Takođe, oksidativno oštećenje proteina dovodi do narušavanja njihove strukture i funkcije, a specifično je što priroda proteinske modifikacije ponekad može da ukazuje na ROS koji je doveo do tog oštećenja (Murphy i sar. 2022). Hlorotirozil je marker oštećenja tirozina dejstvom hipohlorita (HOCl) i pokazuje učešće neutrofila i monocita u oksidativnom stresu, dok nitrotirozil ukazuje na povećanu sintezu peroksinitrita. Karbonilne grupe su markeri oštećenja slobodnim

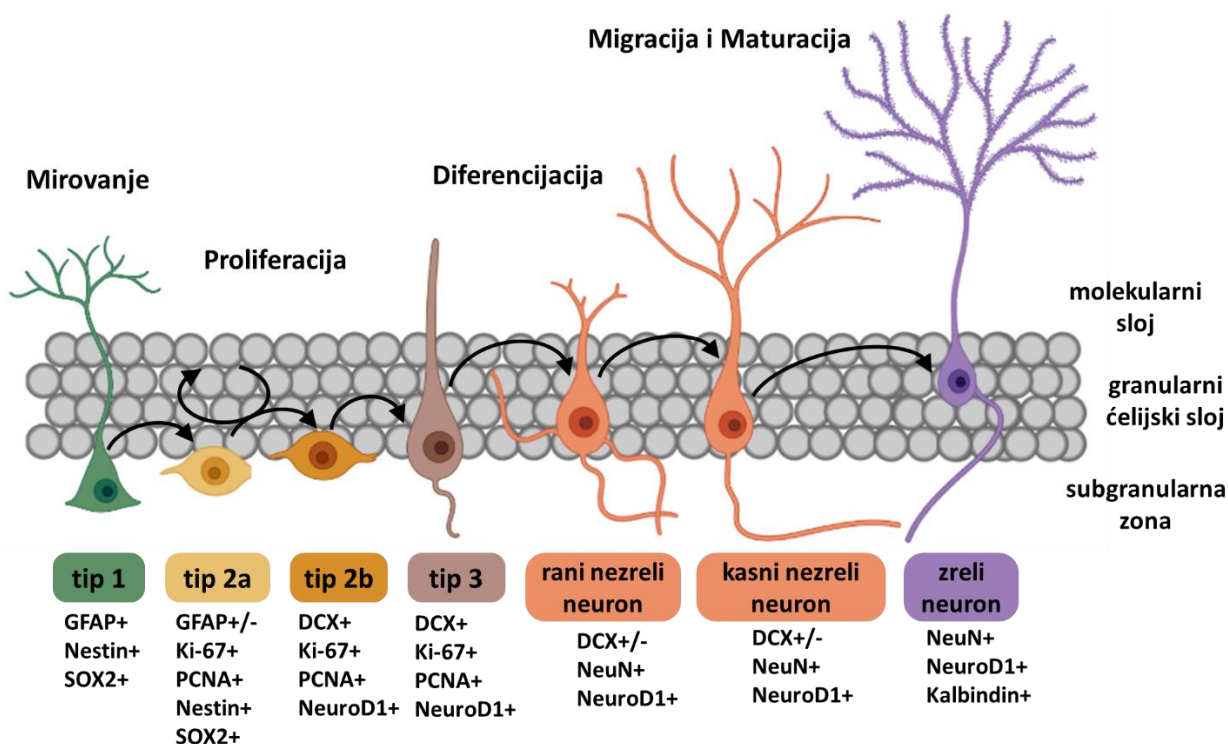
radikalima, dok je ditirozil najznačajniji i najosetljiviji marker oksidativne modifikacije dejstvom γ -zračenja (Pizzino i sar. 2017). „Karbonilni stres“ je sekundarna oksidacija proteina gde redukujući šećeri neenzimski reaguju sa amino grupama proteina, gde se stvaraju kovalentna jedinjenja kao uznapredovali proizvodi glikozilacije ili AGE-proizvodi (eng. advanced glycosylated end products). Hidroksilni radikal oštećuje i molekul DNK dovodeći do gubitka azotnih baza i stvaranja abazičnih mesta, cepanja lanca DNK i modifikacije šećera. Proizvod lipidne peroksidacije, MDA, se kovalentno vezuje za DNK, stvarajući „DNK radikale“ koji su odgovorni za nastanak mutacija (Pryor 1994).

Nervno tkivo se karakteriše visokim intenzitetom metabolizma, visokim zahtevima za kiseonikom i obiljem mitohondrija, ali ujedno i niskim respiratornim kapacitetom i visokom zastupljenošću polinezacićenih masnih kiselina (Watts i sar. 2018). Sve pomenute činjenice su razlog vrlo visoke osetljivosti CNS na oštećenja uzrokovana prisustvom viška ROS. Neuroinflamacija, koju odlikuje morfološka reorganizacija, intenzivni metabolizam u tkivu i prisustvo brojnih citokina i hemokina, veoma je pogodno tlo za generisanje velike količine ROS. Na početku ovog procesa mobilizacija sistema antioksidativne zaštite uspeva da neutrališe ROS, ali sa napredovanjem procesa dolazi do gubitka oksidativne ravnoteže i produkcija ROS dominira nad eliminacijom (Ulrich i Jakob 2019). Iako je poznato da je oksidativni stres u organima muškog reproduktivnog sistema involviran u razvoj CP/CPPS i drugih uroloških bolesti (Ihsan i sar. 2018), a da je takođe oksidativni stres u CNS bitan prediktor razvoja psihijatrijskih bolesti (Salim 2017), do sada nije ispitivan uticaj oksidativnog stresa u strukturama mozga u kontekstu rasvetljenja etiopatogenetskih mehanizama psihijatrijskih komorbiditeta i hroničnog bola koji prate CP/CPPS.

1.3.6. Alteracija adultne neurogeneze i astrocitoza hipokampusa

Neuroinflamatorni procesi, mogu narušiti proces neurogeneze i aktivirati proces astrocitoze u CNS (Sofroniew 2015). Mikroglijalne ćelije svojim fiziološkim funkcionisanjem stvaraju mikrookolinu za nesmetanu maturaciju neurona tokom embriogeneze, postnatalnog razvoja, ali i tokom adultne neurogeneze. Inflamatorni citokini i ROS poreklom mikroglije dokazano suprimiraju ćelijsku proliferaciju tokom adultne neurogeneze u hipokampusu (Fan i Pang 2017). Osim procesa neurogeneze, usled aktivacije nastaje ekscitivna astrocitoza hipokampusa koja uz smanjenu neurogenezu drastično narušava osnovne neurofiziološke osobine ovog regiona mozga (Sofroniew 2015). Dodatno, neuroinflamacijom-indukovani gubitak GABAerģičke inhibitorne mreže hipokampusa dovodi do disfunkcije hipokampusa sa narušenom sinaptičkom transmisijom ka subkortikalnim strukturama i cerebralnoj kori, te je to uzrok simptoma u neuroinflamatornim i neurodegenerativnim bolestima CNS (Ruden i sar. 2021). Usled ograničenja uzorkovanja ljudskog moždanog tkiva, ne postoje studije koje su u kontekstu neuroinflamacije ispitivale ulogu ultrastrukturnih promena hipokampusa kod obolelih od CP/CPPS, dok je u animalnim studijama pokazana reaktivna astrocitoza hipokampusa (Du i sar. 2019) i L6-S1 segmenta kičmene moždine (Deng i sar. 2019).

Neurogeneza je stvaranje novih neurona u mozgu koji se razvija, a termin **adultna neurogeneza** je formiranje novih neurona u postnatalnom periodu, tokom života, a do danas se zna da je ovo proces koji se dešava u subventrikularnoj zoni bočnih moždanih komora odakle novi neuroni migriraju do olfaktivnog bulbosa i diferenciraju se u interneurone, a takođe i u subgranularnoj zoni (SGZ) dentatnog girusa (DG) hipokampusa u cilju stvaranja novih granularnih neurona unutar DG (Ribeiro i Xapelli 2021). Tokom adultne neurogeneze u SGZ hipokampusa (Slika 1.3.6.) ćelije prolaze kroz nekoliko stadijuma.



Slika 1.3.6. Stadijumi ćelija tokom adultne neurogeneze i najčešće korišćeni imunohistohemijski markeri za njihovu detekciju

Adultna neurogeneza unutar SGZ hipokampusa podrazumeva nastanak novih neurona kroz različite faze, od stadijuma mirovanja (tip1), kroz stadijume proliferacije (tip 2a i tip 2b), preko stadijuma diferencijacije (tip 3), pa sve do migracije i maturacije (rani i kasni nezreli neuroni) do nastanka zrelih neurona. Prolaskom kroz ove faze ćelije menjaju genotipske i fenotipske karakteristike, a ekspresija određenih imunohistohemijskih markera nije jasno definisana, pa se isti markeri ekspresiraju u različitim fazama ovog procesa. GFAP – eng. glial fibrillary acidic protein = glijalni kiseli fibrilarni protein; SOX2 – eng. SRY Related High Mobility Group Box 2; PCNA – eng. proliferating cell nuclear antigen = jedarni antigen proliferišućih ćelija; DCX – eng. Doublecortin = dablkortin; NeuroD1 – eng. neurogenic differentiation 1 = protein neurogene diferencijacije 1; NeuN – eng. neuronal nuclei = protein neuronskog jedra. Prema: Knoth i sar. 2010 i Overall i Kempermann 2018.

„Tip 1“ ćelije imaju karakteristike glija ćelija i ekspresiraju GFAP, a nalaze se u stanju mirovanja i slabo se dele (eng. neural stem cells, NSCs). Ove ćelije se aktiviraju i nastaju progenitorske „tip 2a“ i „tip2b“ ćelije koje karakteriše visok nivo proliferacije i početna diferencijacija, te dobijaju karakteristike neurona, što se dokazuje markerima koje ekspresiraju: protein Ki-67 (marker proliferacije), dablkortin (eng. *doublecortin*, DCX) i nestin. Sledi faza migracije kada „tip 3“ ćelije dobijaju karakteristike slične neuroblastima. Potom se gubi mogućnost ćelijske deobe te sledi faza maturacije koja podrazumeva povećanje broja i dužine dendritskih nastavaka ka molekularnom sloju DG i rast i pružanje aksonskog stabla ka CA3 regionu hipokampusa, a ćelije morfološki prolaze kroz stadijume ranih i kasnih nezrelih neurona i završni stadijum zrelih neurona kada ćelije ekspresiraju protein neuronskog jedra (eng. neuronal nuclei, NeuN) (Overall i Kempermann 2018). Za ispitivanje obima adultne neurogeneze i detekcije ćelija u različitim stadijumima ovog procesa se koriste markeri koje ekspresiraju tokom ovog procesa, a neki od češće korišćenih su već pomenuti: GFAP, nestin, DCX, Ki-67, NeuN, ali i protein SOX2 (eng. SRY-related high-mobility-group box), jedarni antigen proliferišućih ćelija (eng. proliferating cell nuclear antigen, PCNA), protein neurogene diferencijacije 1 (eng. neurogenic differentiation 1, NeuroD1), kao i egzogeni marker-agens bromodeoksiuridin (BrdU) (von Bohlen Und Halbach 2007).

Protein Ki-67 poreklom iz jedra je uključen u ćelijsku proliferaciju i transkripciju ribozomalne RNK. Prednost korišćenja Ki-67 kao markera proliferišućih neurona je velika, jer se endogeno sintetiše u neuronima u razvoju, u odnosu na BrdU koji je egzogena materija i zahteva prethodnu aplikaciju, a tek se kasnije ugrađuje u proliferišuće neurone. Takođe, bitne prednosti Ki-67 su mogućnost markiranja svih faza ćelijskog ciklusa i visoka stabilnost i specifičnost na parafinskim preparatima, što mu donosi primat u upotrebi kada je potrebno markiranje ćelija u fazi diferencijacije i proliferacije (Bologna-Molina i sar. 2013). DCX je mikrotubularni protein specifičan za neurone i predstavlja vrlo pouzdan marker isključivo mladih novostvorenih neurona u DG hipokampusa, za razliku od drugih markera koji se eksprimiraju i u glijalnim ćelijama, kao i u apoptotskim ćelijama i zrelim neuronima (Wojtowicz i Kee 2006). DCX se eksprimira u visokim koncentracijama u "tip 2b" ćelijama i "tip 3" ćelijama, a njegova ekspresija opada proporcionalno idući ka zrelim neuronima, za razliku od NeuN čije je eksprimiranje u porastu (von Bohlen Und Halbach 2007).

Astrocitoza predstavlja odbrambeni mehanizam u CNS čiji je primarni cilj reparacija inicijalnog oštećenja, ali i ograničavanje patološkog procesa koji je inicirao aktivaciju astrocita na ograničeni tkivni fokus (Sofroniew 2015). Prvi korak u nastanku reaktivne astrocitoze je aktivacija astrocita koja se dešava pod dejstvom citokina i hemokina poreklom mikroglije ili regrutovanih ćelija imunskog sistema (Röhl i sar. 2007). Kada ovaj proces postane neregulisan, dolazi do molekularnih, celularnih i funkcionalnih alteracija astrocita u procesu astroglioze (Yang i sar. 2020a). Usled reakcije na oštećenje, zreli astrociti, kao postmitotske ćelije sa nemogućnošću deobe, hipertrofišu i povećavaju površinu svojih soma i nastavaka, a to je praćeno povećanom ekspresijom GFAP. Medijatori aktiviranih astrocita utiču na progenitorne ćelije koje se potom diferenciraju u pravcu zrelih astrocita, a povećana ekspresija GFAP prati i ovaj proces (Chandrasekaran i sar. 2016). S obzirom na visoku ekspresiju tokom aktivacije astrocita i sazrevanja novih, protein GFAP se koristi kao imunohistohemijski marker aktivacije astrocita i imunohistohemijsko kvantifikovanje GFAP+ površine korelira sa stepenom astrocitoze (Brahmachari i sar. 2006). Astrocitoza hipokampusa je patološki supstrat u brojnim neurodegenerativnim i neuroinflamatornim bolestima CNS, uključujući i epilepsiju (Verkhratsky i sar. 2013).

Iako GABAergički lokalni interneuroni u neuronskim krugovima hipokampusa čine samo 10-15% njegove ćelijske populacije, njihova anatomsko i fiziološka raznovrsnost im omogućava da regulišu esencijalne procese u obradi signala unutar CNS (Pelkey i sar. 2017). Ovi neuroni su podeljeni u nekoliko subpopulacija u zavisnosti od funkcije, a takođe eksprimiraju i različite imunohistohemijske markere: parvalbumin (PV), somatostatin (SS) i neuropeptid Y (NPY).

PV je kalcijum vezujući protein sa malom molekulskom masom i eksprimiran je u interneuronima CA1-3 regiona i DG hipokampusa (Megahed i sar. 2014). Hipokampalni PV+ interneuroni imaju ključnu ulogu u osnovnoj bioelektričnoj kontroli neurona i orkestriranju signalne transdukcije. Njihova aktivnost je kritična za formiranje memorije i procesuiranje informacija u nastanku reakcije na spoljašnji stimulus, a sve to putem formiranja γ bioelektričnih oscilacija poreklom PV+ interneurona hipokampusa tokom kortikalnog procesuiranja signala (Khlaifia i sar. 2022). S obzirom na široku lateralnu inhibiciju koju ove ćelije vrše na okolne ćelije hipokampusa, dokazano je da je posreduju u regulaciji ponašanja.

Gubitak PV+ GABAergičke inhibitorne mreže hipokampusa usko je povezan sa nastankom kognitivnog deficita, hroničnog neuropatskog bola, anksioznosti, depresije i zavisnosti, kao i shizofrenije, autizma i Alchajmerove bolesti (Nahar i sar. 2021). Moguće je da ovi inhibitorni neuroni imaju ulogu u patogenezi komorbiditeta koji prate CP/CPPS, ali ova njihova uloga još uvek nije u potpunosti rasvetljena.

1.4. CO kao gasotransmitter

Razmatranje uloge i doprinosa klasičnih neurotransmitera u mehanizmima razvoja komorbiditeta koji prate CP/CPPS nije u potpunosti moglo objasniti njihovu povezanost sa ovim sindromom periferne inflamacije. Stoga je posebno aktuelna potreba da se ovi procesi razumeju i sa aspekta novijih signalnih puteva o kojima se do sada jako malo znalo. Jedni od takvih signalnih puteva su i oni u kojima učestvuju gasotransmiteri. U porodicu gasnih neurotransmitera (gasotransmiteri) spadaju azot monoksid (NO), vodonik disulfid (H₂S) i ugljen monoksid (CO).

Kada su sintetisani endogeno u organizmu u niskim koncentracijama ispoljavaju specifične fiziološke uloge (Shefa i sar. 2018). Ovi gasovi, koji su lako difuzibilni zbog svoje strukture, deluju po principu sekundarnih glasnika u brojnim intracelularnim signalnim putevima, ali su takođe i modifikatori intracelularnih proteina metabolizma (Pałasz i sar. 2021). Svojim efektima regulišu brojne ćelijske funkcije kao što su: citoprotekcija, apoptoza, proliferacija, transkripcija gena, sinteza proteina, ćelijska respiracija i sinteza ATP (Paul i Snyder 2018). Njihovi brojni celularni efekti se ispoljavaju u skoro svim organskim sistemima: kardiovaskularnom, nervnom, gastrointestinalnom, genitourinarnom i imunskom sistemu (Pałasz i sar. 2021), te je opravdano postaviti hipotezu o njihovoj ulozi u razvoju komorbiditeta vezanih za mentalno zdravlje koji prate CP/CPPS.

Iako je CO tradicionalno smatran vrlo toksičnim gasom koji onemogućava aerobni metabolizam i dovodi čak do smrti, otkriće da učestvuje u brojnim signalnim procesima unutar CNS su stavile CO u istraživački fokus (Hanafy i sar. 2013). Naime, da reverzibilno vezivanje CO za hemoglobin vodi do asfiksije, prvi je demonstrirao Klod Bernard (Smith 1965). Ukoliko se primeni O₂ pod visokim parcijalnim pritiskom, moguće je raskinuti jaku vezu između hemoglobina i CO (Varma i sar. 2015).

U nekoliko prethodnih decenija, istraživanja na ovom polju 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). CO predstavlja enigmam sam po sebi jer su istraživanja iz prošlog veka stvorila lošu sliku o ovom molekulu, a brojna istraživanja iz laboratorija širom sveta koja datiraju iz ovog veka su definisala endogenu enzimsku produkciju CO i pokazala čak i tkivnu specifičnost ovog procesa pod različitim uslovima i dale sliku o njegovoj važnosti u homeostatskoj kontroli (Wu i Wang 2005).

1.4.1. Endogena sinteza

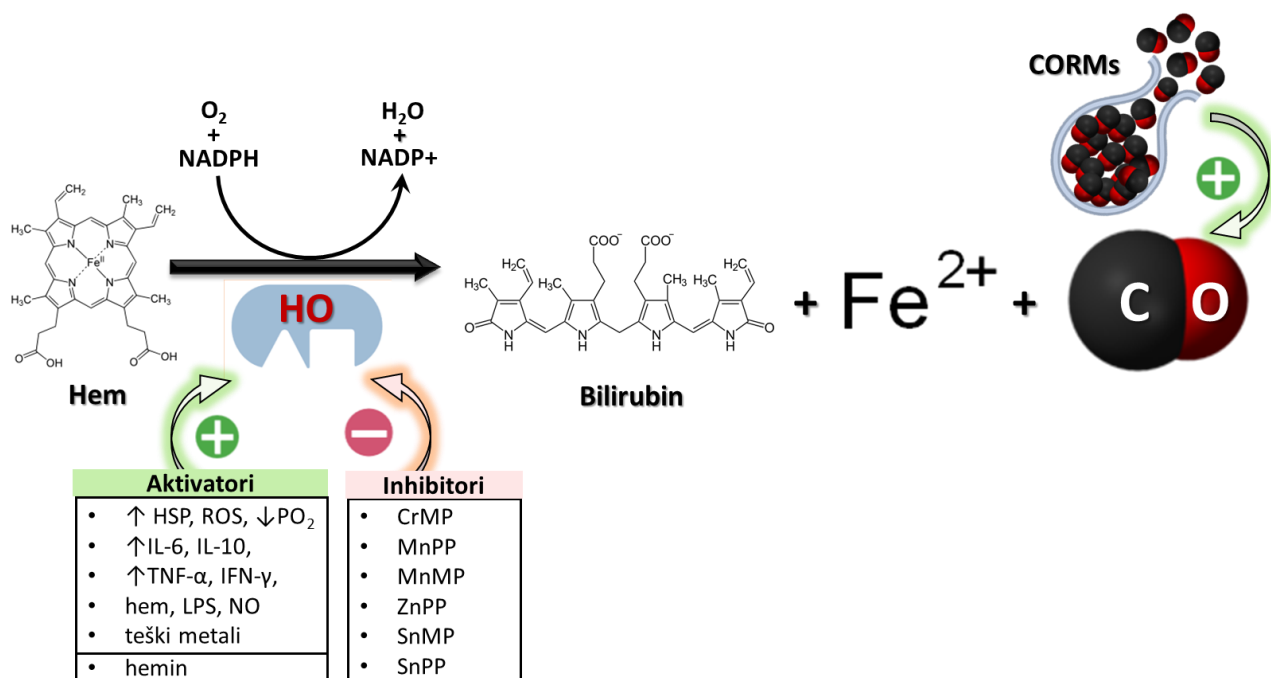
Promena tačke gledišta o CO kao letalnom gasu je nastupila kada je otkriveno da se on endogeno sintetiše u ljudskom telu, a to je zaključeno na osnovu opservacije da hemoliza i intenzivna razgradnja hema dovodi do povećanja nivoa karboskihemoglobina - HgbCO (Sjostrand 1952). Tek nakon deset godina je otkriveno da je produkcija CO posredovana enzimom za degradaciju hema, hem oksigenazom (HO) (Tenhunen i sar. 1968). Endogena produkcija CO u fiziološkim uslovima je veoma niska i referiše se u nanomolarnom opsegu kada je procenat HgbCO u krvi u fiziološkom opsegu od 1% do 2% (Heinemann i sar. 2014). U manjoj meri, CO u ljudskom telu nastaje neenzimskim procesima usled dejstva H₂O₂ ili Vitamina C na hem ili usled inaktivacije enzima citohroma P450 (Zweier i sar. 1999).

Fiziološki, sinteza CO u organizmu se odigrava putem enzima HO. Do danas su identifikovane tri izoforme enzima HO: HO-1 je inducibilna izoforma, ubikvitarno prisutna, sa povećanjem ekspresije u slučaju povećanja ROS, hipoksije i povišenih koncentracija medijatora inflamacije ili hema (Deshane i sar. 2005). HO-2 je konstitutivno eksprimirana izoforma, u

mozgu i testisima (Muñoz-Sánchez i Chánez-Cárdenas 2014), dok je HO-3 izoforma 90% analogna sa HO-2, a konstitutivno je eksprimirana u mozgu pacova (Hayashi i sar. 2004).

Eksperimentalna modulacija nivoa endogenog CO se vrši inhalacijom gasovitog CO, farmakološkim agensima koji aktiviraju ili inhibiraju aktivnost HO, kao i aplikovanjem sintetskih metalo-organskih jedinjenja koja oslobađaju CO sporo i u fiziološkim koncentracijama (CO releasing molecules, CORMs) (Motterlini i Foresti 2017). Najčešće korišćeni inhibitori enzima HO u eksperimentalnim studijama su metaloporfirini: hrom mezoporfirin (CrMP), mangan protoporfirin (MnPP), mangan mezoporfirin (MnMP), cink protoporfirin (ZnPP), kalaj mezoporfirin (SnMP) i kalaj protoporfirin (SnPP) (Wu i Wang 2005). Eksperimentalna aktivacija HO enzima se vrši egzogenom aplikacijom hemina (oksidovani hem), ili pak aplikacijom CORMs (Slika 1.4.1.)

Postoji nekoliko tipova CORMs koji su dobra zamena za gasoviti CO sa kojim je teško manipulirati, a oslobađanje CO verno oponira biološku aktivnost HO enzima. Iako postoje i drugi CORMs: CORM-2 koji je liposolubiln; CORM-3 koji je rastvorljiv u vodi, ali je kiseo molekul i snižava pH, a oslobodi sav CO naglo u visokim koncentracijama; ALF186 ([Mo(CO)3(histidinato)Na]) i ALF062 ([Mo(CO)5Br] koji nemaju pogodne hemijske osobine, jedan od najčešće korišćenih CORMs je CORM-A1 (Na2[H3BCO2]) (Abeyrathna i sar. 2017). CORM-A1 je hidrosolubilni molekul koji u svojoj strukturi sadrži bor, a ne prelazne metale, a nakon aplikacije njegov poluživot je oko 21 minut tokom kojih oslobađa konstantno nisku koncentraciju CO, što ga čini potencijalno terapijskim agensom (Iqbal i sar. 2021).



Slika 1.4.1. Aktivnost enzima hem oksigenaze (HO) i njeni aktivatori i inhibitori

HO razgrađuje hem do bilirubina, a oslobađa se Fe²⁺ i CO. Prikazani su potencijalni aktivatori i inhibitori enzima HO, kao i mesto dejstva CORMs u reakciji. CORMs = eng. CO releasing molecules, CO oslobađajući molekuli; HSP = eng. heat shock proteins, proteini toplotnog šoka; ROS = eng. reactive oxygen species, kiseonični slobodni radikali; IL-6 = interleukin 6; IL-10 = interleukin 10; TNF-α = faktor nekroze tumora alfa; IFN-γ = interferon gama; LPS = lipopolisaharid; NO = eng. nitric oxide, azot monoksid; CrMP = hrom mezoporfirin; MnPP = mangan protoporfirin; MnMP = mangan mezoporfirin; ZnPP = cink protoporfirin; SnMP = kalaj mezoporfirin; SnPP = kalaj protoporfirin. Prema: Fang i sar. 2004.

1.4.2. Fiziološke uloge

Najbolje proučene uloge CO se odnose na njegove efekte koje ispoljava u **nervnom sistemu**, a koje zavise od toga da li je sintetisan od strane HO-1 ili HO2. HO-2 je konstitutivno eksprimirana u neuronima olfaktivnog bulbosa, piramidalnim neuronima cerebralne moždane kore i hipokampusa, granularnim ćelijama dentatnog girusa, u neuronima talamusa, hipotalamusa, cerebeluma i moždanog stabla (Parfenova i Leffler 2008), a smatra se da je glavna funkcija zaštita ovih ćelija od lipide peroksidacije indukovane slobodnim hemom. Sa druge strane ekspresija HO-1 je indukovana patološkim stanjima u neuronima širom moždane kore, u piramidalnom sloju hipokampusa, ali takođe i u ne-neuronskim ćelijskim populacijama unutar moždanog stabla, međumozga i cerebeluma (Nitti i sar. 2018).

Fiziološko funkcionisanje sistema sačinjenog od HO/CO u mozgu je esencijalno po pitanju prevencije neurodegenerativnih bolesti, uključujući i Alchajmerovu bolest, Parkinsonovu bolest, i amiotrofičnu lateralnu sklerozu. Kao odraz adaptivnih promena i inicijacije protekcije od strane CO, kod obolelih od Alchajmerove bolesti je pronađena veća ekspresija enzima HO-1 u senilnim plakovima, GFAP+ astrocitima, cerebralnom korteksu i krvnim sudovima cerebrovaskularne mreže (Hettiarachchi i sar. 2014). Smatra se da je uloga ovog protektivnog mehanizma povećana konverzija neurotoksičnog hema u netoksični biliverdin (Schipper i sar. 2009). Protektivna uloga HO-1 je pokazana i u eksperimentalnom modelu autoimunskog encefalomijelitisa, koji predstavlja animalni model multiple skleroze kod ljudi, a ovaj zaključak je donet na osnovu smanjenja zapaljenja u tkivu mozga prilikom primene hemina, dok je upotreba mezoporfirina dovela do suprotnih rezultata (Chora i sar. 2007). Takođe, ispitana je i uloga HO/CO sistema u patogenezi epileptičnih napada, gde se smatra da skoro duplo veća serumska koncentracija CO kod obolelih od rekurentnih febrilnih konvulzija predstavlja protektivni odgovor u cilju smanjenja nepovratnih oštećenja moždanog tkiva koje je uzrokovano konvulzijama (Parfenova i sar. 2012).

1.5. Efekti fizičke aktivnosti na zdravlje

S obzirom da se farmakološka terapija CP/CPPS pokazala kao insuficijentna u velikom broju slučajeva, potreba za nefarmakološkim terapijskim opcijama je sve veća. Jedan od potencijalnih nefarmakoloških pristupa u lečenju ovog sindroma je fizička aktivnost, koja kada je regularna i pravilno dozirana poseduje brojne pozitivne efekte u različitim oboljenjima. Fizička aktivnost podrazumeva svaku vrstu pokreta koja nastaje kontrakcijom skeletnih mišića pri istovremenoj potrošnji energije. Dozirana i planirana fizička aktivnost, jasno definisanog trajanja, intenziteta, tipa i učestalosti na nedeljnom nivou se naziva fizičko vežbanje (Caspersen i sar. 1985).

Poznata i prihvaćena je činjenica da fizička aktivnost i vežbanje pružaju brojne benefite u očuvanju i poboljšanju ljudskog zdravlja tokom celog životnog veka. Sa druge strane, sedentarni način života dokazano nepovoljno utiče na mortalitet i morbiditet od kardiovaskularnih, muskuloskeletnih, metaboličkih, malignih i neuropsiholoških oboljenja (Park i sar. 2020). Fizička aktivnost u cilju unapređenja zdravlja se definiše kao bilo koji oblik fizičke aktivnosti sa niskim rizikom za nastanak povreda koji dovodi do pozitivnih promena homeostatskih varijabli, inicijacije adaptivnih procesa u telu i poboljšanja funkcionalnosti organskih sistema, a koji je istovremeno individualizovan prema godinama, polu, ličnim performansama i opštem zdravstvenom stanju osobe (Warburton i Bredin 2017). Prekomerna, odnosno neadekvatno dozirana fizička aktivnost može biti povezana sa neželjenim efektima po pitanju kardiovaskularnog i muskuloskeletnog sistema i povreda (Johansson i sar. 2022). Dakle, uz adekvatnu pripremu, odgovarajuće okruženje i odgovarajuću vrstu vežbanja, fizička aktivnost dovodi do poboljšanja ličnog zdravstvenog stanja, ali i do postizanja javno-zdravstvenih benefita cele populacije (Haskell i sar. 2007).

1.5.1. Uticaj fizičke aktivnosti na centralni nervni sistem

Rastuća saznanja iz bazičnih i kliničkih istraživanja koja datiraju iz nekoliko prethodnih decenija su obezbedila obećavajuća saznanja o povoljnom uticaju fizičke aktivnosti na brojna neurološka i psihijatrijska oboljenja. Iako se pretpostavlja da su benefiti fizičke aktivnosti po funkciju i strukturu CNS ostvareni uglavnom posredstvom BDNF, smanjenja oksidativnog stresa i ograničenja neuroinflamatornih i neurodegenerativnih procesa CNS, ipak većina ovih mehanizama do danas nije rasvetljena u potpunosti (Morgan i sar. 2015).

Veliki broj studija je ispitivao uticaj fizičke aktivnosti na hipokampus i na procese kojima fizička aktivnost dovodi o poboljšanja kognitivnih funkcija, učenja i pamćenja (Doherty i Forés Miravalles 2019), dok su istovremeni uticaji na starije regione mozga (moždano stablo, bazalne ganglije, hipotalamus) i fiziološke funkcije koje oni regulišu (cirkadijalni ritam, unos hrane, kardiovaskularna regulacija, odgovor na stres) manje ispitani (Arvidson i sar. 2020). Takođe, određeni broj studija je izučavao i neurobiološke efekte fizičke aktivnosti na razvoj anksioznosti, depresije, Alchajmerove bolesti i drugih poremećaja ličnosti (Ströhle 2009). Većina ovih studija je sprovedena na animalnim modelima, s obzirom na etičke probleme po pitanju strukturnog ispitivanja CNS kod ljudi, a cilj je bio rasvetliti morfološke promene u strukturama CNS koje leže u osnovi funkcionalnih promena.

Primećeno je da fizička aktivnost ima povoljan uticaj na raspoloženje i emocionalni status, a to je verovatno posredovano uticajem na dorzalni *nc. raphe* koji je sagrađen od serotonergičkih neurona koji regulišu raspoloženje, anksioznost, depresiju, odgovor na stres i emocionalni status svojim bogatim projekcijama ka amigdali, hipokampusu i cerebralnoj kori (Arnold i sar. 2020). Pored serotonergičke transmisije, hronična fizička aktivnost ima uticaj i na noradrenergičku transmisiju u CNS koja potiče iz *locus coeruleus*, jedro moždanog stabla koje reguliše pažnju, uzbuđenost i povećava budnost u odgovoru na stres (Liu i sar. 2021). Povoljni efekti vremenski isplanirane fizičke aktivnosti na održavanje energetskeg balansa u organizmu, održavanje ravnoteže između anaboličkih i kataboličkih energetskih procesa, stabilizaciju autonomnog nervnog sistema i sinhronizaciju cirkadijalnih ritmova se najverovatnije ostvaruju putem modulatornog efekta na hipotalamus (Kramer i sar. 2000). Uticaj na cirkadijalni sistem, a pre svega na suprahijazmatsko jedro hipotalamusa objašnjava povoljne efekte vežbanja na procese u organizmu kojima ovo jedro orkestrira, a oni se odnose na: lučenje hormona, ciklus budnost/spavanje, frekvenciju srca, sitost i glad i promene u ponašanju. Sa druge strane preventivno dejstvo fizičkog vežbanja na razvoj depresije i kognitivnih poremećaja se takođe može objasniti dejstvom na cirkadijalni sistem u smislu regulacije sinteze kortizola, noradrenalina i melatonina (Hughes i sar. 2021). Preventivni uticaj fizičke aktivnosti na razvoj anksioznosti, depresije i Alchajmerove bolesti se povezuje sa povoljnim efektom vežbanja na usklađenost cirkadijalnog ritma spavanja i budnosti (Alvaro i sar. 2013).

Preventivno dejstvo hronične fizičke aktivnosti na razvoj depresije, kao i povoljan uticaj iste na lečenje već razvijene bolesti se objašnjava modulatornim efektom fizičke aktivnosti na HPA osovinu (Hu i sar. 2020). Poznato je da određeni broj obolelih od depresije ispoljava povišene serumske koncentracije glukokortikoida, te je atenuacija aktivnosti HPA osovine fizičkom aktivnošću glavni mehanizam njenog antidepresivnog dejstva (Pariante i Lightman 2008). Hronična fizička aktivnost u eksperimentalnim uslovima dovodi do adaptivnih promena HPA osovine u smislu povećanja mase srži nadbubrežne žlezde uz smanjenje serumskih nivoa ACTH i glukokortikoida, a dodatno smanjena je stresna reakcija i manja je aktivnost HPA osovine prilikom izlaganja životinja koje su prethodno trenirale novim stresnim stimulusima poput elektrošok stimulusa ili drugim eksperimentalnim stresnim stimulusima (buka, promena kaveza, itd.) (Dishman i sar. 1998). Fizička aktivnost isplanirana po tipu tačno zadatih motornih veština dovodi do smanjenja bradikinezije i tremora kod obolelih od Parkinsonove bolesti (Bhalsing i sar. 2018).

Usled povećane potrebe tkiva sa kiseonikom tokom fizičke aktivnosti, dolazi do povećane sinteze ROS, čije su posledice ekstenzivno izučavane tokom prethodnih 40 godina (Dillard i sar. 1978). Skorašnja istraživanja na biohemijskom i celularnom nivou su pokazala da je glavna uloga povećane sinteze ROS tokom fizičke aktivnosti prevashodno u regulaciji fizioloških adaptacionih mehanizama (Gomez-Cabrera i Domenech 2007). Druge studije su dokazale da fizička aktivnost ima povoljne efekte u pogledu povećanja kapaciteta antioksidativne zaštite u ljudskom organizmu (Assar i sar. 2013). Tokom ispitivanja efekata hronične aerobne fizičke aktivnosti na oksidativni stres, došlo se do zaključka da se zapaža fenomen hormeze. Naime, visoke i niske doze fizičke aktivnosti imaju različiti efekat, jer efekat povećane produkcije ROS tokom fizičke aktivnosti zavisi od tipa i intenziteta fizičke aktivnosti, kao i individualnih karakteristika pojedinaca (Powers et al. 2020).

1.5.2. Fizička aktivnost u eksperimentalnim uslovima

Eksperimentalno ispitivanje fizičke aktivnosti upotrebom definisanih modela sa jasnim protokolom fizičke aktivnosti je zlatni standard u ispitivanju sveobuhvatnog uticaja fizičke aktivnosti na sve organske sisteme. Trening kod životinja kod kojih je eksperimentalno razvijena određena bolest pruža fundamentalni značaj u rasvetljavanju mehanizama modulatornog efekta fizičke aktivnosti na podložnost ka razvoju, tok i oporavak od određene bolesti (Bei i sar. 2021). Upotreba eksperimentalnih životinja takođe omogućava preciznost u donošenju zaključaka, jer se eliminišu genetski uticaji, pridruženi uticaji medikamentoznog tretmana bolesti i ostali faktori spoljašnje sredine, bolja je kontrola unosa hrane, a omogućava se analiza koja zahteva invazivno uzorkovanje tkiva i organa koje se kod humanih subjekata ne može izvesti iz etičkih razloga (Poole i sar. 2020). Dakle, primat u ispitivanju efekata fizičke aktivnosti na brojna patološka stanja imaju animalne studije, te je jasan njihov značaj u cilju razvoja nefarmakoloških modaliteta lečenja poput vežbanja, uz istovremenu mogućnost da se primenom eksperimentalnih protokola odredi najpogodniji tip, trajanje i frekvencija fizičke aktivnosti (Angelis i sar. 2017). Eksperimentalne studije sa jasno definisanim protokolima treninga pružaju visok nivo translacije rezultata na humanu populaciju (Poole i sar. 2020).

Najčešće upotrebljavani modeli hronične fizičke aktivnosti kod miševa i pacova su plivanje, trening izdržljivosti, otpora ili velikog intenziteta na tredmilu i dobrovoljno trčanje na točku. Odabir najadekvatnijeg modela eksperimentalne fizičke aktivnosti zavisi od toga na koja pitanja istraživač želi da odgovori u svojoj studiji i koju animalnu vrstu koristi u svom istraživanju. Upotreba tredmil aparata za male eksperimentalne životinje je metoda izbora za procenu fizioloških, biohemijskih, bihejvioralnih i molekularnih odgovora na akutnu ili hroničnu fizičku aktivnost (Wang i sar. 2020). Životinjske vrste koje se mogu uključiti u ovu vrstu istraživanja su razne, ali je prema vodičima najbolji izbor pacov (Hrnčić 2015). Za razliku od drugih eksperimentalnih metoda, tredmil aparat omogućava izračunavanje maksimalne potrošnje kiseonika (VO_{2max}) i precizno podešavanje intenziteta, trajanja i frekvencije fizičke aktivnosti uz tačno određivanje intenziteta rada koji životinja ulaže pri treningu (Brooks i White 1978). Trčanje na tredmilu zahteva intenzivno angažovanje metaboličkih procesa, povećava VO_{2max} , te ovakav trening dovodi do adaptivnih procesa u skoro svim sistemima organa (Bedford i sar. 1979). Ipak, ovaj metod ima i svoje izazove, a prvi je forsirana priroda protokola koja podrazumeva upotrebu negativne stimulacije u vidu neprijatnog stimulusa (električni šok malog intenziteta ili vazduh pod visokim pritiskom) bez mogućnosti povrede životinje. Postoji i pozitivna stimulacija u vidu zatamnjenja na jednom kraju trake koje je stimulus pacovima da ka tom delu trče (Hrnčić i sar. 2012). Tredmil aparat mora biti dobro dizajniran i da omogućava dobru atrakciju šapa za traku za trčanje i da postoji veliki opseg za podešavanje brzine kretanja trake i nagiba tokom treninga (Rubin i Mickle 1982). Upotreba tredmil aparata kod pacova predstavlja visoko translacioni model hronične aerobne fizičke aktivnosti (Bond i sar. 2019).

1.5.3. Uloga fizičke aktivnosti u modulaciji bola

CP/CPPS kao glavni simptom ima hronični bol, te je kupiranje ovog simptoma uz što manje neželjenih efekata osnovni cilj i farmakoloških i nefarmakoloških terapijskih pristupa. Ideja da fizička aktivnost može da deluje antinociceptivno datira odavno, ali je još uvek dvosmisleno pitanje da li postoji fizičkom aktivnošću indukovana analgezija. Postoje studije koje pokazuju analgetski efekat akutne i hronične fizičke aktivnosti, ali i one koje pokazuju pronociceptivni učinak fizičke aktivnosti (Law i Sluka 2017).

Najnovije preporuke u terapiji hroničnog bola u fokusu imaju neopioidne farmakološke agense i nefarmakološke tretmane, uključujući i doziranu i planiranu fizičku aktivnost, čime se ističe značaj fizičke aktivnosti u modulaciji bola (Geneen i sar. 2017). Modulatorni efekat fizičke aktivnosti u humanoju populaciji je pokazan u istraživanjima na zdravim dobrovoljcima gde je pokazano da fizička aktivnost smanjuje prag bola pri eksperimentalno izazvanim bolnim stimulacijama kažiprsta ili zubne pulpe, a dokazan je isti efekat kod bolesnika koji pate od različitih hroničnih bolnih stanja kao što su osteoartritis, miofascijalni sindrom, fibromijalgija, ili sindrom hroničnog umora (Law i Sluka 2017). Sa druge strane, postoje i manje ohrabrujući podaci koji govore o pronociceptivnom efektu fizičke aktivnosti kod pacijenata sa fibromijalgijom, što predstavlja prepreku u primeni vežbanja u cilju lečenja ovog stanja (Busch i sar. 2011). Kontradiktornost u rezultatima je posledica različitih protokola vežbanja, različitih mehanizama nastanka bola u različitim bolestima, kao i postojanju različitih mehanizama na različitim nivoima CNS koji mogu modulirati nocicepciju, kao i upotrebe različite vrste stimulusa pri ispitivanju (duboki pritisak, toplota, hladnoća, hemijske materije, itd.) (Lima i sar. 2017). Naime, glavna modulatorna područja CNS koja se vezuju za modulaciju nocicepcije se odnose na rostralno ventromedijalno područje produžene moždine (eng. rostral ventromedial medulla, RVM), *nc. raphe*, periakveduktalnu sivu masu i određena područja moždane kore (Mercer Lindsay i sar. 2021), a u zavisnosti od toga koja vrsta neurotransmisije dominira u ovim regionima mozga, nastaje pro- ili anti-nociceptivni efekat fizičke aktivnosti. Generalno prihvaćeno stanovište, koje je bazirano na rezultatima iz animalnih studija, je da aktivacija NMDA receptora glutatomom u RVM dovodi do hiperalgezije indukovane fizičkom aktivnošću (Sluka i sar. 2012), dok serotonergička neurotransmisija i ona posredovana opioidima u ovom regionu CNS dovodi do analgetskog efekta fizičke aktivnosti (Da Silva Santos i Galdino 2018). Dakle, predominacija određenog tipa neurotransmisije u CNS tokom fizičke aktivnosti kod humanih subjekata zavisi od protokola vežbanja, tipa, trajanja i frekvencije fizičke aktivnosti, dok se ove razlike kod životinja u animalnim studijama vezuju za vrstu protokola eksperimentalnog treninga, u smislu dobrovoljnog ili forsiranog (Lima i sar. 2017).

Uprkos ovako kontradiktornim saznanjima, mnogo je veći broj epidemioloških, kliničkih i eksperimentalnih studija koje dokazuju benefite fizičke aktivnosti u tretmanu hroničnog bola, u odnosu na one koje tvrde suprotno (Geneen i sar. 2017). Najbitnije saznanje se odnosi na preventivni uticaj fizičke aktivnosti na razvoj hroničnog bola, s obzirom da je pokazano da osobe koje su podvrgnute protokolu hroničnog vežbanja u prospektivnom praćenju pokazuju nižu šansu za razvoj različitih hroničnih bolnih stanja, u odnosu na sedentarne pojedince (Landmark i sar. 2011). Animalne studije su dokazale da pretretman hroničnom fizičkom aktivnošću dovodi do prevencije nastanka hiperalgezije u eksperimentalnim modelima hroničnog neuropatskog bola (Sluka i sar. 2013).

Efekat hronične aerobne fizičke aktivnosti na razvoj i modulaciju hroničnog neuropatskog bola kod humanih subjekata, kao ni na animalnim modelima CP/CPPS do sada nije ispitivan.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije bili su da se kod životinja sa eksperimentalno indukovanim CP/CPPS:

1. Ispitaju elektroencefalografske i bihevioralne karakteristike epileptičnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana.
2. Utvrde promene ponašanja povezane sa anksioznošću i depresijom, kao i promene u kognitivnim sposobnostima.
3. Ispitaju biohemijski parametri oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i nivo proinflammatoryh citokina (IL-1 β i IL-6) u serumu, prostati, hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu, kao i ekspresija proteina ICAM-1 u pomenutim moždanim strukturama.
4. Utvrde nivo hormona kortikosterona i testosterona u serumu.
5. Ispitaju procesi neurogeneze i gliogeneze u hipokampusu imunohistochemijskom analizom ekspresije markera proliferacije (Ki-67) i nezrelih neurona (DCX), odnosno proteinskog markera astrocita (GFAP), kao i da se utvrde promene u ekspresiji markera inhibitornih interneurona (PV).
6. Utvrde efekti modulacije nivoa CO, primenom CO donora CORM-A1, na elektroencefalografske i bihevioralne promene.
7. Ispitaju efekti hronične aerobne fizičke aktivnosti na tredmilu na elektroencefalografske i bihevioralne promene.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni odrasli mužjaci pacova soja *Wistar albino*, telesne mase 250-350g i starosti 3 meseca na početku eksperimenta. Životinje su dopremljene iz Vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu, a potom su čuvane u transparentnim kavezima od polikarbonata (dimenzije: 55x35x30cm) koji su bili obloženi piljevinom za laboratorijske životinje.

Standardni ambijentalni uslovi boravka životinja su podrazumevali održavanje temperature na 22 ± 2 °C i vlažnosti vazduha na $55 \pm 5\%$, uz smenjivanje perioda u ciklusu svetlost-tama na 12 h sa početkom svetlog perioda u 08:00h. Period aklimacije na pomenute ambijentalne uslove je trajao 7 dana. Tokom celokupnog trajanja eksperimenata, životinjama su voda i hrana bili dostupni *ad libitum*.

Svi sprovedeni eksperimentalni postupci su bili 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).

3.2. Eksperimentalni dizajn

3.2.1. Eksperimentalni model CP/CPPS: funkcionalne, bihevioralne, biohemijske i imunohistohemijske promene u CNS-u. Podložnost razvoju hiperekscitabilnosti.

Nakon sedmodnevnog perioda aklimacije, pacovi su nasumično podeljeni u dve grupe:

1. kontrolna (Sham, n=26);
2. eksperimentalna (CP/CPPS, n=26).

Na početku eksperimenta je izvršena operacija (označeno kao nulti dan), pri čemu je kontrolna grupa životinja tretirana intraprostatičnom injekcijom sterilnog 0,9% NaCl, dok je CP/CPPS u eksperimentalnoj grupi indukovana intraprostatičnom injekcijom sterilnog 3% λ-karagenina (mukopolisaharid iz ćelijskog zida crvenih algi).

Evaluacija dinamike razvoja CP/CPPS (n=6 po grupi) podrazumevala je praćenje:

- dnevnog unosa hrane,
- dnevnog prirasta u telesnoj masi, i
- praga bola na mehaničku draž.

Dnevni unos hrane i dnevni prirast u telesnoj masi su beleženi 2 i 1 dan pre intraprostatične injekcije, kao i tokom svih 7 postoperativnih dana.

U cilju merenja praga bola na mehaničku draž u regiji kože skrotuma, korišćen je elektronski von Frey esteziometar (*eng. electronic von Frey aesthesiometer, eVF*). Dva dana pre intraprostatične injekcije, pacovi su adaptirani na merenje praga bola, a potom je isti utvrđivan nekoliko puta u različitim vremenskim intervalima: a) pre intraprostatične injekcije: 2. i 1. preoperativnog dana; b) nakon intraprostatične injekcije: 2., 3. i 7. postoperativnog dana.

Procena ponašanja povezanog sa anksioznošću (n=6 po grupi) izvršena je primenom baterije bihevioralnih testova (Slika 3.2.1.) koju su činili:

- test otvorenog polja (*eng. open field test, OF*),
- test svetlo/tama (*eng. light/dark test, L/D*), i
- uzdignuti krstasti lavirint (*eng. elevated plus maze test, EPM*).

Ovim testovima su životinje podvrgnute 2., 3. i 7. postoperativnog dana (Slika 3.2.1.).

Procena ponašanja povezanog sa depresijom i kognitivnim sposobnostima (n=6 po grupi) je izvršena 7 postoperativnog dana primenom sledećih testova:

- test forsiranog plivanja (*eng. forced swimming test, FST*), i
- test modifikovanog uzdignutog krstastog lavirinta (*eng. modified elevated plus maze test, mEPM*).

Sedmog postoperativnog dana, nakon završetka bihevioralnih testova, sve životinje su upotrebom specijalne giljotine za pacove žrtvovane dekapitacijom na standardan način.

Nakon žrtvovanja uzorkovani su mozak, prostata i krv iz trupa sa mesta dekapitacije.

Mozgovi su podeljeni na hemisfere, te su randomizacijom iz jedne hemisfere bile izolovane pojedinačne strukture mozga: hipokampus, talamus i deo frontalnog korteksa, dok je preostala hemisfera služila za imunohistohemijsku analizu.

Iz krvi je na standardan način izolovan serum.

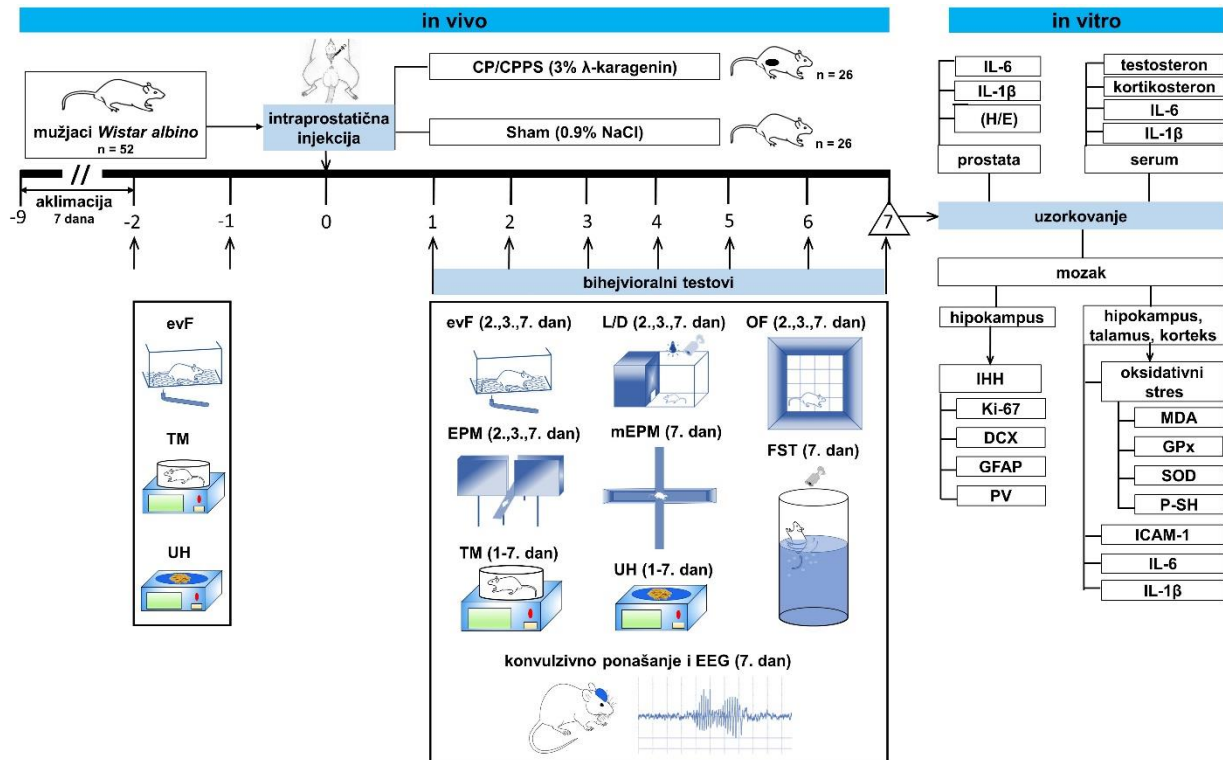
U navedenim uzorcima su učinjene sledeće analize (Slika 3.2.1.):

- merenje koncentracije hormona testosterona i kortikosterona u serumu,
- merenje koncentracije IL-1 β i IL-6 u prostati, serumu i strukturama mozga,
- analiza parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u strukturama mozga: koncentracija MDA i P-SH, kao i aktivnost enzima: SOD i GPx,
- merenje ekspresije ICAM-1 proteina u strukturama mozga,
- imunohistohemijska analiza ekspresije markera neuro i gliogeneze: proteina Ki-67, DCX i GFAP, kao i markera inhibitornih interneurona: PV,
- histološka analiza prostate bojenjem hematoksilin-eozin (H/E).

Eksperimentalni dizajn ovih oglada prikazan je shematski na **Slici 3.2.1.**

Procena podložnosti razvoju hiperekscitabilnosti izvršena je analizom bihevioralnih i elektroencefalografskih (EEG) karakteristika konvulzivnog ponašanja izazvanog intraperitonealnom administracijom subkonvulzivne doze lindana (4 mg/kg, i.p.).

Tako su bile formirane posebne eksperimentalne grupe (Slika 3.2.1.): **Sham+L4** (n=8) i **CP/CPPS+L4** (n=8).



Slika 3.2.1. Eksperimentalni dizajn: Analiza funkcionalnih, bihejvioralnih, biohemijskih i imunohistohemijskih promena CNS u eksperimentalnom modelu CP/CPPS.

Devet dana pre operacije (-9) je započeta aklimacija odraslih mužjaka pacova soja Wistar albino (n=52) u trajanju od 7 dana. Dva (-2) dana pre operacije je započeto merenje dnevnog prirasta u telesnoj masi (TM), kao i dnevnog unosa hrane (UH) i trajalo je do sedmog postoperativnog dana (7). Adaptacija na merenje skrotalnog praga bola na mehaničku draž upotrebom elektronskog von Fray esteziometra (evF) je učinjena dva (-2) i jedan (-1) dan pre operacije. U zavisnosti od vrste intraprostatične injekcije tokom operacije (0), pacovi su nasumično raspoređeni u dve grupe: Sham (intraprostatična injekcija 0,9% NaCl; n=26) i CP/CPPS (intraprostatična injekcija 3% λ-karagenina; n=26). U postoperativnom periodu su sprovedeni bihejvioralni testovi. Drugog (2), trećeg (3) i sedmog (7) postoperativnog dana je meren skrotalni prag bola na mehaničku draž upotrebom evF i ispitano je ponašanje povezano sa anksioznošću upotrebom testa svetlo/tama (L/D), testa otvorenog polja (OF) i uzdignutog krstastog lavirinta (EPM). Sedmog (7) postoperativnog dana je ispitano ponašanje povezano sa depresijom upotrebom testa forsiranog plivanja (FST), ispitane su kognitivne sposobnosti upotrebom testa modifikovanog uzdignutog krstastog lavirinta (mEPM), a utvrđene su i bihejvioralne i EEG manifestacije konvulzija izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana. Sedmog (7) postoperativnog dana, nakon završetka bihejvioralnih testova, pacovi su žrtvovani i uzorkovani su prostata, krv i mozak. Iz krvi je izolovan serum, dok su iz mozgovog izolovani hipokampus, talamus i frontalni korteks. Biohemijskim metodama su izmereni nivoi interleukina 1 beta (IL-1β) i interleukina 6 (IL-6) u prostati, serumu i strukturama mozga; izmerene su koncentracije kortikosterona i testosterona u serumu; u strukturama mozga je određena koncentracija i aktivnost parametara oksidativnog stresa: malondialdehid (MDA), proteinske tiol grupe (P-SH), superoksid dismutaza (SOD) i glutation peroksidaza (GPx), a određena je i ekspresija ICAM-1 proteina u strukturama mozga. Prostatae su analizirane nakon bojenja hematoksilin-eozinom (H/E). Imunohistohemijskom metodom je analizirana ekspresija markera neuro i gliogeneze: Ki-67, dabl kortina (DCX), i glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP), kao i markera inhibitornih interneurona parvalbumina (PV).

3.2.2. Modulacija nivoa ugljen monoksida (CO): efekat na etiopatogenezu CP/CPPS

U svrhu ispitivanja efekata modulacije nivoa ugljen monoksida (CO) na bihevioralne i elektrofiziološke promene kod životinja sa CP/CPPS korišćen je sporooslobađajući donor CO, CORM-A1 (*eng. carbon monoxide (CO) releasing molecule*).

Životinje su tretirane intraprostatičnom injekcijom sterilnog 0,9% NaCl (Sham, n=28) ili intraprostatičnom injekcijom sterilnog 3% λ -karagenina (CP/CPPS, n=28). Počevši od prvog postoperativnog dana, pa sve do sedmog postoperativnog dana, jednoj polovini životinja iz ove dve grupe je svakodnevno intraperitonealnom injekcijom administriran CORM-A1 u dozi od 2 mg/kg, a drugoj polovini njegov rastvarač (fiziološki rastvor sa puferom fosfata, *eng. phosphate-buffered saline, PBS*). Na taj način formirane su grupe (n=14 u svakoj):

1. Sham-PBS;
2. Sham-CORM;
3. CP/CPPS-PBS;
4. CP/CPPS-CORM.

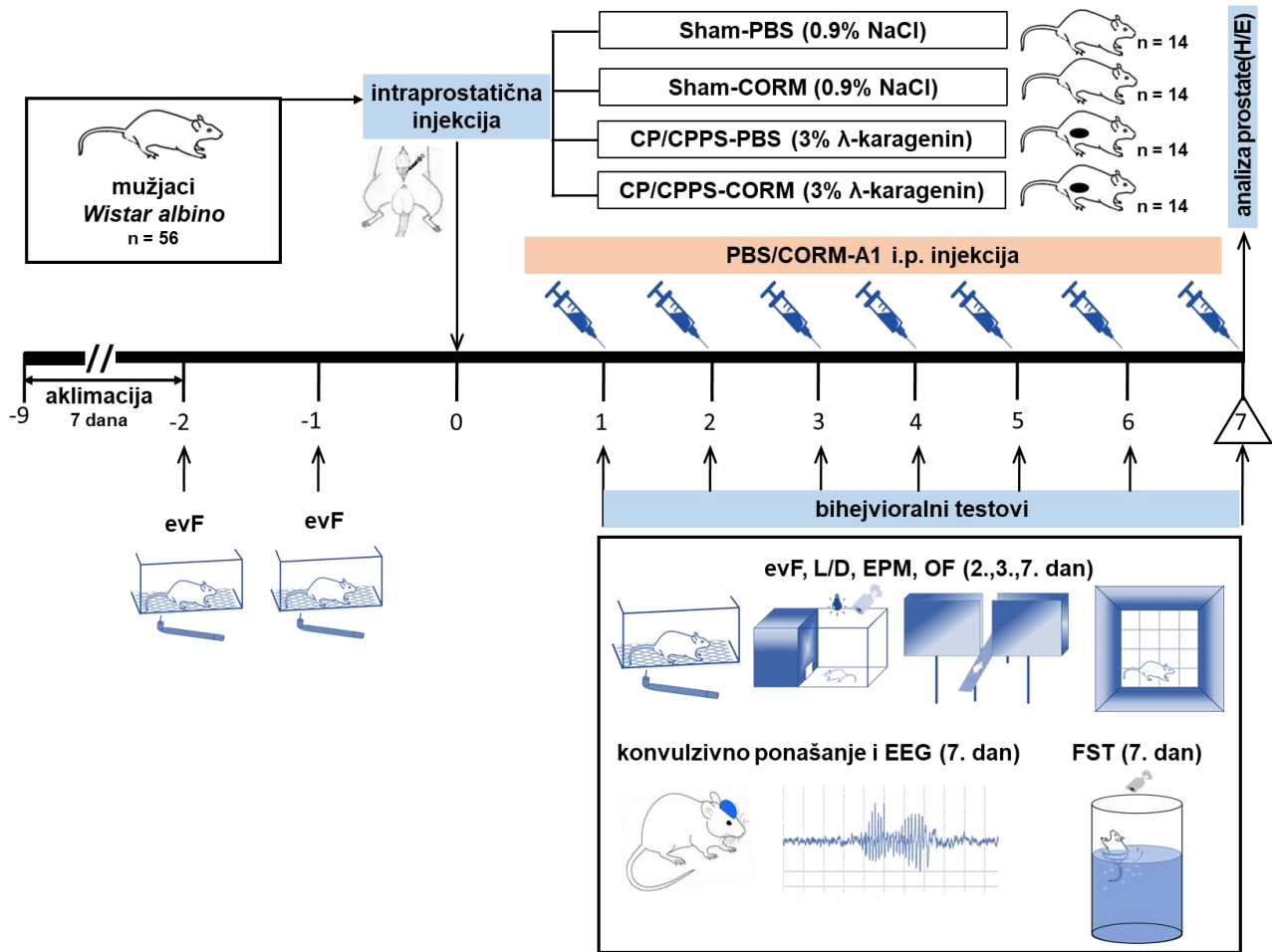
U daljem toku eksperimenta, životinje iz svih grupa su bile podvrgnute bihevioralnim testovima, koji su bili podeljeni u dve baterije (Slika 3.2.2.).

Jedna kohorta životinja iz svake od ovih grupa (n=6 po grupi) korišćena je za evaluaciju dinamike razvoja CP/CPPS merenjem praga bola na mehaničku draž, kao i za procenu ponašanja povezanog sa anksioznošću (baterija testova: OF, L/D, EPM) i ponašanja povezanog sa depresijom (FST).

Druga kohorta životinja iz svake od ovih grupa (n=8 po grupi) korišćena je za analizu bihevioralnih i EEG karakteristika konvulzivnog ponašanja izazvanog intraperitonealnom administracijom subkonvulzivne doze lindana (4 mg/kg, i.p.), te su bile formirane eksperimentalne grupe: Sham-PBS+L4, Sham-CORM+L4, CP/CPPS-PBS+L4 i CP/CPPS-CORM+L4.

Nakon završetka testiranja, životinje su žrtvovane i uzrokovane su prostate za histološku analizu bojenjem hematoksilin-eozinom (H&E).

Ovaj eksperimentalni dizajn prikazan je shematski na Slici 3.2.2.



Slika 3.2.2. Eksperimentalni dizajn: Efekat modulacije nivoa ugljen monoksida (CO) na etiopatogenezu CP/CPPS.

Aklimacija odraslih mužjaka pacova soja Wistar albino ($n=56$) trajala je od devetog (-9) do drugog (-2) preoperativnog dana. Adaptacija na merenje skrotalnog praga bola na mehaničku draž upotrebom evF je učinjena dva (-2) i jedan (-1) dan pre operacije. U zavisnosti od vrste intraprostatice injekcije tokom operacije (0) i postoperativnog tretmana, pacovi su nasumično raspoređeni u četiri grupe: Sham-PBS (intraprostatica injekcija 0,9% NaCl i svakodnevna postoperativna administracija PBS, 0,1 mL/kg; $n=14$); Sham-CORM (intraprostatica injekcija 0,9% NaCl i svakodnevna postoperativna administracija CORM-A1, 2mg/kg; $n=14$); CP/CPPS-PBS (intraprostatica injekcija 3% λ-karagenina i svakodnevna postoperativna administracija PBS, 0,1 mL/kg; $n=14$); CP/CPPS-CORM (intraprostatica injekcija 3% λ-karagenina i svakodnevna postoperativna administracija CORM-A1, 2mg/kg; $n=14$). Od prvog, pa sve do sedmog postoperativnog dana, životinjama je intraperitonealnom injekcijom (i.p.) administriran PBS ili CORM-A1 u dozi od 2 mg/kg/dn i sprovedeni su bihevioralni testovi. Drugog (2), trećeg (3) i sedmog (7) postoperativnog dana je meren skrotalni prag bola na mehaničku draž upotrebom evF i ispitano je ponašanje povezano sa anksioznošću upotrebom testova svetlo/tama (L/D), otvorenog polja (OF) i uzdignutog krstastog lavirinta (EPM). Sedmog (7) postoperativnog dana je ispitano ponašanje povezano sa depresijom upotrebom testa forsiranog plivanja (FST), a utvrđene su i bihevioralne i EEG manifestacije konvulzija izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana. Sedmog (7) postoperativnog dana, nakon završetka bihevioralnih testova, pacovi su žrtvovani i uzorkovane su prostate i analizirane nakon bojenja hematoksilin-eozinom (H/E).

3.2.3. Hronična aerobna fizička aktivnost na tredmilu: uticaj na etiopatogenezu CP/CPPS

U svrhu ispitivanja efekata hronične aerobne fizičke aktivnosti na tredmilu na elektrofiziološke i bihevioralne promene kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS, korišćen je tredmil aparat za male eksperimentalne životinje (NeuroSciLaBG-Treadmill, Elunit, Beograd, Srbija). Tredmil aparat se sastoji od jedne pokretne trake i četiri pleksiglasom-odvojena kompartmana za trčanje. Na početnom (zadnjem) kraju trake je električna (negativna) stimulacija u vidu žica koje su isporučivale elektrošok malog intenziteta od 0,2 mA za životinje koje se tokom treninga ne kreću. Na završnom (prednjem) kraju trake je traka za zatamnjenje prostora koja je činila potkrepljenje za trčanje životinja (pozitivna stimulacija). Životinje su izbegavajući elektrošokove, negativnu stimulaciju, trčale ka zatamnjenom prostoru, pozitivnoj stimulaciji, nasuprot pravca kretanja trake tredmil aparata. Softverski je bio definisan protokol kretanja trake (brzina i vreme kretanja) i nagib trake koji je tokom trajanja eksperimenta iznosio 0°.

Sve životinje su najpre adaptirane na tredmil traku i učene da trče na traci tokom 3 uzastopna dana uz protokol kretanja trake: vreme kretanja: 10 min; brzina kretanja: 10 m/min. Tokom trodnevnog perioda adaptacije životinje su naučile da trče u pravcu pozitivne stimulacije u potpunosti izbegavajući negativnu stimulaciju.

Životinje (n=56) koje su uspešno završile adaptaciju na tredmil aparat, podeljene su nasumično u grupu fizički aktivnih životinja (FA, n=26) i grupu sedentarnih životinja (SED, n=26). Fizički aktivne (FA) životinje su bile podvrgnute protokolu treninga koji je trajao 30 uzastopnih dana, a podrazumevao je sledeći protokol kretanja trake: vreme kretanja trake od 30 min dnevno; brzina kretanja trake od 20 m/min. Maksimalna stabilizacija laktata u krvi (*eng. maximal lactate steady state*, MLSS) predstavlja ravnotežu brzine produkcije i eliminacije laktata, a ostvaruje se pri brzini kretanja trake od 20 m/min (Almeida i sar. 2012, Hrcic i sar. 2013), te se trening pri ovoj brzini trake u trajanju od 30 uzastopnih dana smatra hroničnim aerobnim treningom. Sedentarne (SED) životinje su 30 uzastopnih dana provodile u tredmilu po 30 min dnevno pri brzini kretanja trake od 0 m/min.

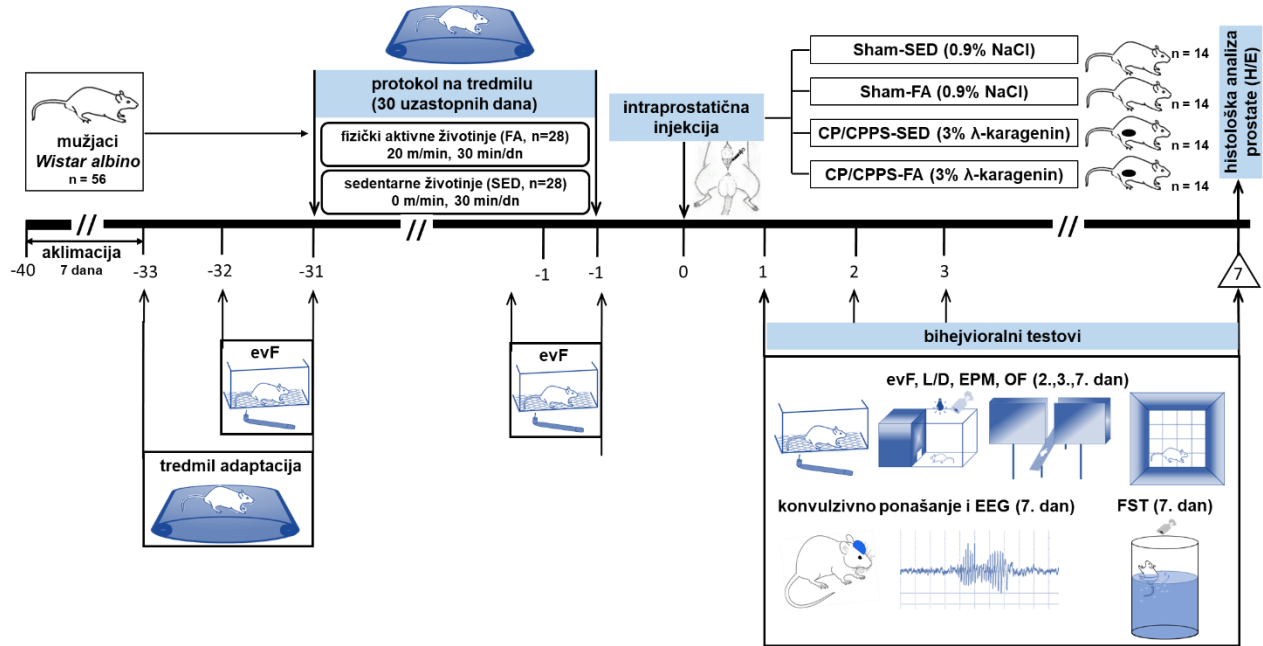
Jedan dan nakon završetka opisanog protokola na tredmilu, tj. trideset prvog dana eksperimenta, životinje su podvrgnute operaciji. Tom prilikom je jedna polovina životinja iz svake od ove dve grupe (FA i SED) bila tretirana intraprostatičnom injekcijom sterilnog 3% λ -karagenina, a druga polovina intraprostatičnom injekcijom sterilnog 0,9% NaCl. Na taj način formirane su sleće grupe (Slika 3.2.3., n=14 u svakoj):

1. sedentarna kontrolna grupa (Sham-SED, n=14);
2. fizički aktivna kontrolna grupa (Sham-FA, n=14);
3. sedentarna eksperimentalna grupa (CP/CPPS-SED, n=14);
4. fizički aktivna eksperimentalna grupa (CP/CPPS-FA, n=14).

Jedna kohorta životinja iz svake od ovih grupa (n=6 po grupi) korišćena je za evaluaciju dinamike razvoja CP/CPPS merenjem skrotalnog praga bola na mehaničku draž, kao i za procenu ponašanja povezanog sa anksioznošću (baterija testova: OF, L/D, EPM) i ponašanja povezanog sa depresijom (test FST). Nakon završetka testova, životinje su žrtvovane i uzorkovane su prostate za histološku analizu bojenjem hematoksilin-eozinom (H/E).

Druga kohorta životinja iz svake od ovih grupa (n=8 po grupi) korišćena je za analizu bihevioralnih i EEG karakteristika konvulzivnog ponašanja izazvanog intraperitonealnom administracijom subkonvulzivne doze lindana (4 mg/kg, i.p.), te su bile formirane eksperimentalne grupe: Sham-SED+L4, Sham-FA+L4, CP/CPPS-SED+L4 i CP/CPPS-FA+L4.

Ovaj eksperimentalni dizajn prikazan je shematski na Slici 3.2.3.



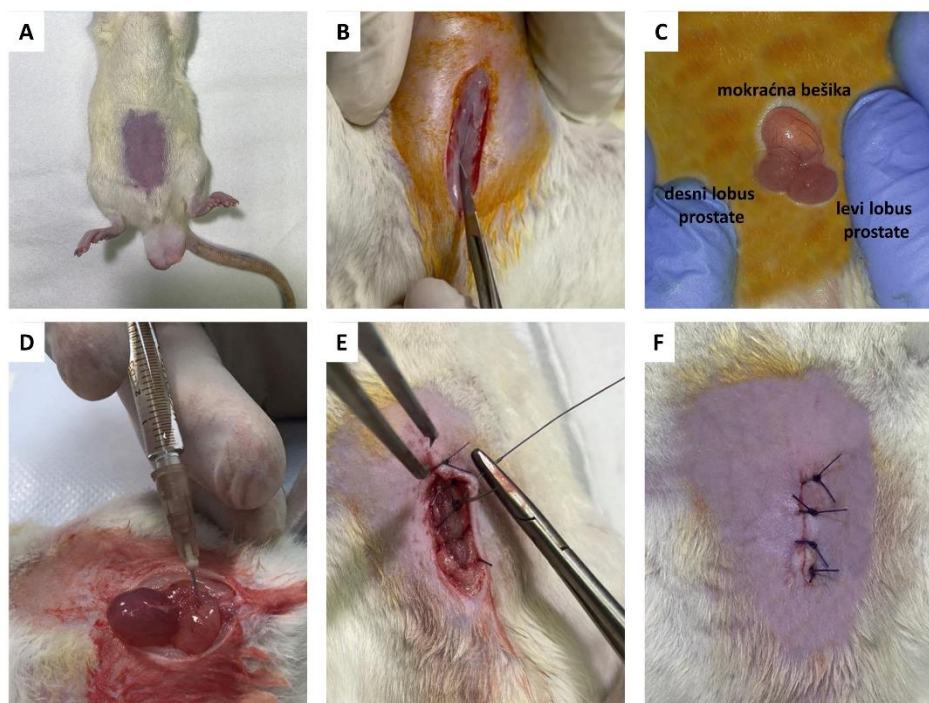
Slika 3.2.3. Eksperimentalni dizajn: Efekat hronične aerobne fizičke aktivnosti na bihevioralne i elektrofiziološke promene kod životinja sa CP/CPPS.

Od četrdesetog (-40) do trideset trećeg (-33) preoperativnog dana je sprovedena sedmodnevna aklimacija životinja (n=56). Od trideset trećeg (-33) do trideset prvog (-31) preoperativnog dana su životinje adaptirane na tredmil (10 min/dn, brzina trake: 10 m/min), dok su trideset drugog (-32) i trideset prvog (-31) preoperativnog dana životinje adaptirane na merenje skrotalnog praga bola na mehaničku draž. U zavisnosti od protokola na tredmil traci od trideset prvog (-31) do prvog (-1) preoperativnog dana, životinje su podeljene na: fizički aktivne (FA, 30 uzastopnih dana, 30 min/dn, brzina: 20 m/min) i sedentarne (SED, 30 uzastopnih dana, 30 min/dn, brzina: 0 m/min). Zavisno od tretmana na operaciji (0) i preoperativnog tretmana na tredmilu, formirane su grupe: Sham-SED (intraprostatična injekcija 0,9% NaCl i preoperativni sedentarni protokol na tredmilu; n=14); Sham-FA (intraprostatična injekcija 0,9% NaCl i preoperativni fizički aktivni protokol na tredmilu; n=14); CP/CPPS-SED (intraprostatična injekcija 3% λ-karagenina i preoperativni sedentarni protokol na tredmilu; n=14); CP/CPPS-FA (intraprostatična injekcija 3% λ-karagenina i preoperativni fizički aktivni protokol na tredmilu; n=14). Drugog (2), trećeg (3) i sedmog (7) postoperativnog dana je meren skrotalni prag bola na mehaničku draž i ispitano je ponašanje povezano sa anksioznošću upotrebom testova svetlo/tama (L/D), otvorenog polja (OF) i uzdignutog krstastog lavirinta (EPM). Sedmog (7) postoperativnog dana je ispitano ponašanje povezano sa depresijom upotrebom testa forsiranog plivanja (FST), a utvrđene su i bihevioralne i EEG manifestacije konvulzija izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana. Sedmog (7) postoperativnog dana, nakon završetka bihevioralnih testova, pacovi su žrtvovani i uzorkovane su prostate i ispitane su histološki bojenjem hematoksilin-eozin (H/E).

3.3. Eksperimentalne metode

3.3.1. Indukcija CP/CPPS

Indukcija eksperimentalnog CP/CPPS je sprovedena u skladu sa procedurom koja je opisana u literaturi (Radhakrishnan i Nallu 2009, Zeng i sar. 2014) uz poštovanje principa asepse i antiseptike. Pacovima je intraperitonealno administriran anestetik natrijum tiopental (40 mg/kg, i.p., Thiopental®, Panpharma, Francuska), a potom je koža donje polovine prednjeg trbušnog zida i skrotuma obrijana. Pacovi su potom fiksirani u ležećem položaju na podlozi za zagrevanje koja je ispunjena cirkulišućom vodom i koža buduće hirurške regije je dezinfikovana trostrukom aplikacijom etanola (70% v/v, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija) i jednokratnom aplikacijom rastvora joda (Povidon jod HF 10%, Hemofarm, Vršac, Srbija). U cilju smanjenja postoperativnog bola i prevencije nastanka senzitivizacije regije koja okružuje ranu, subkutanom injekcijom je u budućoj hirurškoj regiji aplikovan 1 mL lokalnog anestetika (Lidokain 2%-adrenalin, 40mg/2mL+0.025mg/2mL, Galenika a.d. Beograd, Srbija). U cilju ekspozicije oba ventralna lobusa prostate, načinjena je 1-1,5 cm duga incizija donjeg dela trbušnog zida u mediosagitalnoj liniji. Upotrebom sterilisanog mikrolitarskog šprica (Hamilton®, Rino, Nevada, SAD) sa jednokratnom sterilnom 30G iglom, životinjama iz grupe CP/CPPS, ubrizgano je po 25 µl sterilnog 3% rastvora λ-karagenina (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) u levi i desni ventralni lobus prostate. Kontrolnim životinjama iz grupe Sham je intraprostaticom injekcijom ubrizgana ista zapremina sterilnog fiziološkog rastvora (0,9% NaCl, Hemofarm, Vršac, Srbija). Nakon intraprostatice injekcije, u okolinu rane je ponovo aplikovan lokalni anestetik, a potom je rana zatvorena po slojevima upotrebom resorptivnog konca (4-0, Polysorb™, Covidien, Dablin, Irska). Nakon buđenja iz hirurške anestezije, pacovi su vraćeni u svoje kaveze.



Slika 3.3.1. Indukcija CP/CPPS intraprostaticom injekcijom.

Izgled obrijanog i dezinfikovanog operativnog polja (A). Incizija prednjeg trbušnog zida (B). Ekspozicija ventralnih lobusa prostate (C). Intraprostatica injekcija (D). Sutura operativne rane (E). Postoperativni izgled suturirane rane (F).

3.3.2. Merenje dnevnog prirasta u telesnoj masi i dnevnog unosa hrane

Dnevni prirast u telesnoj masi i dnevni unos hrane su mereni i izračunati u bazalnim uslovima, dva i jedan dan pre intraprostatične injekcije, kao i u svih sedam uzastopnih dana nakon intraprostatične injekcije. U cilju određivanja dnevnog unosa hrane, prethodno izmerena, poznata, količina hrane je svakodnevno bila postavljena u standardne rezervoare za hranu koji su se nalazili na poklopcima kaveza. Nakon vremenskog perioda od 24 h, pacovi su na kratko bili uklonjeni iz svojih kaveza, a potom je bila izmerena telesna masa na standardni način, a zabeležena je i količina preostale hrane u rezervoaru poklopca, uključujući i hranu na dnu kaveza ili onu koja je ispala iz rezervoara na pamučne prostirke koje su bile postavljene ispod svakog kaveza. Dnevni unos hrane je izračunat kao masa (u gramima) hrane koja je bila postavljena prethodnog dana umanjena za masu hrane koja je preostala u kavezu nakon 24 h. Dnevni prirast u telesnoj masi je izračunat kao telesna masa životinje (u gramima) umanjena za telesnu masu koja je bila zabeležena pre 24 h. Merenje dnevnog prirasta u telesnoj masi i dnevnog unosa hrane su vršena upotrebom vage sa senzitivnošću od 0,1 g (Scout Pro SPU2001, Ohaus Corporation, Pinebrook, Nju Džerzi, SAD).

3.3.3. Merenje skrotalnog praga bola na mehaničku draž

U cilju utvrđivanja postojanja taktilne alodinije i praćenja dinamike razvoja eksperimentalnog CP/CPPS, skrotalni prag bola na mehaničku draž je meren preoperativno, u bazalnim uslovima, dva i jedan dan pre intraprostatične injekcije, kao i u postoperativnom periodu, drugog, trećeg i sedmog dana nakon intraprostatične injekcije. Merenje je izvršeno upotrebom elektronskog von Frey esteziometra (evF, IITC Life Sciences, Kalifornija, SAD) sa polipropilenskim rigidnim filamentom promera od 0,8 mm na vrhu.

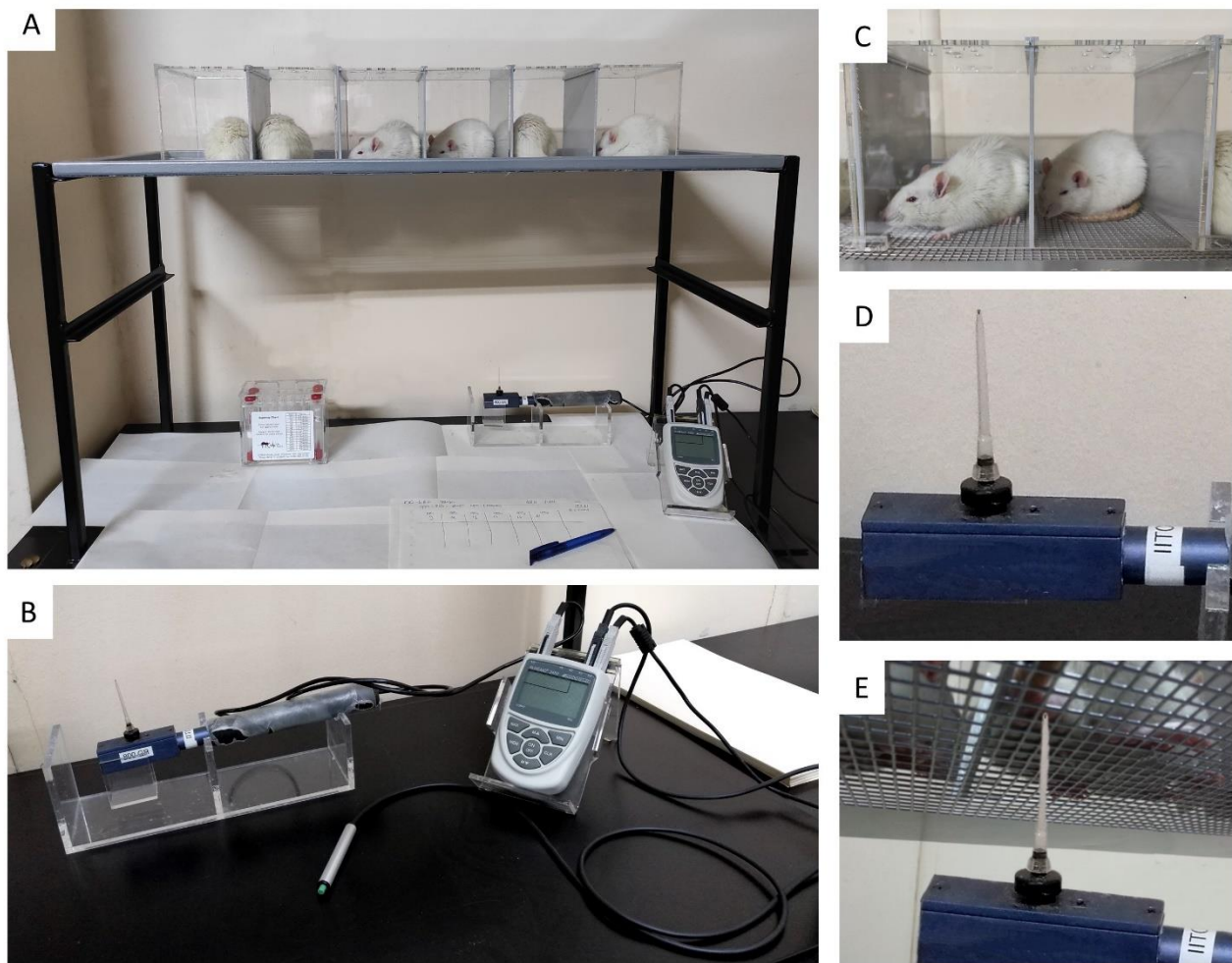
Platforma za merenje (Slika 3.3.3.A.) se sastojala od šest odvojenih kompartmana od transparentnog pleksiglasa, koji su bili postavljeni na žičanu metalnu podlogu kroz koju je omogućen pristup filamentu evF do skrotuma pacova.

Životinje su prethodno adaptirane na uslove merenja, tako što su u toku 24 h boravile dva puta po 15-20 minuta u kompartmanima od pleksiglasa. Kako bi se izbegao potencijalni uticaj bolnih senzacija na promene u ponašanju životinja, svako merenje praga bola je bilo izvršeno nakon završetka ostalih bihevioralnih testova, a tokom svetle faze ciklusa svetlo-tama.

Na početku merenja, životinje su bile postavljane u kompartmane, a nakon 30 min adaptacije na ambijent i umirivanja životinja (Slika 3.3.3.C.), pristupalo se merenju praga bola. Rigidni polipropilenski filament evF je bio aplikovan perpendikularno kroz žičanu platformu na skrotalnu kožu životinje (Slika 3.3.3.E.) uz gradirani, ravnomerni porast pritiska, sve do momenta dok se ne uoči refleksni odgovor uklanjanja skrotuma i pomeranja životinje iz originalne početne pozicije (refleks uklanjanja).

U cilju smanjenja mogućnosti nastanka povrede kože skrotuma na najmanju moguću meru, maksimalna sila kojom je aplikovan filament je iznosila 300g. U momentu nastanka refleksa uklanjanja na ekranu aparata je zabeležen maksimalni intenzitet primenjene mehaničke draži.

Prag bola je bio definisan kao minimalni intenzitet mehaničke draži koji je izazivao refleks uklanjanja, a bio je računat kao prosečna vrednost tri uzastopna merenja u međusobnim razmacima od po minimum 10 sekundi. Po završetku testa, životinje su vraćene u svoje kaveze.



Slika 3.3.3. Merenje skrotalnog praga bola na mehaničku draž

Platforma za merenje praga bola na mehaničku draž (A). Izgled sastavnih delova evF (B). Pacovi adaptirani na merenje praga bola u kompartmanima (C) Izgled polipropilenskog filameta evF esteziometra (D). Aplikovanje vrha filameta evF kroz žičanu platformu na skrotum životinje (E).

3.3.4. Bihejvioralni testovi

Bihejvioralni testovi su podrazumevali utvrđivanje ponašanja povezanog sa anksioznošću, ponašanja povezanog sa depresijom i ispitivanje kognitivnih sposobnosti.

3.3.4.1. Ponašanje povezano sa anksioznošću

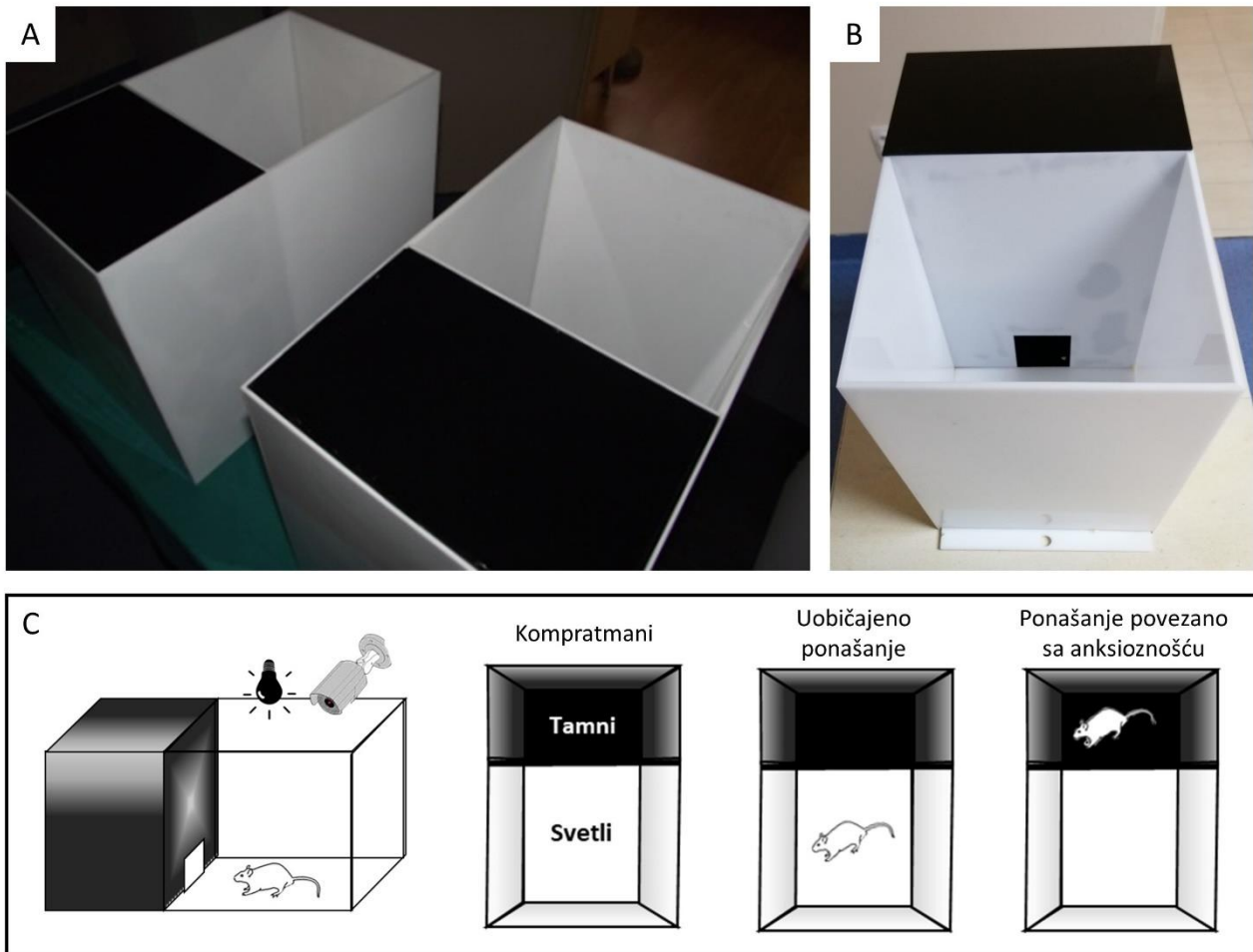
Ponašanje povezano sa anksioznošću je ispitano u tri etološka testa: L/D, EPM, OF.

Test sveto/tama

Za izvođenje testa svetlo/tama (Arrant i sar. 2013) korišćena je test arena (Slika 3.3.4.1.1.) sastavljena od većeg, svetlog, i manjeg, tamnog kompartmana (Elunit, Beograd, Srbija). Svetli kompartman (dimenzije: 27x27x27cm, sve površine bele boje) i tamni kompartman (27x18x27cm, sve površine crne boje) su međusobno bili povezani otvorom u obliku kvadrata (dimenzije: 8x8 cm). Tamni kompartman je odozgo zatvoren poklopcem crne boje, dok je svetli kompartman otvoren i iznad njega se nalazila video kamera (Logitech C210, Lozana, Švajcarska) povezana sa računarom, kojom je vršen monitoring tokom testa.

Test je započinjao postavljanjem životinje u centar svetlog kompartmana, a nakon toga je video kamerom snimano njeno ponašanje tokom 5 minuta. Nakon testiranja svake pojedinačne životinje, test arena je očišćena alkoholom (etanol 70% v/v, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija). Ponašanje životinja je analizirano naknadno, nakon završetka testa, od strane istog, nezavisnog istraživača, koji nije bio upućen u protokol tretmana životinja.

Parametri ovog testa koji su analizirani kao pokazatelji ponašanja povezanog sa anksioznošću, bili su ukupno vreme koje je životinja provela u svetlom kompartmanu, kao i broj tranzicija iz svetlog u tamni kompartman.



Slika 3.3.4.1.1. Test svetlo/tama

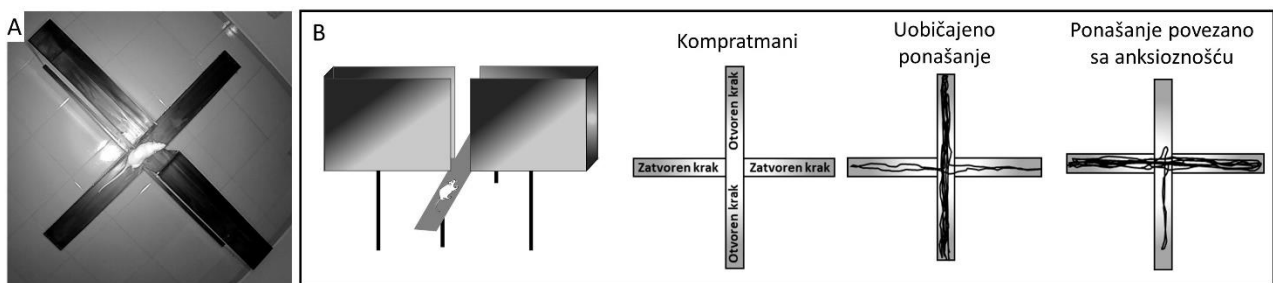
Izgled arene (A) i izgled kompartmana arene za test svetlo/tama (B). Shematski prikaz izvođenja testa svetlo/tama (C) sa prikazom životinje uobičajenog ponašanja i životinje koja pokazuje ponašanje povezano sa anksioznošću.

Test uzdignutog krstastog lavirinta

Za izvođenje testa uzdignutog krstastog lavirinta (Walf i Frye 2007) korišćena je platforma (Elunit, Beograd, Srbija) sastavljena od identičnih parova otvorenih krakova (50x10 cm) i zatvorenih krakova (50x10x40 cm), postavljenih jedan nasuprot drugom pod pravim uglom i spojenih u predelu centralne platforme (10x10 cm) koja je izdignuta 50 cm iznad podloge (Slika 3.3.4.1.2.). Monitoring je bio vršen infracrvenom kamerom (HikVision Bullet 2612, Hangdžou, Kina) koja je bila povezana sa računarom i postavljena iznad platforme. Test je započinjao

postavljanjem životinje u centralni kvadrat, a zatim se tokom perioda od 5 min snimalo eksplorativno ponašanje životinje u lavirintu. Analiza ponašanja životinja je vršena naknadno, nakon završetka testa, uvek od strane istog, nezavisnog istraživača, koji nije bio upućen u protokol tretmana životinja. Svaka životinja je testirana pojedinačno, a u cilju eliminacije olfaktivnih stimulusa, nakon svake životinje lavirint je bio očišćen alkoholom (etanol 70% v/v, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija).

Ovaj test se zasniva na konfliktu između urođene potrebe životinje da eksploriše novu, nepoznatu sredinu i urođenog straha od nepoznate, nezaštićene sredine koja je predstavljena uzdignutim, svetlim i nezaštićenim kracima. Izbegavanje takve sredine i pribegavanje zatvorenim sredinama sa zaklonom, koje su predstavljene zatvorenim kracima, karakteristika je ponašanja povezanog sa anksioznošću (Albani i sar. 2015). Parametri koji su registrovani tokom ovog testa, a koji karakterišu različite aspekte ponašanja povezanog sa anksioznošću su podrazumevali ukupan broj tranzicija između zatvorenih i otvorenih kraka i udeo provedenog vremena u zatvorenim kracima, kao direktan pokazatelj stepena anksioznosti (Slika 3.3.4.1.2.).



Slika 3.3.4.1.2. Test uzdignutog krstastog lavirinta

Izgled platforme i životinje u lavirintu tokom testiranja (A). Shematski prikaz izvođenja testa uzdignutog krstastog lavirinta (B) sa prikazom trase kretanja životinje uobičajenog ponašanja i životinje koja pokazuje ponašanje povezano sa anksioznošću.

Test otvorenog polja

Za registrovanje parametara eksplorativnog ponašanja i ponašanja povezanog sa anksioznošću, korišćen je i test otvorenog polja (Slika 3.3.4.1.3.).

Automatizovani sistem za izvođenje ovog testa (Hrnčić i sar. 2016) se sastoji od zvučno izolovane kutije opremljene infracrvenim senzorima (Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska) i pripadajućeg softvera za automatsku analizu (Conducta System v 1.0, Experimetria Ltd., Budimpešta, Mađarska). Za potrebe ovog testa pacovi su pojedinačno bili postavljeni u centar test arene – otvorenog polja (48x48 cm) koje je bilo okruženo zidovima crne boje (visina od 40 cm) i osvetljeno crvenim svetlom (jačina 12 lx).

Tokom perioda od 15 minuta, registrovani su parametri horizontalne i vertikalne lokomotorne aktivnosti: ukupan pređeni put (cm) i ukupno vreme (s) ambulatornog kretanja, kao i broj propinjanja na zadnje ekstremitete.

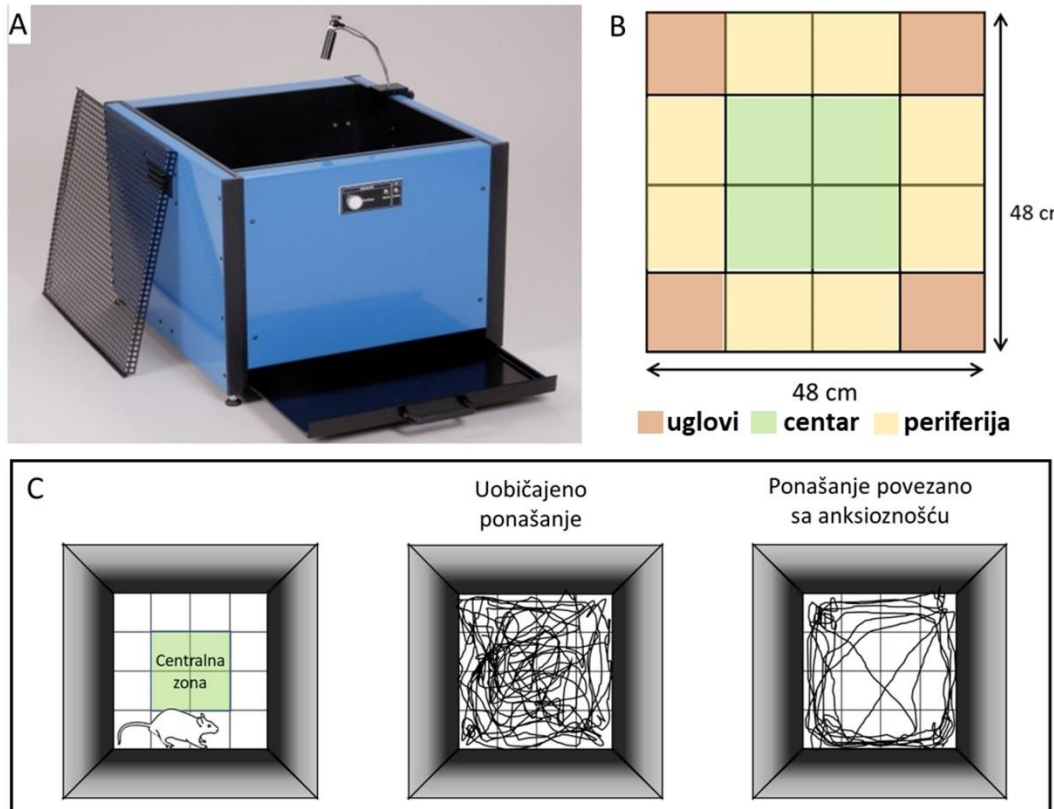
U cilju procene prostorne distribucije lokomotorne aktivnosti, otvoreno polje je virtuelno softverski bilo podeljeno na 16 kvadrata od kojih su 4 središnja (ukupna površina 24x24 cm) označena kao centar polja, koji je bio okružen perifernim i ugaonim kvadratima. Određivano je vreme koje je životinja provela u centru otvorenog polja i indeks tigmotaksije. Indeks tigmotaksije izračunat je kao odnos ambulatornog kretanja u perifernim i ugaonim zonama i ukupnog pređenog puta tokom ambulatornog kretanja, a izražen je u procentima.

Nakon završetka ispitivanja svake pojedinačne životinje, otvoreno polje je bilo očišćeno alkoholom (etanol 70% v/v, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija).

Devijacija navedenih parametara testa otvorenog polja dobro korelira sa stepenom anksioznosti kod životinja.

Ukupan pređeni put i ukupno vreme ambulatornog kretanja, kao i ukupan broj propinjanja na zadnje ekstremitete su pokazatelji eksplorativnog ponašanja životinje.

Sa druge strane, smanjenje vremena provedenog u centru otvorenog polja i povećan indeks tigmotaksije su prepoznati kao pokazatelji anksioznosti kod životinja (Sestakova i sar. 2013).



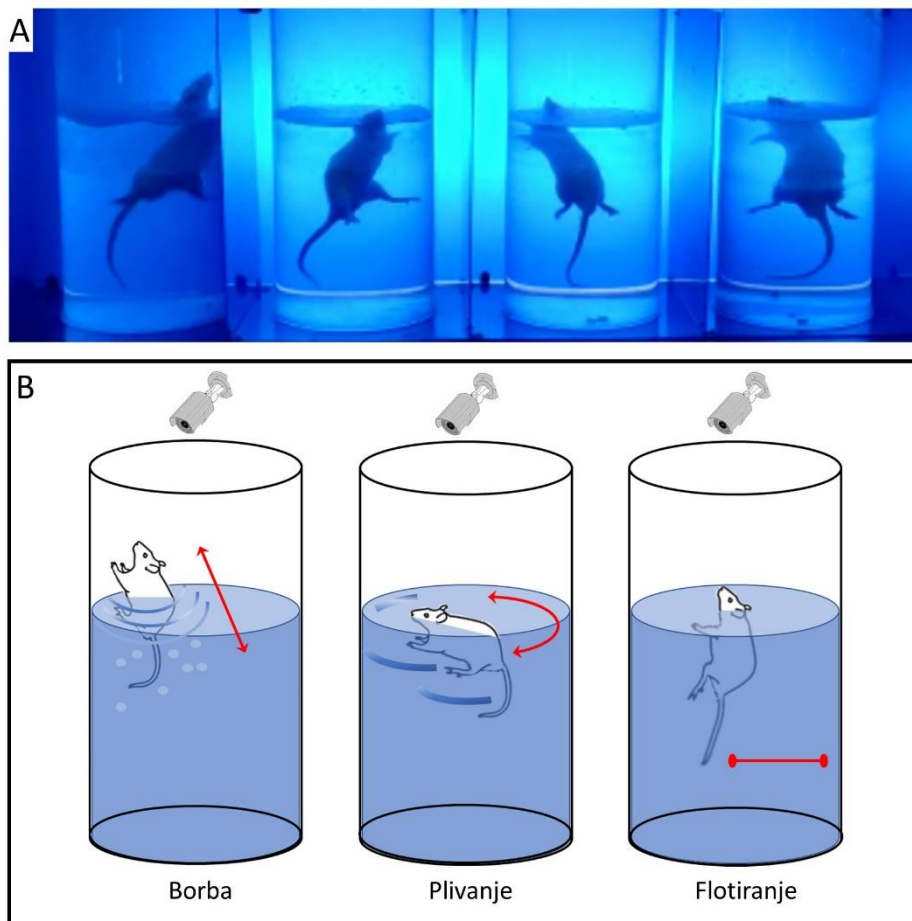
Slika 3.3.4.1.3. Test otvorenog polja

Izgled arene (A) i podela otvorenog polja (B). Shematski prikaz izvođenja testa otvorenog polja (C) sa prikazom trajektorije životinje uobičajenog ponašanja i trajektorije životinje koja pokazuje ponašanje povezano sa anksioznošću.

3.3.4.2. Ponašanje povezano sa depresijom

Ponašanje povezano sa depresijom je procenjivano izvođenjem testa forsiranog plivanja prema Porsoltu (Porsolt i sar. 1979), koji je podrazumevao upotrebu cilindra (visina 50 cm, prečnik 25 cm) od providnog pleksiglasa (Elunit, Beograd, Srbija). Test se izvodi zasebno za svaku životinju i podrazumeva spuštanje životinje u cilindar sa vodenim stubom (35 cm) temperature od $22 \pm 1^\circ\text{C}$ uz monitoring ponašanja životinje u toku 5 minuta upotrebom kamere (Logitech C210, Lozana, Švajcarska) koja je povezana sa računarnom (Slika 3.3.4.2.). Nakon testiranja svake pojedinačne životinje, iz cilindra je uklonjena voda, a zatim su osušeni i očišćeni alkoholom (etanol 70% v/v, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija) u cilju eliminacije olfaktivnih tragova.

Tri specifična tipa ponašanja životinja tokom ovog testa se opisuju kao: a) borba (penjanje, vrlo aktivno plivanje): snažni pokreti sva četiri ekstremiteta, prednji udovi udaraju o površinu vode pri pokretima koji podsećaju na penjanje ili grebanje po zidu; b) plivanje (aktivno plivanje): horizontalno pomeranje životinje po površini vode uz povremeno ronjenje; c) flotiranje (pasivno plivanje, imobilizacija): horizontalno plutanje po površini vode, pri čemu životinja čini samo pokrete neophodne da održi njušku i/ili deo glave iznad površine vode. Nakon završetka testa, životinje su, pre nego što su vraćene u svoje kaveze, pažljivo uklonjene iz cilindra i osušene u adekvatnim uslovima. Distribucija opisanih oblika ponašanja životinja utvrđena je analizom video snimaka, od strane istog istraživača, koji nije bio upućen u protokol tretmana životinja. U cilju smanjenja mogućnosti pogrešne interpretacije rezultata, sve životinje su adaptirane na uslove izvođenja testa tokom 15 minuta i to dva dana za redom pre testiranja.



Slika 3.3.4.2. Test forsiranog plivanja

Izgled platforme za testiranje (A) i distribucija tri tipa ponašanja životinja tokom testa (B).

3.3.4.3. Ispitivanje kognitivnog ponašanja

Za ispitivanje kognitivnog ponašanja upotrebljena je modifikovana platforma uzdignutog krstastog lavirinta (Elunit, Beograd, Srbija) prema prethodno opisanom protokolu (Kruk i sar. 2011). Platforma (Slika 3.3.4.3.A.) je izdignuta 50 cm iznad podloge, a sastoji se od centralne platforme (10x10 cm) na kojoj se pod pravim uglom susstiće par identičnih otvorenih krakova (50x10 cm) i par identičnih zatvorenih krakova (50x10x40cm). U cilju monitoringa, iznad platforme je bila postavljena infracrvena kamera (HikVision Bullet 2612, Hangdžou, Kina) povezana sa računarnom.

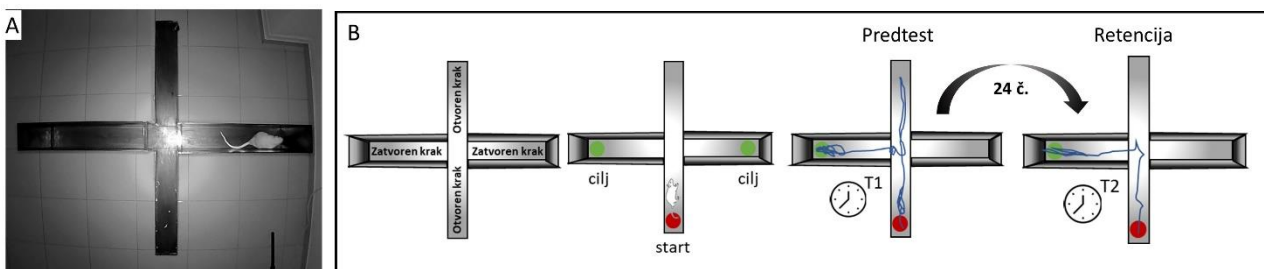
Test je baziran na prirodnoj averziji glodara prema svetlim i otvorenim prostorima (analog: otvoreni kraci) i prirodnoj težnji ka nalaženju sigurnog skloništa (analog: zatvoreni kraci). Dakle, kognitivna sposobnost životinje se ogleda u vremenu koje je potrebno da životinja upamti i nauči raspored otvorenih i zatvorenih krakova.

Izvođenje testa podrazumeva da se životinje individualno postavje na kraj otvorenog kraka i to licem okrenutim ka centralnoj platformi, a procedura je bila ponavljana tokom dva uzastopna dana (Slika 3.3.4.3.B.).

Tokom prvog dana testa (predtest), nakon postavljanja životinje, bilo joj je dozvoljeno da eksploriše platformu najduže 90 sekundi i beleži se vreme, latenca transfera (T1) koje je potrebno životinji da iz otvorenog kraka uđe u zatvoreni, bilo levi ili desni krak. Ukoliko životinja tokom 90 sekundi nije uspeła da pronađe zatvoreni krak, ona bi bivala postavljena u zatvoreni krak uz dopuštenje da ga eksploriše u narednih 60 sekundi. U tom slučaju, za vrednost T1 je bila uzeta vrednost od 90 sekundi (Slika 3.3.4.3.B.).

Drugog uzastopnog dana, nakon perioda od 24 h, procedura je bila ponovljena na isti način (retencija), a latenca transfera (T2), vreme koje je bilo potrebno životinji da dospe u zatvoreni krak je zabeleženo. Ukoliko tokom drugog dana životinja ne uspe da pronađe zatvoreni krak u toku zadatog perioda od 90 sekundi, za vrednost T2 je bila uzeta vrednost od 90 sekundi.

Kao parametar ocene kognitivnog ponašanja i pokazatelj sposobnosti učenja i pamćenja uzeta je latenca transfera tokom retencije, tj. vrednost T2 (Slika 3.3.4.3.B). Narušena sposobnost učenja i pamćenja se reflektuje u povećanju latence transfera, kao indikator smanjenih kognitivnih sposobnosti.



Slika 3.3.4.3. Test modifikovanog uzdignutog krstastog lavirinta

Izgled platforme i životinje u lavirintu tokom testiranja (A). Shematski prikaz izvođenja testa (B) sa prikazom životinje u lavirintu u kome postoji početna tačka (start) i dve moguće završne tačke (cilj). Tokom prvog dana testiranja (predtest) meri se vreme (T1) koje protekne u kretanju životinje od tačke „start“ do jedne od izabranih tačaka „cilj“. Nakon 24h (retencija) se meri vreme (T2) kretanje životinje do identične tačke.

3.3.5. Biohemijske analize

3.3.5.1. Priprema uzoraka za biohemijsku analizu

Nakon dekapitacije pacova upotrebom specijalne giljotine za male eksperimentalne životinje, po 3 mL krvi iz trupa životinje je prikupljeno sa mesta dekapitacije. Krv u epruvetama je ostavljena na sobnoj temperaturi da spontano koaguliše, uz dodatnih 30 minuta na temperaturi od 4°C. U cilju razdvajanja uobličjenih elemenata krvi i seruma, izvršeno je centrifugiranje (Centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) u trajanju od 15 minuta na 3000

o/min. Nakon toga, izolovani su uzorci seruma koji su se do analize bili čuvani u Eppendorf® tubama u zamrzivaču na -80°C.

Iz lobanja pacova su pažljivom disekcijom izdvojeni mozgovi. Nakon toga, jedna od hemisfera (nasumično: leva ili desna) je korišćena za pripremu tkivnog homogenata, dok je druga hemisfera korišćena za imunohistohemijsku analizu. U skladu sa uputstvima iz atlasa (Paxinos i Watson 2007), iz odabrane hemisfere mozga su pažljivom disekcijom izolovani hipokampus, talamus i deo frontalnog korteksa. Disekcijom tela pacova izolovane su prostate. Nasumičnim izborom (levi ili desni), jedan ventralni lobus je korišćen za pripremu tkivnog homogenata, dok je drugi lobus dalje procesuiran u histološkoj analizi.

Strukture mozga i tkivo prostate su homogenizovani upotrebom homogenizatora (The TeSeE™ PRECESS, Bio-Rad, Herkujliz, Kalisofnija, SAD) u 8 volumena RIPA (engl. Radio-Immunoprecipitation Assay) pufera (50 mM Tris-HCL pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% IGEPAL; 0,5% Natrijum deoskiholat; 10% SDS) koji je obogaćen komercijalno dostupnim koktelom inhibitora proteaza (Protease Inhibitor Cocktail I, Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka). Homogenati tkiva su inkubirani u trajanju od 20 minuta, a takođe i mešani na vorteksu svakih 5 minuta pre centrifugiranja na 14000 o/m u trajanju od 30 minuta, pri temperaturi od +4°C. Dobijeni supernatant je prenet u Eppendorf® tube i čuvan u zamrzivaču na -80°C do analize.

3.3.5.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određena upotrebom komercijalnog kita *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA, Thermo Fisher Scientific, Lafboro, Ujedinjeno Kraljevstvo) u skladu sa instrukcijama proizvođača. Princip ove metode počiva na kvantifikovanju smanjenja Cu^{2+} na Cu^{1+} od strane proteina u alkalnoj sredini. Ovo smanjenje, koje je srazmerno koncentraciji proteina u uzorku, se kolorimetrijski meri na osnovu detekcije bakarnih katjona (Cu^{1+}) od strane BCA.

Ukratko, 10 μl svakog uzorka sa proteinima, različita razblaženja (0,5-2 mg/ml) standarda goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA) i negativne kontrole su aplikovani u duplikatu u mikrotitarskoj pločici sa 96 „bunara“. U sledećem koraku, 200 μl radnog reagensa je dodato na svako mesto u mirkotitarskoj pločici, a ona je inkubirana 30 minuta na 37°C. Apsorbance su određivane na talasnoj dužini od 562 nm upotrebom čitača (FLUOstar® Omega plate reader, BMG Labtech, Ortenberg, Nemačka). Za određivanje koncentracije proteina u uzorku, u g/L, korišćena je BSA standardna kriva konstruisana u programskom paketu *Curve Expert 1.4* (Hyams Development, Čatanuga, Tenesi, SAD).

3.3.5.3. Određivanje koncentracije interleukina 1 beta i interleukina 6

Koncentracija IL-1 β i IL-6 je određivana u serumu, strukturama mozga i prostati pacova, čija je izolacija gore opisana. Za merenje koncentracije IL-1 β i IL-6 su korišćeni komercijalni sendvič ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kitovi (Rat IL-1 beta ELISA kit # RAB0277-1KT i Rat IL-6 ELISA kit # RAB0311-1KT, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) u skladu sa instrukcijama proizvođača koje nisu zahtevale izolaciju bilo kakvih specifičnih proteina, već samo gore pomenutu izolaciju seruma i tkivnog supernatanta. Svaki uzorak urađen je u duplikatu. Minimalna detektabilna koncentracija ELISA kita za IL-1 β je bila 80 pg/mL (opseg detekcije: 68,59-50000 pg/mL), dok je minimalna detektabilna koncentracija ELISA kita za IL-6 iznosila 30 pg/mL (opseg detekcije: 40,96-10000 pg/mL).

Nakon inkubacije, svi „bunari“ ELISA ploče su 4 puta isprani sa po 300 μL pufera za ispiranje, prema propisanim koracima, kako bi se ploča oslobodila svih nevezanih supstanci. Potom je u

svaki „bunar“ dodato po 100 μ L detektujućih biotin-konjugovanih antitela, te je formiran „sendvič“ koga je činio primarno antitelo – IL-1 β ili IL-6 – biotin-konjugat. Zatim se odbaci rastvor iz „bunara“ ploče i učini se već opisano ispiranje puferom. Potom se u svaki „bunar“ dodaje po 100 μ L konjugata streptavidina i peroksidaze rena (eng. *horseradish peroxidase, HRP*) i vrši se inkubacija od 45 minuta na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Sledi odbacivanje rastvora iz „bunara“ ploče i ispiranje puferom, a potom se u svaki „bunar“ dodaje po 100 μ L rastvora tetrametilbenzidina (eng. *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB*) supstrata, „bunari“ se pokrivaju i vrši se inkubacija u zatamnjenoj prostoriji na sobnoj temperaturi uz blago mešanje u trajanju od 30 minuta.

Na kraju, reakcija je prekinuta dodavanjem 50 μ L rastvora za prekidanje hemijske reakcije u svaki „bunar“. U ovoj reakciji se za biotin vezuje streptavidin koji je konjugovan sa enzimom HRP. Supstrat za peroksidazu rena je tetrametilbenzidin i rezultat je promena boje rastvora iz plave u žutu.

Apsorbanca žute boje se odmah nakon prekida hemijske reakcije čita na talasnoj dužini od 450 nm pomoću čitača (Sunrise absorbance micro plate reader, TECAN, Mannedorf, Švajcarska). Koncentracije IL-1 β i IL-6, izražene u pg/mL, su izračunate upotrebom standardne krive konstruisane u programskom paketu *Curve Expert 1.4* (Hyams Development, Čatanuga, Tenesi, SAD).

3.3.5.4. Određivanje koncentracije hormona u serumu

Koncentracija hormona kortikosterona i testosterona je merena u serumu. Za merenje koncentracije hormona su upotrebljeni ELISA kitovi (Corticosterone EIA kit #AC-14F1, The Immunodiagnostic Systems, Istočni Boldon, Velika Britanija; Rat Testosterone (T) ELISA Kit #CSB-E05100r, Cusabio Technology LLC, Hjuston, SAD) u skladu sa instrukcijama proizvođača. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu.

Minimalna detektabilna koncentracija ELISA kita za kortikosteron je bila 0,1 ng/mL (opseg detekcije: 0,2-400 ng/mL), dok je minimalna detektabilna koncentracija ELISA kita za testosteron iznosila <0,06 ng/mL (opseg detekcije: 0,13-25,6 ng/mL).

Ukratko, esej se zasniva na „sendvič“ tehnici, koja podrazumeva dodavanje standarda, kontrola i razblaženih uzoraka seruma u kojima se analizira koncentracija hormona u „bunare“ ELISA mikrotitarske pločice, a tokom inkubacije hormoni su se vezali imobilizovanim primarnim antitelima u „bunarima“.

Nakon inkubacije, svi „bunari“ ELISA ploče su isprani nekoliko puta adekvatnim puferom za ispiranje. Potom su u svaki „bunar“ dodata detektujuća biotin-konjugovana antitela, te je formiran „sendvič“ koga je činio primarno antitelo-hormon-biotin-konjugat. Zatim se odbaci rastvor iz „bunara“ ploče i učini se već opisano ispiranje puferom. Potom se u svaki „bunar“ dodaje konjugat streptavidina i HRP i vrši se inkubacija od 30 minuta na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Sledi odbacivanje rastvora iz „bunara“ ploče i ispiranje puferom, a potom se u svaki „bunar“ dodaje TMB supstrat, a „bunari“ se pokrivaju i vrši se inkubacija u zatamnjenoj prostoriji na sobnoj temperaturi uz blago mešanje u trajanju od 30 minuta.

Na kraju, reakcija je prekinuta dodavanjem rastvora za prekidanje hemijske reakcije u svaki „bunar“. Apsorbanca boje se odmah nakon prekida hemijske reakcije čita na talasnoj dužini od 450 nm pomoću čitača (Sunrise absorbance micro plate reader, TECAN, Mannedorf, Švajcarska). Koncentracije kortikosterona i testosterona, izražene u ng/mL, su izračunate upotrebom standardne krive konstruisane u programskom paketu *Curve Expert 1.4* (Hyams Development, Čatanuga, Tenesi, SAD).

3.3.5.5. Oksidativni stres u strukturama mozga

Parametri oksidativnog stresa: koncentracija malondialdehida (eng. *malondialdehyde*, MDA) i proteinskih tiol grupa (eng. *protein thiol groups*, P-SH) i aktivnost enzima superoksid dismutaze (eng. *superoxide dismutase*, SOD) i glutation peroksidaze (eng. *glutathione peroxidase*, GPx) su određivani u homogenatima struktura mozga čija je priprema prethodno opisana do detalja.

Određivanje koncentracije markera lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA)

Koncentracija malondialdehida (MDA) je merena u skladu sa kolorimetrijskom metodom koja je opisana od strane Dousset i sar. (1983). Naime, kao posledica lipidne peroksidacije se iz polinezacićenih masnih kiselina oslobađa MDA koji u kiseloj sredini konjuguje sa tiobarbiturinskom kiselinom (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS), nakon čega se stvara crveno obojeno kompleksno jedinjenje MDA-TBARS. Maksimalna apsorbance ovog jedinjenja se meri kolorimetrijski pomoću čitača (Sunrise absorbance micro plate reader, TECAN, Mannedorf, Švajcarska) na talasnoj dužini od 532 nm sa molarnim apsorpcionim koeficijentom od $1,56 \times 10^5$ l/(mol x cm). Koncentracija MDA je izražena u $\mu\text{mol/L}$.

Određivanje koncentracije proteinskih tiol grupa (P-SH)

Koncentracija proteinskih tiol grupa (P-SH) je određivana spektrofotometrijskom metodom u skladu sa procedurom koja je prethodno opisana od strane Jocelyn i sar. (1987). U hemijskoj reakciji se koristi Ellman-ov reagens (5,5' ditiobis-2-nitrobenzoična kiselina, eng. *5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)*, DTNB) koji biva redukovano od strane P-SH, pri čemu se stvara nitromerkaptobenzoični kiselni anjon (eng. *5-thio-2-nitrobenzoic acid*, TNB⁻) žute boje. Molarni ekstinkcioni koeficijent TNB⁻ je $13,6 \times 10^3$ l/mol/1cm, dok je apsorbance merena pomoću čitača na talasnoj dužini od 412 nm. Ova hemijska reakcija se odigrava u zatamnjenom okruženju, s obzirom da svetlost može nespecifično redukovati DTNB. Koncentracija P-SH je izražena u $\mu\text{mol/g}$ proteina.

Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) je utvrđena po ranije opisanoj metodologiji od strane Misra i Fridovich (1972). Ovaj metod je baziran na sposobnosti SOD da inhibira autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini (pH 10,2). Adrenalin je prilično stabilan u rastvoru u kome je sredina kisela, ali se on oksiduje proporcionalno u zavisnosti od porasta pH. Autooksidaciju adrenalina započinju teški metali koji su prisutni u tragovima kao kontaminanti reagenasa koji se koriste. Rezultat hemijske reakcije je nastanak obojenog adrenohroma u reakcionoj smeši (10 mmol/L adrenalina rastvoren u 20 mmol/L HCl, 1 mmol/L EDTA i 0,05 mmol/l natrijum karbonata na pH 10,2) sa ekstraktom ćelijskih proteina (uzorka) ili bez njih (kontrola). Ukupna aktivnost SOD se određuje kinetički, kao promena apsorbance na čitaču (Sunrise absorbance micro plate reader, TECAN, Mannedorf, Švajcarska) pri talasnoj dužini od 480 nm.

Aktivnost SOD je izražena u U/L, pri čemu jedna je jedinica (eng. *unit*, U) aktivnosti SOD definisana kao količina enzima koja je potrebna da inhibira autooksidaciju adrenalina za 50%.

Određivanje aktivnosti enzima glutation peroksidaze (GPx)

Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) je utvrđena po ranije opisanoj metodologiji kuplovane procedure od strane Günzler i sar. (1974). U ovoj proceduri se reakciona smeša sastoji od: 870 μl Tris pufera pH 7,6; 20 μl glutation reduktaze (eng. *glutathione reductase*, GR); glutationa (GSH); nikotin-amid-adenin dinukleotid-fosfata (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH); tert-butil hidroperoksida (eng. *tert-Butyl hydroperoxide*, t-

BOOH) i ekstrakta ćelijskih proteina. Metoda se zasniva na oksidaciji redukovanog GSH pri čemu se iskorišćava redukovani NADPH u reakciji koju katalizuje GR.

Mera aktivnosti GPx u kuplovanj reakciji sa GR, predstavlja promena apsorbanca merena na čitaču pri talasnoj dužini od 340 nm sa molarnim apsorpcionim koeficijentom od $6,22 \times 10^3$ L/mol/cm kao posledica naknadne oksidacije NADPH pomoću t-BOOH kao supstrata. Aktivnost GPx je izražena u U/L.

3.3.5.6. Ekspresija proteina ICAM-1 u strukturama mozga

Ekspresija intracelularnog adhezionog molekula-1 (eng. *Intercellular Adhesion Molecule 1*, ICAM-1) je analizirana u strukturama mozga.

U cilju izvođenja *Western blot* analize, nakon ekstrakcije i kvantifikovanja ćelijskih proteina je usledila i konačna priprema uzoraka proteina za nanošenje na natrijum dodecil sulfat poliakrilamidni gel (eng. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel*, SDS-PAGE). Naime, ekvivalentna količina proteina po uzorku je pomešana sa litijum dodecil sulfat bojom za nanošenje (Invitrogen, Masačusets, SAD).

U cilju smanjenja i denaturacije proteina, uzorcima je dodato komercijalno sredstvo za redukciju proteina (Invitrogen, Masačusets, SAD), a potom su uzorci kuvani 10 minuta na temperaturi od 95°C. Podjednake količine proteina (15 µg) i proteinskog markera za određivanje molekulske težine proteina (Page ruler plus, Bio-Rad, Herkjuliz, Kalifornija, SAD) su dodate zajedno na gel SDS-PAGE.

Gel za slaganje akrilamida (4 %) i gel za razdvajanje akrilamida (10 %) su pripremljeni i sipani u kasetu koja je već bila spremna za upotrebu (Novex™, Invitrogen, Masačusets, SAD). Elektroforeza (80 V tokom 10 minuta, zatim 100 V tokom 90 min) je izvedena na napajanju visoke struje (PowerPac™, Bio-Rad, Herkjuliz, Kalifornija, SAD). U sledećem koraku, proteini su preneti iz poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu (Bio-Rad, Herkjuliz, Kalifornija, SAD) koja je bila pod naponom od 120V tokom 90 min. Prenos proteina je potvrđen rastvorom za bojenje (Ponceau S, Cell Signalling Technology, Masačusets, SAD).

U cilju sprečavanja nespecifičnog vezivanja antitela, membrane su blokirane 5% nemasnim mlekom (Blotting-Grade Blocker #1706404, Bio-Rad, Herkjuliz, Kalifornija, SAD), koje je bilo rastvoreno u fiziološkom rastvoru, prethodno puferovanom Tris puferom, sa dodatkom 0,1% polisorbit 20 (Tween-20).

Membrane sa mlekom i navedenom TBS-T smešom (eng. Tris Buffered Saline with Tween 20) su inkubirane na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h. Potom je nastavljena inkubacija membrana na temperaturi od +4°C, preko noći, uz konstantno mešanje, zajedno sa primarnim monoklonalnim mišjim anti-ICAM1 antitelima (ICAM-1 (15.2) antibody, Santa Cruz Biotechnology, Dalas, Teksas, SAD) razblaženim 1:200 u 5% mleku.

Narednog dana, membrane su isprane upotrebom TBS-T i inkubirane na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h sa specifičnim HRP-konjugovanim vezujućim sekundarnim anti-mišjim antitelima (Abcam, Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo) u razblaženju od 1:5000. Poslednji korak je podrazumevao odbacivanje sekundarnih antitela, ispiranje membrana i tretiranje pomoću hemiluminescentnog supstrata (Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific, Masačusets, SAD).

Hemiluminescentne trake su vizualizovane pomoću čitača (ChemiDoc™ MP Imaging System, Bio-Rad, Herkjuliz, Kalifornija, SAD). Densitometrijska analiza je sprovedena upotrebom programskog paketa „Image J“ (National Institutes of Health, Betesda, Merilend, SAD). Opseg

proteina ICAM-1 otkriven je na 80-100 kDa, dok je β -aktin detektovan na 42 kDa. Ekspresija ICAM-1 proteina je izražena u odnosu na ekspresiju β -aktina koji je konstitutivno eksprimirani protein („housekeeping protein“).

3.3.6. Bihevioralne i EEG karakteristike konvulzivnog ponašanja

U cilju ispitivanja ekscitabilnosti CNS i analize konvulzivnog ponašanja i iktalne EEG aktivnosti, životinjama je sedmog postoperativnog dana administriran lindan (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) rastvoren u dimetil-sulfoksidu (DMSO, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) u subkonvulzivnoj dozi (4 mg/kg, i.p.).

3.3.6.1. Bihevioralne karakteristike konvulzivnog ponašanja

Tokom 30 minuta od administracije lindana, opservirani su sledeći bihevioralni parametri konvulzija: incidenca, latentni period i intenzitet napada.

Incidenca napada, izražena u procentima (%), je predstavljala broj životinja koje su tokom opservacionog perioda bar jednom dobile konvulzivni napad, podeljen sa ukupnim brojem životinja u opserviranoj grupi i pomnožen sa 100.

Latentni period je predstavljao vreme koje je proteklo od momenta administracije lindana do opservacije prvog znaka konvulzivnog napada. Životinjama koje tokom opservacionog perioda nisu dobile konvulzivni napad, bio je dodeljen latentni period od 30 minuta.

Intenzitet konvulzivnih napada je procenjivan upotrebom modifikovane deskriptivne skale (Stanojlović i sar. 2009b) sa gradusima od 0 do 4 koji su bili definisani na osnovu vrste konvulzivnog odgovora na sledeći način: **gradus 0** – ne postoji konvulzivni odgovor; **gradus 1** – životinja klama glavom gore-dole i/ili postoji grčeviti trzaj donje vilice; **gradus 2** – postoje mioklonički trzaji celog tela (*reakcija vruće ploče*) ili postoji klonus prednjih ekstremiteta dok se životinja propinje na zadnje ekstremitete (*kengur pozicija*); **gradus 3** – progresija u generalizovane kloničke napade praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; **gradus 4** – ozbiljna i prolongirana kloničko-tonička konvulzija koja traje preko 20 sekundi ili učestale i ponavljane epizode kloničkih konvulzija tokom perioda dužeg od 5 minuta (*status epilepticus*).

3.3.6.2. Elektroencefalografske karakteristike konvulzivnog ponašanja

U cilju analize EEG karakteristika konvulzivnih napada izazvanih lindanom, životinjama su implantirane registrujuće EEG elektrode, a potom je učinjena akvizicija i analiza EEG signala.

Implantacija EEG elektroda

Operacija u cilju implantacije EEG elektroda je izvršena dva dana pre intraprostatične injekcije kako bi životinjama bio obezbeđen period oporavka u trajanju od 48 h.

Nakon pripreme operativnog polja po svim principima asepse i antiseptike, životinje koje su prethodno anestezirane natrijum tiopentalom (40 mg/kg, i.p., Thiopental®, Panpharma, Francuska) su postavljene i fiksirane u stereotaksičkom ramu (David Kopff, Tujung, SAD) sa gornjom šipkom sekutića na -5,0 mm.

U cilju dugotrajnog bipolarnog registrovanja EEG, a na osnovu koordinata iz stereotaksičkog atlasa (Paxinos i Watson 2007), ukupno tri pozlaćene elektrode su životinjama

implantirane iznad **frontalnog** (2 mm anteriorno od orijentacione tačke *bregma* i 2mm lateralno od *sutura sagitalis*), **parijetalnog** (2mm anteriorno od orijentacione tačke *lambda* i 2mm lateralno od *sutura sagitalis*) i **okcipitalnog** (2 mm posteriorno od orijentacione tačke *lambda*) korteksa.

Pri implantaciji elektroda se vodilo računa da moždani korteks ostane nepovređen kako ne bi nastao arteficialni EEG signal iznad oštećenog moždanog tkiva.

Nakon implantacije, elektrode su bile povezane sa konektorom koji je fiksiran dentalnim autopolimerizujućim akrilatom. Pre akvizicije EEG signala, životinjama je bila dozvoljena habituacija u trajanju od 24 h na uslove i sredinu u kojima je vršena registracija.



Slika 3.3.6.2. Koordinate za implantaciju EEG elektroda

Akvizicija EEG signala

Za digitalno bipolarno registrovanje EEG signala slobodno-pokretnih životinja je upotrebljen osmokanalni EEG aparat (RIZ, Zagreb, Hrvatska) sa modifikovanim stepenom izlaznih signala, tako da je analogno-digitalna konverzija izvršena uz pomoć 8-kanalne, 16-bitne kartice SCB-68 (National Instruments Corporation, Austin, Teksas, SAD) koja je bila instalirana u računar. Akvizicija EEG signala je vršena postavljanjem životinja, povezanih sa EEG aparatom pomoću fleksibilnog kabela, u specijalno dizajnirane kutije (50x50x50 cm) od providnog pleksiglasa (Elunit, Beograd, Srbija) koje su omogućavale istovremenu opservaciju parametara konvulzivnog ponašanja.

Akvizicija EEG signala je trajala 30 minuta nakon administracije lindana, a po završetku registrovanja, životinje su pažljivo vraćene u svoje originalne kaveze. Frekvencija akvizicije (procesovanja) je iznosila 512 Hz/kanal, dok je ambijatalni šum uklonjen pomoću *notch* filtera od 50 Hz sa graničnim frekvencijama filtriranja od 0,3 za visokopropusni filter i 100 Hz za niskopropusni filter.

Za digitalnu akviziciju i obradu signala je upotrebljen programski paket na bazi LabVIEW platforme (National Instruments Corporation, Austin, Teksas, SAD) koji je originalno razvijen u našoj laboratoriji (NeuroSciLaBG, Beograd, Srbija) i koji omogućava da se EEG signal kontinuirano beleži na trajnu memoriju računara.

Analiza EEG zapisa

Registrovani EEG snimci su analizirani najpre u toku same akvizicije vizuelnom inspekcijom u potrazi za EEG iktalnom aktivnošću, a kasnije je izvršena detaljna analiza snimaka sa memorije računara upotrebom programskog paketa (NeuroSciLaBG, Beograd, Srbija).

Iktalni EEG periodi su fenomeni koji karakterišu epileptičnu aktivnost izazvanu lindanom (Hrnčić i sar. 2011), a ispunjavali su sledeće kriterijume: (1) spontani i generalizovani, ritmički šiljci, (2) trajanje >1s, (3) amplituda najmanje dvostruko veća od bazalne EEG aktivnosti. Određivan je broj i trajanje EEG iktalnih perioda za svaku životinju pojedinačno u celom tridesetominutnom EEG zapisu.

U cilju detaljne EEG analize, registrovani zapisi su vizuelno pregledani u cilju lociranja EEG iktalnih perioda, te su ekstrahovane karakteristične EEG epohe. Svaka ekstrahovana epoha koja je sadržala EEG iktalni period je nakon toga obrađena putem brze Furijerove transformacije (eng. *Fast Fourier Transformation, FFT*, linearna transformacija, Hanning prozor, rezolucija spektra 0.083 Hz).

Parametri EEG iktalnih perioda koji su proizašli iz FFT analize su: trajanje (s), maksimalna frekvencija (Hz) i spektralna gustina snage (eng. *Power Spectral Densities, PSD*), dobijena FFT analizom, a izražena u funkciji frekvencije ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$). Izračunata je ukupna spektralna gustina snage (frekventni opseg: 0,5-100 Hz), kao i frakcija u procentima (%) ukupne gustine spektralne snage EEG iktalnih perioda po pojedinačnim frekventnim opsezima: delta ($\delta = 0,5 - 4$ Hz); teta ($\theta = 4-7$ Hz); alfa ($\alpha = 7-15$ Hz) i beta ($\beta = 15-30$ Hz).

3.3.7. Histološka analiza prostate

Neposredno nakon žrtvovanja pacova, učinjena je disekcija i izolovane su prostate koje su fiksirane tokom 24 h u 10% rastvoru puferisanog formalina. Nakon fiksacije, uzorci prostata su dehidrirani u seriji alkohola rastuće koncentracije (70%, 96%, 100%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija), zatim prosvetljeni u ksilolu (Ksilol, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija), ukalupljeni u parafinu (Bio-plastextra, Bio Optica, Milano, Italija) i sa njih su načinjeni preseki na rotacionom mikrotomu debljine 5 μm .

U cilju vizuelizacije histološke građe tkiva prostate i ispitivanja prisustva zapaljenja, sprovedeno je rutinsko histohemijsko bojenje hematoksilinom i eozinom (H/E). Histološki preparati prostata su analizirani na svetlosnom mikroskopu (Leica DM4000 B LED, Veclar, Nemačka), a fotomikrografije su načinjene digitalnom kamerom (Leica DFC295, Veclar, Nemačka).

3.3.8. Imunohistohemijska analiza ekspresije markera gliogeneze i neurogeneze

Po završetku eksperimenata, nakon dekapitacije pacova, iz lobanja su pažljivom disekcijom izdvojeni mozgovi. Jedna od hemisfera (nasumično: leva ili desna) je korišćena za imunohistohemijsku analizu, dok je preostala hemisfera procesuirana u cilju pripreme uzoraka za biohemijske analize.

Imunohistohemijskom metodom je izvršena detekcija ekspresije sledećih markera neurogeneze i gliogeneze: Ki-67, DCX i GFAP, kao i markera inhibitornih interneurona: PV.

U cilju analize svakog od četiri različitih proteina, pripremljena su i imunohistohemijski tretirana po dva preseka hipokampusa po životinji. Na dobijenim presecima je potom usledilo kvantifikovanje imunoreaktivnih ćelija uz pravljenje digitalnih fotomikrografija.

3.3.8.1. Priprema isečaka za imunohistohemijsko bojenje

Mozgovi koji su izolovani na prethodno opisani način su najpre fiksirani u trajanju od 24 h u 4% paraformaldehidu (4% PFA) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) koji je puferovan 0,1 M fosfatnim puferom (pH=7,4).

Zatim je usledila standardna procedura za parafinsko kalupljenje mozгова, koja je sprovedena kroz sledeće korake: dehidratacija mozgovа u seriji alkohola rastuće koncentracije (Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija); prosvetljavanje u ksilolu (Ksilol, Zorka Pharma-Hemija, Srbija) i kalupljenje u parafinu (Bio-plastextra, Bio Optica, Milano, Italija).

Nakon završetka pripreme kalupa, mozgovi su sečeni na rotacionom mikrotomu, u koronarnoj ravni, na preseke debljine 4 μm . Minimalno rastojanje između dva sukcesivna preseka je iznosilo najmanje 200 μm .

Dobijeni preseci su potom ispravljani u vodenom kupatilu, a potom lepljeni na predmetna stakla za (Superfrost™ Ultra Plus Adhesion Slides, Thermo Fisher Scientific, Laforo, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3.3.8.2. Imunohistohemijsko bojenje

Nakon deparafinizacije isečaka u ksilolu (Ksilol, Zorka Pharma-Hemija, Srbija) i rehidratacije u seriji alkohola opadajuće koncentracije (100%, 96%, 70%, Zorka Pharma-Hemija, Šabac, Srbija), iseći su kuvani u citratnom puferu (pH = 6,0) u mikrotalasnoj peći u trajanju od 21 minut na 800W u cilju demaskiranja antigena. Nakon hlađenja uzoraka, blokirana je aktivnost endogene peroksidaze 3% rastvorom vodonik peroksida.

Nespecifična imunoreaktivnost je blokirana inkubacijom preseka tokom 1 h za Ki-67 ili GFAP u normalnom kozjem (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase, Rabbit IgG #PK-6101, Vector Laboratories, Berlingejm, Kalifornija, SAD); za PV u normalnom konjskom (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase, Mouse IgG #PK-6102, Vector Laboratories, Berlingejm, Kalifornija, SAD) ili za DCX u normalnom zečjem (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase, Goat IgG #PK-6105, Vector Laboratories, Berlingejm, Kalifornija, SAD) serumu komercijalno dostupnih paketa za imunohistohemijsko bojenje, a u zavisnosti od tipa antitela koje je prethodno upotrebljeno.

Potom su preseci preko noći inkubirani na sobnoj temperaturi, sa sledećim primarnim antitelima: anti-Ki-67 (rabbit polyclonal IgG # ab15580, Abcam, Kembridž, Velika Britanija, razblaženje 1:3500); anti-DCX (goat polyclonal IgG #sc-8066, Santa Cruz Biotechnology, Dalas, Teksas, SAD, razblaženje 1:100); anti-PV (mouse monoclonal, IgG #P3088, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD, razblaženje 1:1000) i anti-GFAP (rabbit polyclonal IgG #z0334, DAKO, Santa Klara, Kalifornija, SAD, razblaženje 1:500).

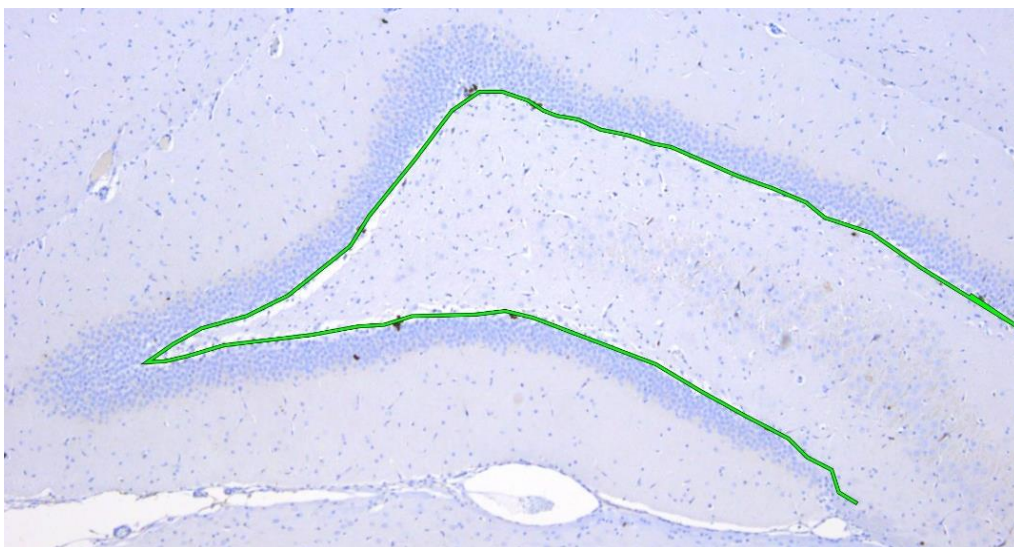
Nakon primarnog, usledila je inkubacija u trajanju od 1 h sa odgovarajućim sekundarnim antitelom koje je obeleženo biotinom, i to: za Ki-67 i GFAP kozje anti-zečje antitelo (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase, Rabbit IgG #PK-6101, Vector Laboratories, Berlingejm, Kalifornija, SAD); za PV konjsko anti-mišje antitelo (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase, Mouse IgG #PK-6102, Vector Laboratories, Berlingejm, Kalifornija, SAD); za DCX zečje anti-kozje antitelo (VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase, Goat IgG #PK-6105, Vector Laboratories, Berlingejm, Kalifornija, SAD). Potom, preseci su inkubirani tokom 1h u avidin-biotin kompleksu (ABC). Između svih pomenutih koraka, uzorci su ispirani 3 puta po 5 minuta u fosfatnom puferu (PBS, pH=7,4).

Vizuelizacija imunoreaktivnih mesta je izvršena upotrebom 3,3'-diaminobenzidin hromogena (DAB Substrate Kit, Peroxidase (HRP), 3,3'-diaminobenzidine #SK-4100, Vector Laboratories, Berlingejm, Kalifornija, SAD). Potom su preseći kontrastirani Majerovim hematoksilinom (Merck-Alkaloid, Skoplje, Severna Makedonija) u trajanju od 5 minuta, a potom i dehidrirani u seriji alkohola rastuće koncentracije. Na kraju procedure su preseći pokriveni pokrovnim staklom i medijumom za pokrivanje (DPX Slide Mounting Medium #44581, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD). Specifičnost bojenja je proverena izostavljanjem primarnog antitela, pri čemu imunoreaktivnost nije detektovana na ovim presecima.

3.3.8.3. Kvantifikovanje imunoreaktivnih ćelija

Imunohistohemijski preparati su analizirani na mikroskopu (Leica DM4000 B LED, Veclar, Nemačka) sa ugrađenom digitalnom kamerom (Leica DFC295, Veclar, Nemačka) uz primenu programskog paketa „*Leica Application Suite*” (LAS V.4.4.0, Veclar, Nemačka).

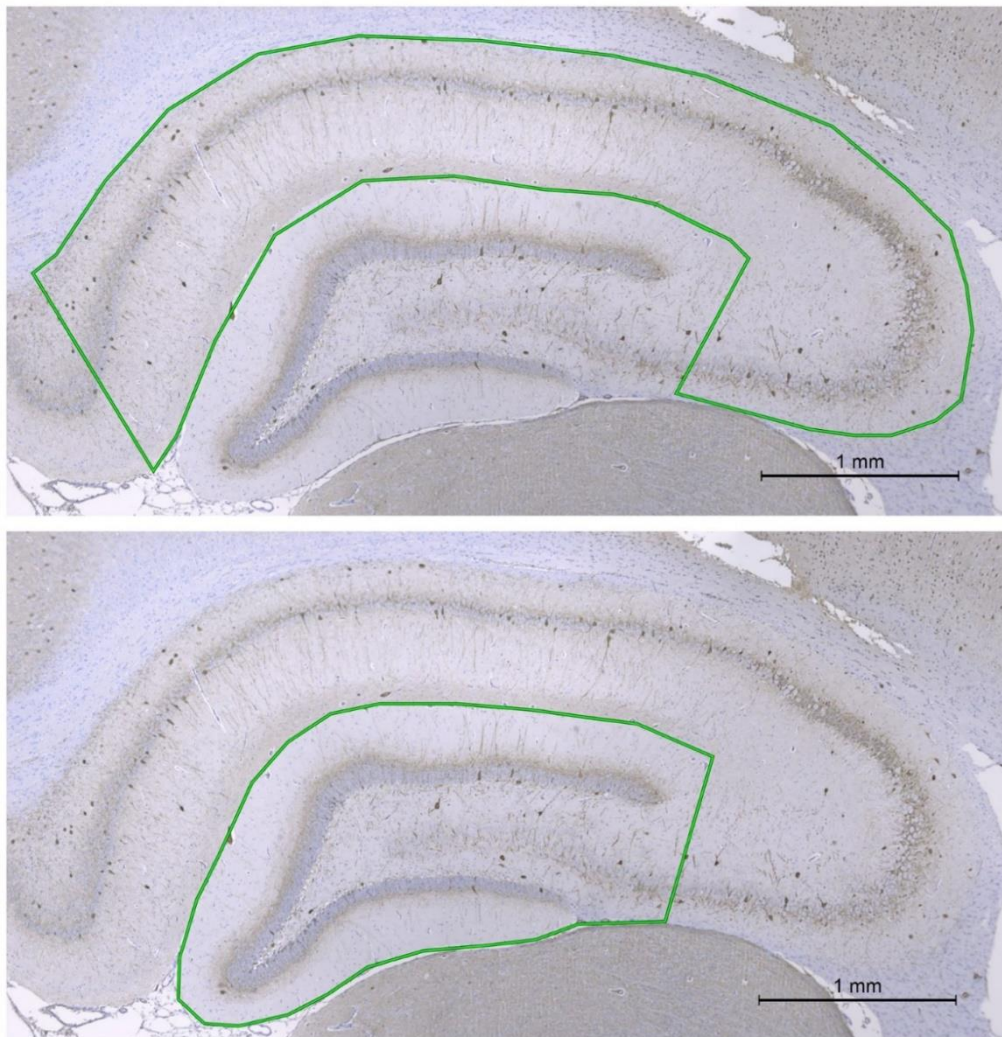
Kvantifikovanje Ki-67 i DCX imunoreaktivnih ćelija (Slika 3.3.8.3.1.) je urađena duž subgranularne zone (SGZ) hipokampusa, koja je prema podacima iz literature (Moon i sar. 2014) definisana kao granica između hilusa i sloja granularnih ćelija hipokampusa. Prvo je izmerena dužina SGZ pomoću programskom paketa „*Leica Application Suite*” (LAS V.4.4.0, Veclar, Nemačka), a potom su prebrojane Ki-67 ili DCX imunoreaktivne ćelije, ne uzimajući u obzir njihovu veličinu ili oblik. U cilju standardizacije ukupnog broja izbrojanih ćelija, broj Ki-67 ili DCX imunoreaktivnih ćelija je preračunat po 1 mm dužine SGZ hipokampusa.



Slika 3.3.8.3.1. Kvantifikovanje Ki-67 i DCX imunoreaktivnih ćelija duž subgranularne zone hipokampusa.

Reprezentativna fotomikrografija preseka hipokampusa obojenog na Ki-67 marker na kome je zelenom linijom označena SGZ duž koje je vršeno kvantifikovanje Ki-67 i DCX imunoreaktivnih ćelija. Uvećanje objektiva: 10x.

Kvantifikovanje PV imunoreaktivnih ćelija (Slika 3.3.8.3.2.) je izvršeno u svakoj hipokampalnoj regiji (CA1, CA2/3, DG) upotrebom istog, već navedenog, programskog paketa. Broj PV imunoreaktivnih ćelija u svakoj od navedenih regija hipokampusa, ponaosob, je izražen na 1 mm² ispitivane regije, kako bi se standardizovao broj prebrojanih ćelija.



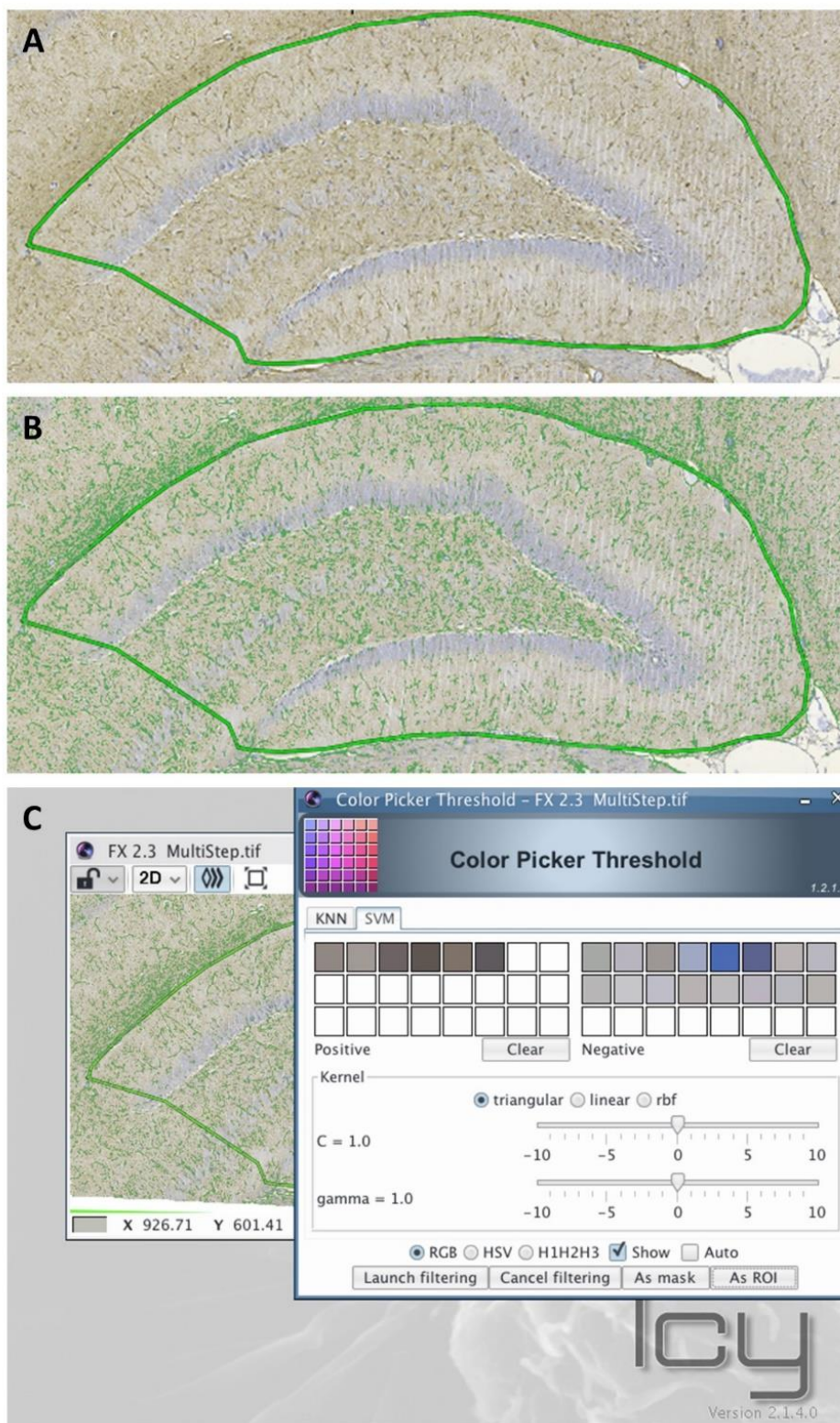
Slika 3.3.8.3.2. Kvantifikovanje PV imunoreaktivnih ćelija unutar regiona CA1, CA2/3 i dentatnog girusa (DG) hipokampusa.

Reprezentativni primer fotomikrografije preseka hipokampusa obojenog na PV marker na kome su zelenom linijom označeni regioni CA1-3 (gore) i region DG (dole). Uvećanje objektiva: 10x.

Kvantifikovanje GFAP imunoreaktivnosti (Slika 3.3.8.3.3.) je izvršeno u dentatnom girusu (DG) hipokampusa, korišćenjem „Color Picker Threshold Plugin“ dodatka u sklopu programskog paketa „Icy“ (Institut Pasteur, Pariz, Francuska i France BioImaging National Coordination Team, Monpelje, Francuska).

Prvi korak je podrazumevao da se pomoću dodatka „Color Picker Threshold Plugin“ označe: pozitivne boje (nekoliko nijansi braon boje koje reprezentuju GFAP imunoreaktivne ćelije obojene DAB-om) i negativne boje (plava, bela i svetlo braon boje koje predstavljaju jedra ćelija koja su kontrastirana hematoksilinom, obezbojeno tkivo i svetla, neselektivno obojena pozadina). Na osnovu ovog pravilnog odabira pozitivnih i negativnih boja, programski paket je u sledećem koraku merio površinu prekrivenu pozitivnim bojama (površina prekrivena GFAP imunoreaktivnim ćelijama).

Zastupljenost GFAP imunoreaktivnih ćelija je izražena relativnim odnosom između površine koju zauzimaju GFAP imunoreaktivne ćelije i ukupne površine regiona od interesa (dentatni girus hipokampusa).



Slika 3.3.8.3.3. Kvantifikovanje GFAP imunoreaktivnosti unutar dentatnog girusa (DG) hipokampusa.

Koraci u obradi reprezentativne fotomikrografije preseka hipokampusa obojenog na GFAP marker na kome je zelenom linijom označen region DG pre (A) i nakon (B) obeležavanja GFAP imunoreaktivnih ćelija izdvajanjem pozitivnih i negativnih boja. Deo dentatnog girusa hipokampusa sa GFAP imunoreaktivnim ćelijama koje su prepoznate pomoću Color Picker Threshold Plugin-a je prikazan na delu slike (C). Uvećanje objektiv: 10x.

3.4. Statistička analiza i obrada podataka

Odabir testa za procenu statističke značajnosti međugrupne i unutargrupne razlike vrednosti određene varijable, kao i način prikaza rezultata su zavisili od rezultata testiranja hipoteze o normalnoj distribuciji podataka upotrebom Kolmogorov-Smirnov testa. Varijable čije su vrednosti bile normalno distribuirane, prikazane su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD), dok su varijable čije vrednosti nisu pokazivale normalnu distribuciju prikazane medijanom sa 25. i 75. percentilom i opsegom minimum-maksimum.

U zavisnosti od broja grupa u međugrupnom poređenju, za ispitivanje statističke značajnosti u razlici ispitivane varijable sa normalnom raspodelom, korišćen je studentov t-test ili jednosmerni ANOVA test sa Tukey-Kramer LSD *post hoc* testom. Za ispitivanje statističke značajnosti u razlici ispitivane varijable koja ne pokazuje normalnu raspodelu, korišćen je Mann-Whitney U test ili Kruskal-Wallis ANOVA test sa Mann-Whitney U *post hoc* testom. Za određivanje statističke značajnosti međugrupne razlike incidence i distribucije gradusa napada, korišćen je Fišerov test tačne verovatnoće.

Pirsonov test korelacije je korišćen u cilju utvrđivanja oblika povezanosti između nivoa MDA u strukturama mozga, koncentracije kortikosterona u serumu i glavnih izlaznih varijabli u etološkim testovima za procenu ponašanja povezanog sa anksioznošću, kao i za utvrđivanja oblika povezanosti broja PV+ interneurona u CA1 i CA2/3 regijama i DG hipokampusa sa izlaznim varijablama etoloških testovima za procenu anksioznosti.

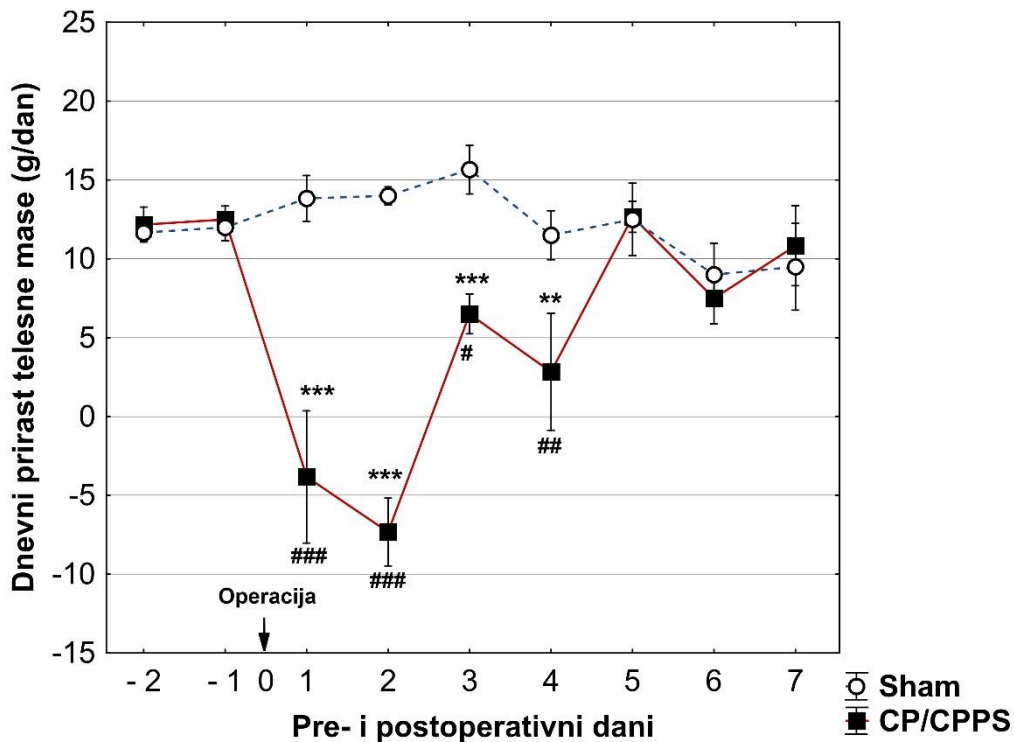
Statistički značajnim smatralo se ako je p vrednost bila $<0,05$, dok se visoko statistički značajnim smatralo ako je p vrednost bila $<0,01$ ili $<0,001$.

U grafičkoj obradi i dizajnu određenih slika, korišćeni su *online* alati (BioRender.com).

4. REZULTATI

4.1. Uticaj CP/CPSS na dnevni prirast u telesnoj masi

Telesna masa (g) svih životinja iz grupa Sham i CP/CPSS je merena u preoperativnom i postoperativnom periodu, a potom je preračunat dnevni prirast u telesnoj masi za preoperativni period u bazalnim uslovima (2 i 1 dan pre operacije), kao i za postoperativni period (od 1. do 7. postoperativnog dana). Analiza dnevnog prirasta u telesnoj masi je pokazala da u bazalnim uslovima u 2. i 1. preoperativnom danu ne postoji statistički značajna razlika između kontrolnih i eksperimentalnih životinja (Sham vs. CP/CPSS, $p>0,05$). Takođe, kod kontrolnih životinja, prilikom merenja dnevnog prirasta u telesnoj masi u svim postoperativnim danima nije utvrđeno postojanje razlike u odnosu na početne, bazalne vrednosti ($p>0,05$, Slika 4.1.). Životinje iz grupe CP/CPSS su pokazale statistički značajno manji dnevni prirast u telesnoj masi u 1., 2. i 3. (Sham vs. CP/CPSS, $p<0,001$), kao i u 4. (Sham vs. CP/CPSS, $p<0,01$) postoperativnom danu u poređenju sa životinjama iz Sham grupe (Slika 4.1.) Odnosno, kod ovih životinja je u 1. i 2. postoperativnom danu postojao dnevni gubitak u telesnoj masi. Dodatno, eksperimentalne životinje iz grupe CP/CPSS su pokazale visoko statistički značajno manji dnevni prirast u telesnoj masi u 1. i 2. ($p<0,001$), 3. ($p<0,05$), kao i u 4. ($p<0,01$) postoperativnom danu, u poređenju sa preoperativnim vrednostima (vs. -1, Slika 4.1.).



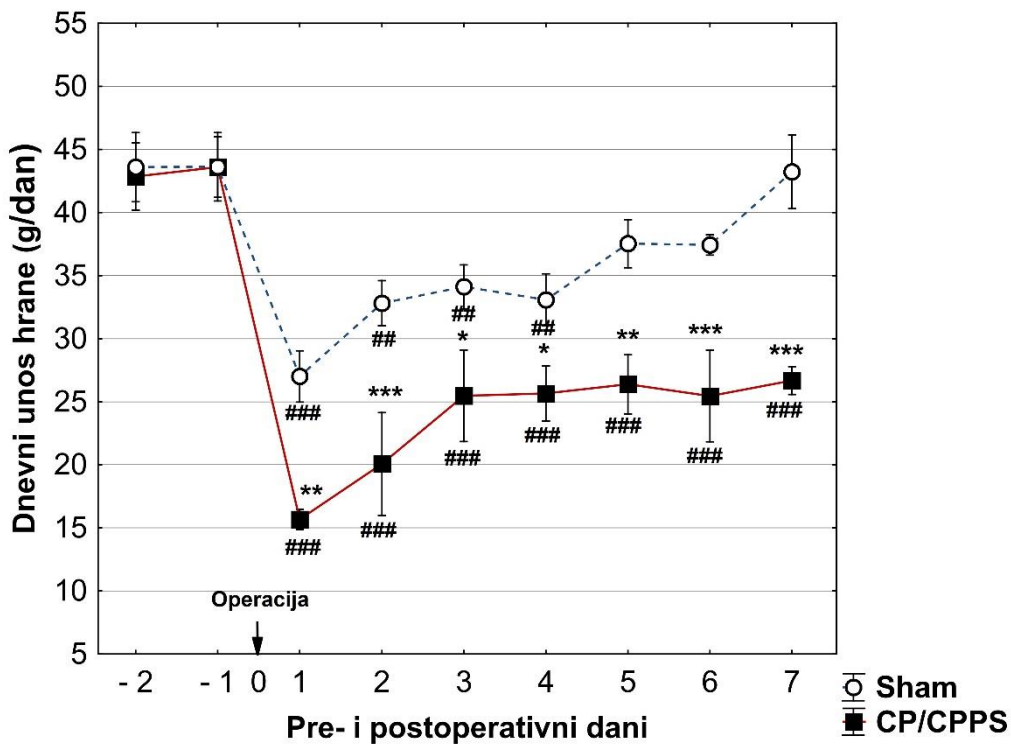
Slika 4.1. Dnevni prirast u telesnoj masi kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Dnevni prirast u telesnoj masi je meren u bazalnim uslovima, tj. 2. i 1. dan pre, kao i od 1. do 7. postoperativnog dana. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika u dnevnom prirastu telesne mase između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa ($**p<0,01$, $***p<0,001$, vs. Sham), a značajnost razlika unutar grupe je procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($\#p<0,05$, $\#\#p<0,01$, $\#\#\#p<0,001$, vs. -1). U zavisnosti od intraprostaticnog tretmana, životinje su podeljene u dve grupe: Sham (kontrolna grupa, intraprostaticna injekcija 0,9% NaCl) i CP/CPSS grupa (intraprostaticna injekcija 3% λ -karagenina).

4.2. Uticaj CP/CPSS na dnevni unos hrane

Sve životinje iz grupa Sham i CP/CPSS su imale pristup vodi i hrani *ad libitum*, a dnevni unos hrane (g) je meren u preoperativnom i postoperativnom periodu, a potom je preračunat dnevni unos hrane (g/dan) za preoperativni period u bazalnim uslovima (2. i 1. dan pre operacije), kao i za postoperativni period (od 1. do 7. postoperativnog dana). U bazalnim uslovima nije opservirana razlika u dnevnom unosu hrane između kontrolnih i eksperimentalnih životinja (Sham vs. CP/CPSS, $p > 0,05$, Slika 4.2.). Životinje sa eksperimentalno izazvanim CP/CPSS su pokazale statistički značajno manji dnevni unos hrane u 1. ($p < 0,01$), 2. ($p < 0,001$), 3. i 4. ($p < 0,05$), 5. ($p < 0,01$), kao i 6. i 7. ($p < 0,001$) postoperativnom danu u poređenju sa životinjama iz kontrolne grupe (Sham vs. CP/CPSS, Slika 4.2.). Takođe, životinje iz grupe CP/CPSS su pokazale visoko statistički značajno manji dnevni unos hrane u svim postoperativnim danima ($p < 0,001$) u poređenju sa preoperativnim vrednostima (vs. -1, Slika 4.2.).

Za životinje iz grupe Sham je utvrđeno postojanje statistički značajno manjeg dnevnog unosa hrane samo u 1. postoperativnom danu ($p < 0,001$), kao i u 2., 3. i 4. postoperativnom danu ($p < 0,01$) u odnosu na vrednosti pre operacije, dok je u ostalim postoperativnim danima (5. – 7.) nije bilo razlike u odnosu na preoperativni period (vs. -1, $p > 0,05$, Slika 4.2.).

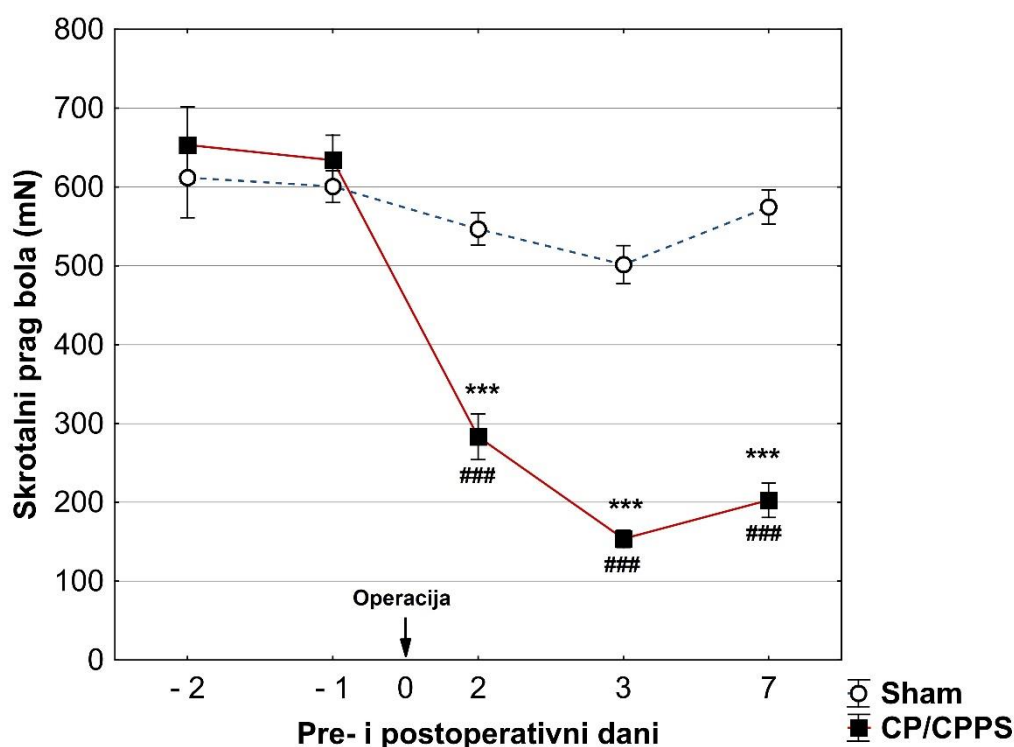


Slika 4.2. Dnevni unos hrane kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Dnevni unos hrane je meren u bazalnim uslovima, tj. 2. i 1. dan pre, kao i od 1. do 7. postoperativnog dana. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statička značajnost razlike u dnevnom unosu hrane između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, vs. Sham), dok je značajnost razlika unutar grupe procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($##p < 0,01$, $###p < 0,001$, vs. -1). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

4.3. Uticaj CP/CPPS na skrotalni prag bola na mehaničku draž

Skrotalni prag bola na mehaničku draž je utvrđivan kod svih životinja iz grupa Sham i CP/CPPS u preoperativnom periodu (bazalni uslovi, 2. i 1. dan pre operacije), kao i u postoperativnom periodu (2., 3. i 7. dana nakon operacije). U bazalnim uslovima, nije opservirana razlika u skrotalnom pragu bola između kontrolnih i eksperimentalnih životinja (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.3.). Takođe, kod životinja iz grupe Sham, prilikom merenja praga bola u 2., 3. i 7. postoperativnom danu nije utvrđeno postojanje razlike u odnosu na bazalne vrednosti (vs. -1, $p > 0,05$, Slika 4.3.). Životinje sa eksperimentalno izazvanim CP/CPPS su pokazale statistički visoko značajno smanjenje skrotalnog praga bola na mehaničku draž u 2., 3. i 7. postoperativnom danu u poređenju sa životinjama iz kontrolne grupe (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,001$, Slika 4.3.). Takođe, kod eksperimentalnih životinja je utvrđeno postojanje visoko statistički značajnog smanjenja praga bola na mehaničku draž u 2., 3. i 7. postoperativnom danu u poređenju sa preoperativnim vrednostima (vs. -1, $p < 0,001$, Slika 4.3.).



Slika 4.3. Skrotalni prag bola kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Životinje su testirane evF esteziometrom 2. i 1. dana pre, kao i 2., 3. i 7. dana nakon operacije. Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika u skrotalnom pragu bola između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa ($***p < 0,001$, vs. Sham), dok je značajnost unutargrupne razlike procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($###p < 0,001$, vs. -1). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

4.4. Bihevioralni testovi

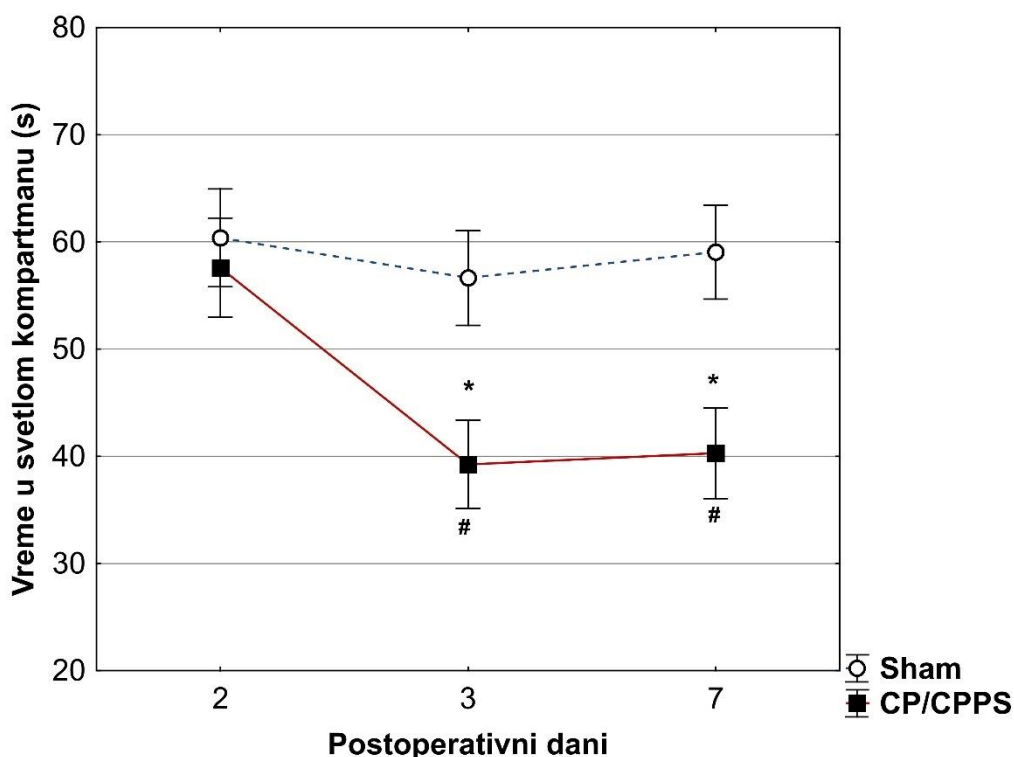
Kod svih Sham i CP/CPPS životinja su sprovedeni testovi u cilju procene ponašanja povezanog sa anksioznošću, ponašanja povezanog sa depresijom i kognitivnog ponašanja.

4.4.1. Uticaj CP/CPPS na ponašanje povezano sa anksioznošću

U cilju ispitivanja postojanja ponašanja povezanog sa anksioznošću, sve životinje iz grupa Sham i CP/CPPS su 2., 3., i 7. postoperativnog dana podvrgnute standardnoj bateriji tri etološka testa: test svetlo/tama (L/D), test uzdignutog krstastog lavirinta (EPM) i test otvorenog polja (OF).

Ponašanje pacova u testu svetlo/tama

Parametri testa koji su praćeni u ovom testu su: vreme koje životinja provodi u svetlom kompartmanu kao i broj tranzicija iz svetlog u tamni kompartman. Analiza je pokazala da je 3. i 7. postoperativnog dana vreme provedeno u svetlom kompartmanu bilo statistički značajno kraće kod životinja iz grupe CP/CPPS u poređenju sa kontrolnim Sham životinjama (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,05$, Slika 4.4.1.1.). Navedeni parametar testa nije pokazivao statistički značajnu međugrupnu razliku u 2. postoperativnom danu (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.4.1.1.).

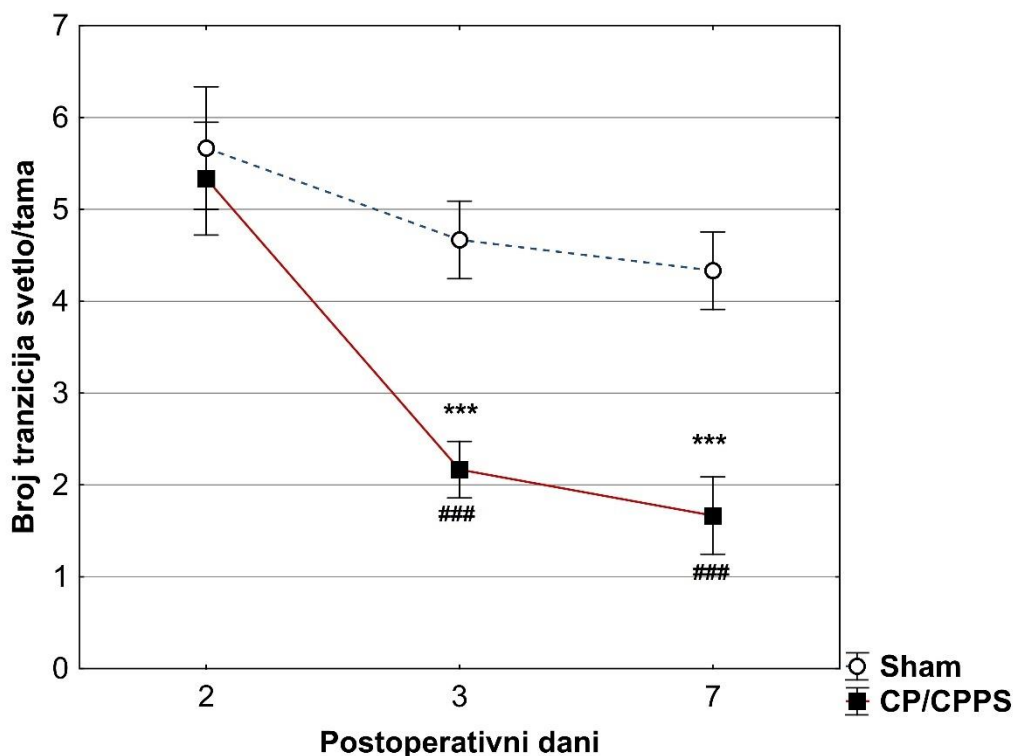


Slika 4.4.1.1. Vreme provedeno u svetlom kompartmanu u testu svetlo/tama kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa ($*p < 0,05$, vs. Sham), dok je značajnost unutargrupnih razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($\#p < 0,05$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Slična razlika je opservirana u pogledu broja tranzicija iz svetlog u tamni kompartman u 3. i 7. postoperativnom danu kod životinja grupe CP/CPPS, u poređenju sa kontrolnim Sham životinjama (CP/CPPS vs. Sham, $p < 0,001$, Slika 4.4.1.2.). Ovaj parametar testa se nije statistički značajno razlikovao među navedenim grupama u 2. postoperativnom danu (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.4.1.2.).

Dodatna unutargrupna analiza ovih parametara kod životinja iz grupe CP/CPPS je pokazala da su ove životinje u 3. i 7. postoperativnom danu provele statistički značajno manje vremena u svetlom kompartmanu ($p < 0,05$, Slika 4.4.1.1.) i napravile statistički značajno manji broj tranzicija ($p < 0,001$, Slika 4.4.1.2.), u poređenju sa vrednostima u 2. postoperativnom danu.



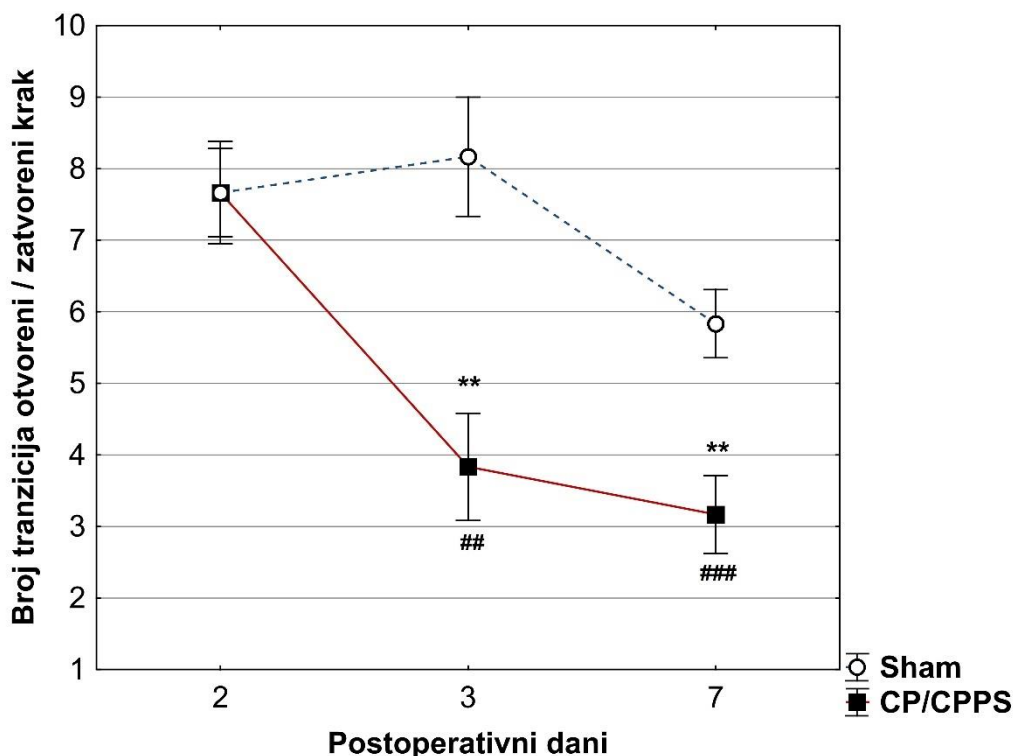
Slika 4.4.1.2. Broj tranzicija iz svetlog u tamni kompartman u testu svetlo/tama kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa ($***p < 0,001$, vs. Sham), dok je značajnost unutargrupnih razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($###p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Ponašanje pacova u testu uzdignutog krstastog lavirinta

Parametri testa koji su praćeni u ovom testu su broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta, kao i vreme koje životinja provodi u otvorenim kracima.

Intraprostaticna injekcija 3% λ -karagenina (CP/CPPS grupa) je u 3. i 7. postoperativnom danu statistički značajno smanjila broj tranzicija koje su životinje napravile između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,01$, Slika 4.4.1.3.), u poređenju sa kontrolnim tretmanom 0,9% NaCl (Sham grupa).

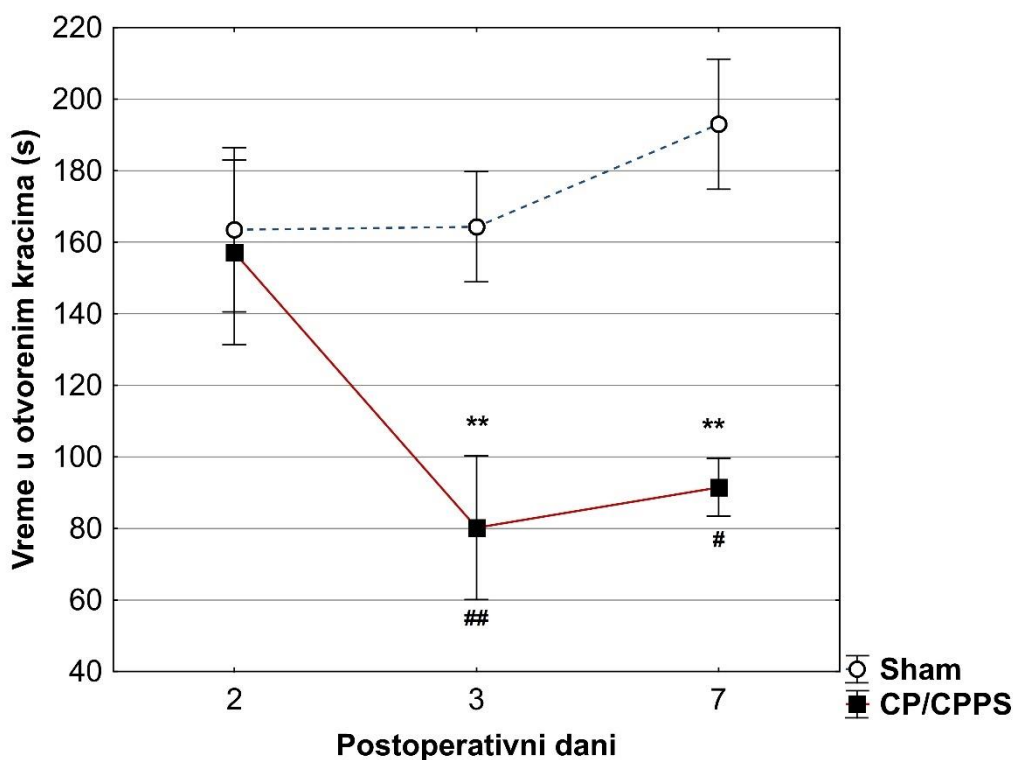


Slika 4.4.1.3. Broj tranzicija iz otvorenih u zatvorene krake u testu uzdignutog krstastog lavirinta kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa (** $p < 0,01$, vs. Sham), dok je značajnost unutargrupnih razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom (## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Takođe, postojalo je i statistički značajno smanjenje vremena koje su životinje u 3. i 7. postoperativnom danu provodile u otvorenim kracima (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,01$, Slika 4.4.1.4.). U 2. postoperativnom danu, razlika između kontrolnih i eksperimentalnih životinja u vremenu provedenom u otvorenim kracima nije bila statistički značajna (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.4.1.4.).

Unutargupna distribucija parametara ponašanja ovog testa je kod CP/CPPS životinja pokazala da su one tokom 3. postoperativnog dana, u odnosu na 2. postoperativni dan, napravile statistički značajno manji broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova ($p < 0,01$, Slika 4.4.1.3.), kao i to da su provele statistički značajno manje vremena u otvorenim kracima lavirinta ($p < 0,01$, Slika 4.4.1.4.). Slična opservacija je uočena i 7. postoperativnog dana u pogledu broja tranzicija ($p < 0,001$, Slika 4.4.1.3.) i vremena provedenog u otvorenim kracima lavirinta ($p < 0,05$, Slika 4.4.1.4.).



Slika 4.4.1.4. Vreme provedeno u otvorenim kracima u testu uzdignutog krstastog lavirinta kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa (** $p < 0,01$ vs. Sham), dok je značajnost unutargrupnih razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

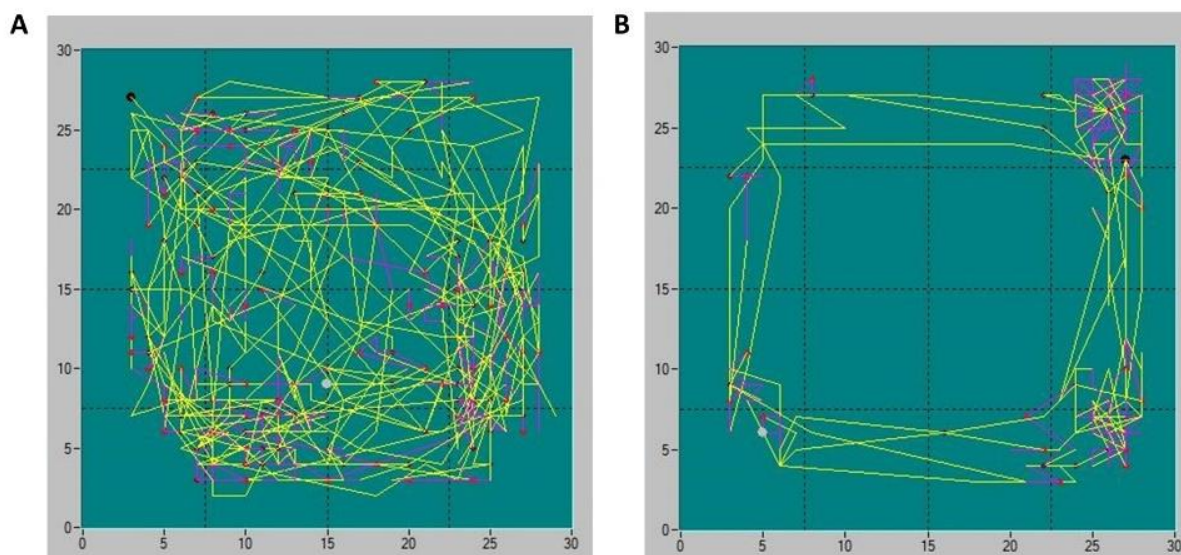
Ponašanje pacova u testu otvorenog polja

U cilju analize spontane lokomotorne aktivnosti, OF testu su podvrgnute sve životinje iz grupa Sham i CP/CPPS, i to 2., 3. i 7. postoperativnog dana.

Parametri testa koji su praćeni su u ovom testu su ukupni pređeni put (cm) i ukupno vreme ambulatornog kretanja (s), kao parametri horizontalne lokomotorne aktivnosti, dok je kao parametar vertikalne lokomotorne aktivnosti utvrđen ukupni broj propinjanja na zadnje ekstremitete.

Kao direktni pokazatelji ponašanja povezanog sa anksioznošću, utvrđeno je vreme provedeno u centru otvorenog polja (s), a dodatno je izračunat i indeks tigmotaksije (%).

Analiza registrovane lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja je pokazala različite obrasce ponašanja životinja iz kontrolne i eksperimentalne grupe. Na Slici 4.4.1.5. su prikazani reprezentativni snimci trajektorije kretanja životinja iz Sham (A) i CP/CPPS grupe (B).



Slika 4.4.1.5. Reprezentativni obrazac horizontalne i vertikalne lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja kod kontrolnih (A) i eksperimentalnih životinja (B)

Testiranje u otvorenom polju je vršeno tokom 15 minuta, pojedinačno za svaku životinju. Automatsko registrovanje spontane lokomotorne aktivnosti je izvršeno pomoću sistema infracrvenih senzora, a potom je analizirano upotrebom pratećeg programskog paketa (Conducta 1.0).

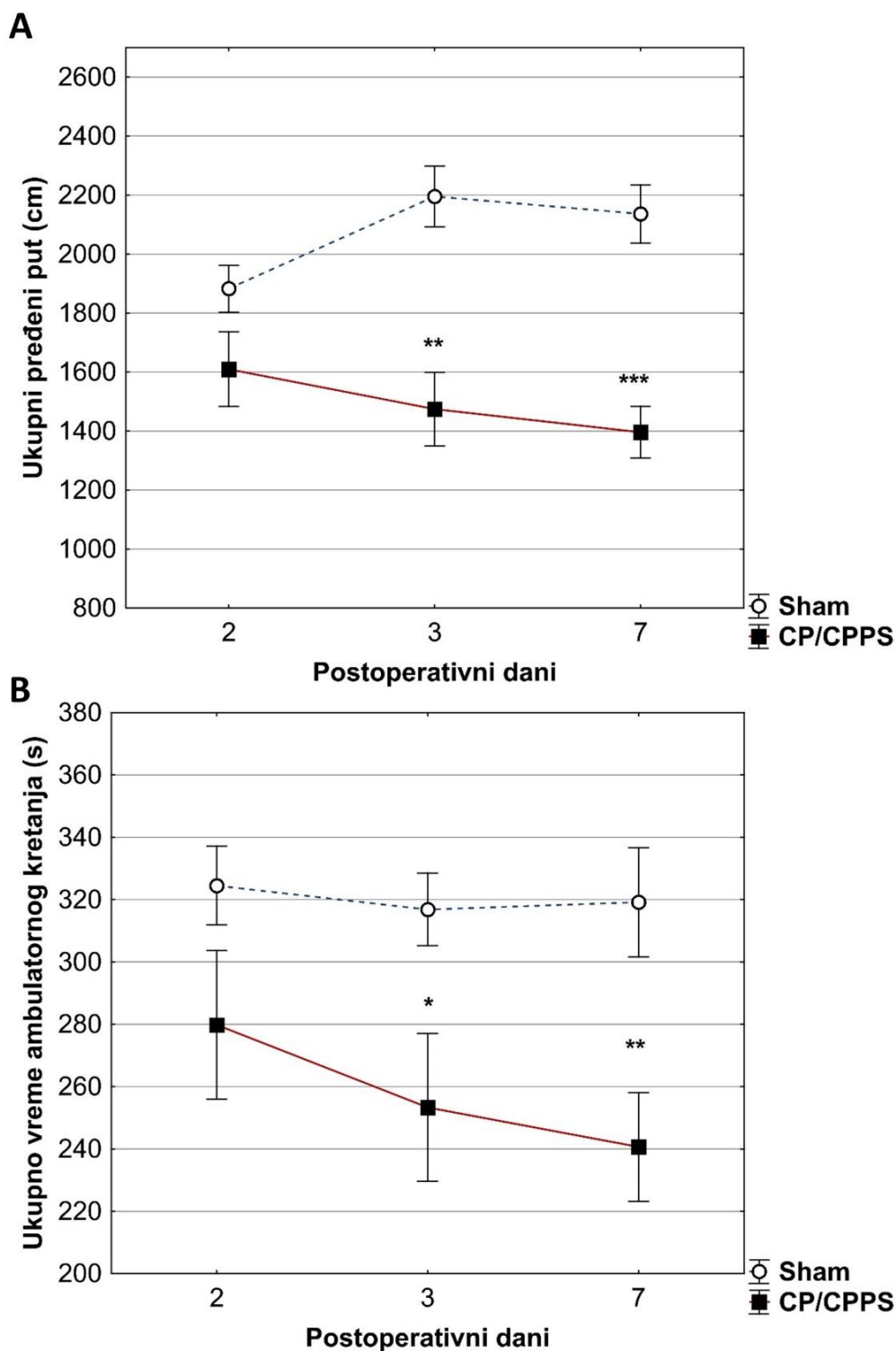
Analiza horizontalne lokomotorne aktivnosti je izvršena posmatranjem vrednosti ukupnog pređenog puta i ukupnog vremena ambulatornog kretanja.

Pokazano je da su eksperimentalne životinje prešle ukupno kraći put tokom 3. ($p < 0,01$) i 7. postoperativnog dana ($p < 0,001$), u poređenju sa kontrolnim životinjama. U 2. postoperativnom danu razlika ovog parametra između Sham i CP/CPPS životinja nije bila statistički značajna (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.4.1.6.A.).

Takođe, ukupno vreme ambulatornog kretanja kod životinja iz grupe CP/CPPS, u poređenju sa kontrolnim životinjama je bilo statistički značajno kraće u 3. ($p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$), dok se u 2. postoperativnom danu ono nije statistički značajno razlikovalo (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.4.1.6.B.).

Analiza unutargrupne distribucije vrednosti ovih parametara kod Sham i CP/CPPS životinja je pružila uvid u dinamiku razvoja ponašanja povezanog sa anksioznošću.

U 3. i 7. postoperativnom danu, u odnosu na 2. postoperativni dan, kod CP/CPPS životinja je došlo do smanjenja ukupnog pređenog puta i smanjenja ukupnog vremena ambulatornog kretanja, ali ono nije bilo statistički značajno (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$ Slika 4.4.1.6.A.,B.).

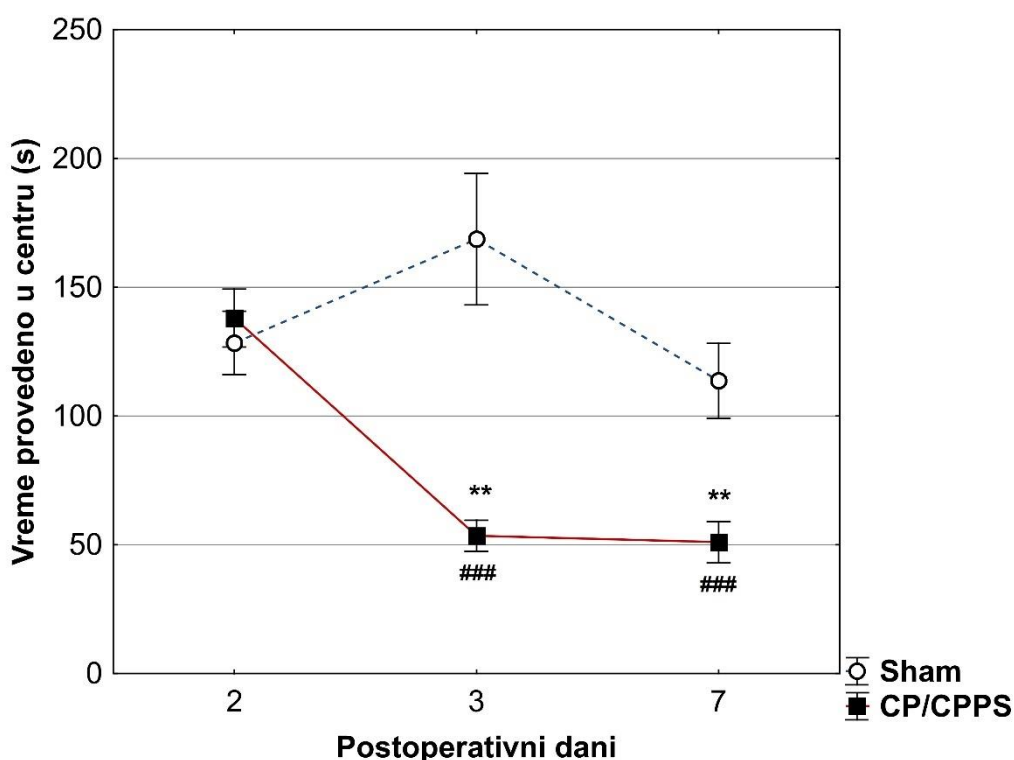


Slika 4.4.1.6. Ukupni pređeni put (A) i ukupno vreme ambulatornog kretanja (B) u testu otvorenog polja kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ vs. Sham), dok je značajnost unutargrupnih razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($p > 0,05$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Specifični parametar lokomotorne aktivnosti koji je pokazatelj anksioznog ponašanja, kao što je vreme provedeno u centru otvorenog polja, značajno se razlikovao među ispitivanim grupama. Životinje koje su tretirane intraprostatičnom injekcijom λ -karagenina (CP/CPPS grupa) su u 3. ($p < 0,01$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$) provele statistički značajno manje vremena u centru otvorenog polja, u odnosu na životinje tretirane intraprostatičnom injekcijom 0,9% NaCl (Sham grupa). U 2. postoperativnom danu, nije postojala statistički značajna međugrupna razlika u ovom ispitivanom parametru (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.4.1.7.).

Unutargupna distribucija ovog parametra kod Sham životinja nije pokazivala statističku značajnost u poređenju 3. i 7. sa 2. postoperativnim danom ($p > 0,05$). Sa druge strane, unutargrupna analiza kod CP/CPPS životinja je pokazala da su one provele statistički značajno manje vremena u centru otvorenog polja u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$, Slika 4.4.1.7.), u odnosu na 2. postoperativni dan.

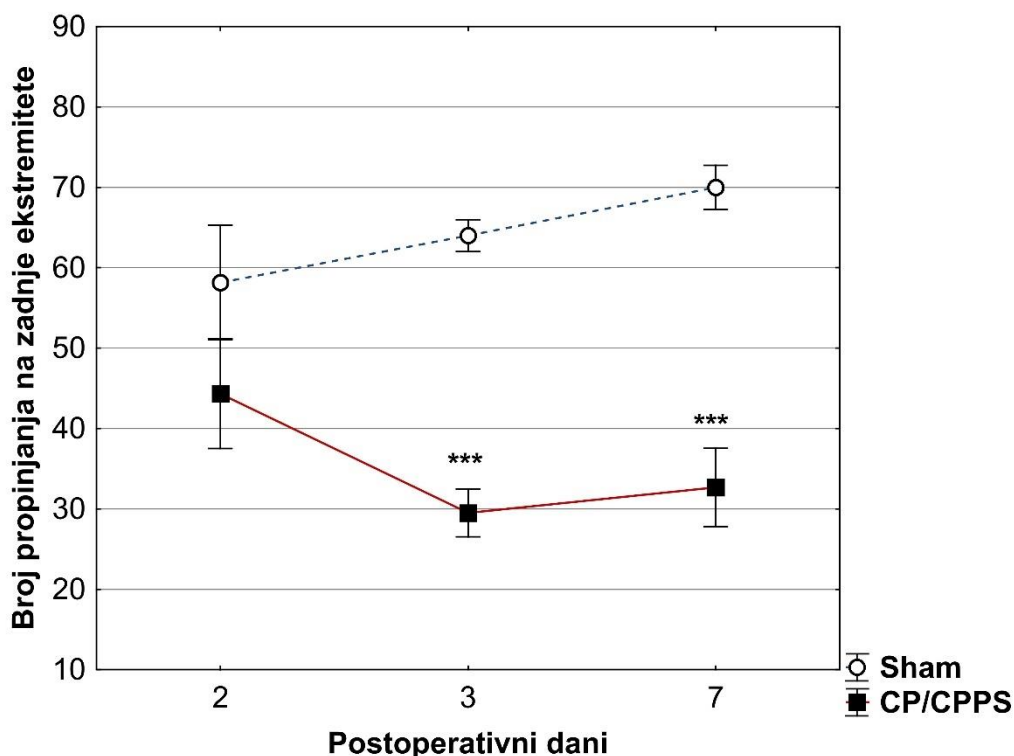


Slika 4.4.1.7. Vreme provedeno u centru otvorenog polja kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa (** $p < 0,01$, vs. Sham), dok je značajnost unutargrupnih razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom (### $p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Analiza vertikalne lokomotorne aktivnosti je pokazala da su CP/CPPS životinje u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) napravile statistički značajno manji broj propinjanja na zadnje ekstremitete u odnosu na Sham životinje. U 2. postoperativnom danu, nije postojala statistički značajna međugrupna razlika u ovom ispitivanom parametru (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.4.1.8.).

Unutargrupna analiza ovog parametra kod CP/CPPS i Sham životinja, u pogledu vrednosti u 3. i 7. postoperativnom danu, u odnosu na 2. nije pokazivala statističku značajnost ($p > 0,05$, Slika 4.4.1.8.).

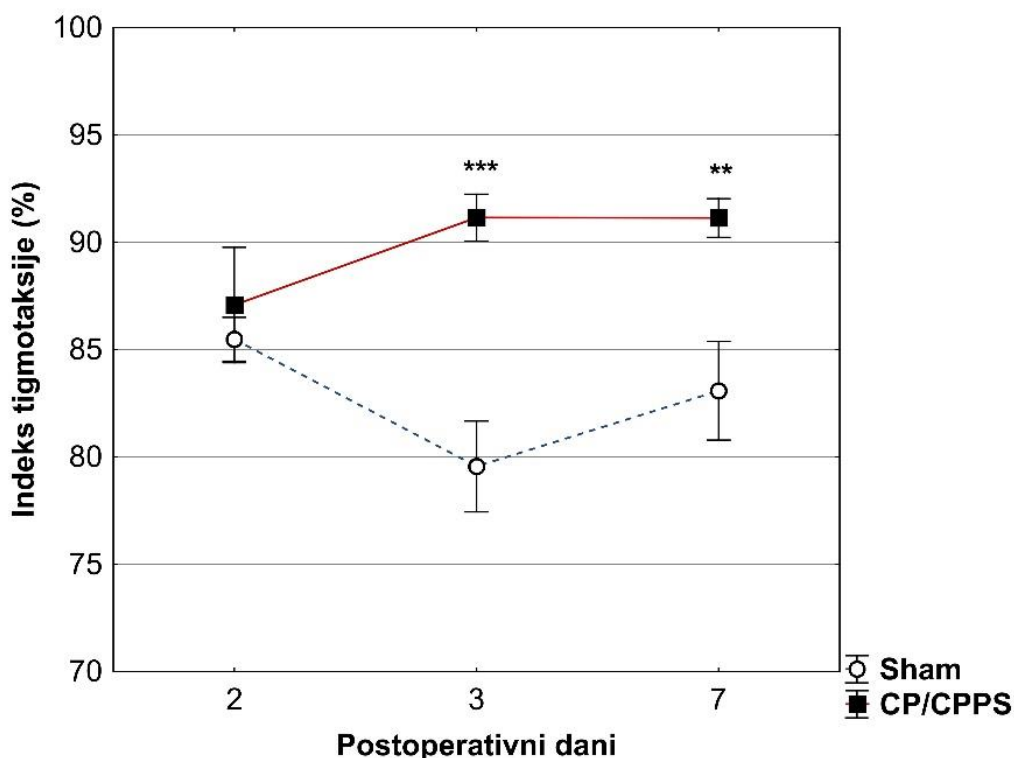


Slika 4.4.1.8. Broj propinjanja na zadnje ekstremitete u testu otvorenog polja kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa ($***p < 0,001$ vs. Sham), dok je značajnost unutargrupnih razlika procenjena upotrebom *one-way ANOVA* sa *Tukey-Kramer LSD post hoc* testom ($p > 0,05$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Indeks tigmataksije bio je statistički značajno veći u eksperimentalnoj nego u kontrolnoj grupi tokom 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnog dana ($p < 0,01$), dok u 2. postoperativnom danu nije postojala statistički značajna međugrupna razlika u ovom ispitivanom parametru (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.4.1.9.).

Unutargrupna analiza distribucije ovog parametra kod CP/CPPS i Sham životinja tokom 3. i 7. postoperativnog dana, u odnosu na 2. postoperativni dan, nije pokazivala statistički značajnu razliku ($p > 0,05$, Slika 4.4.1.9.).



Slika 4.4.1.9. Indeks tigmatksije u testu otvorenog polja kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Sham), dok je unutargrupna razlika procenjena upotrebom one-way ANOVA sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($p > 0,05$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

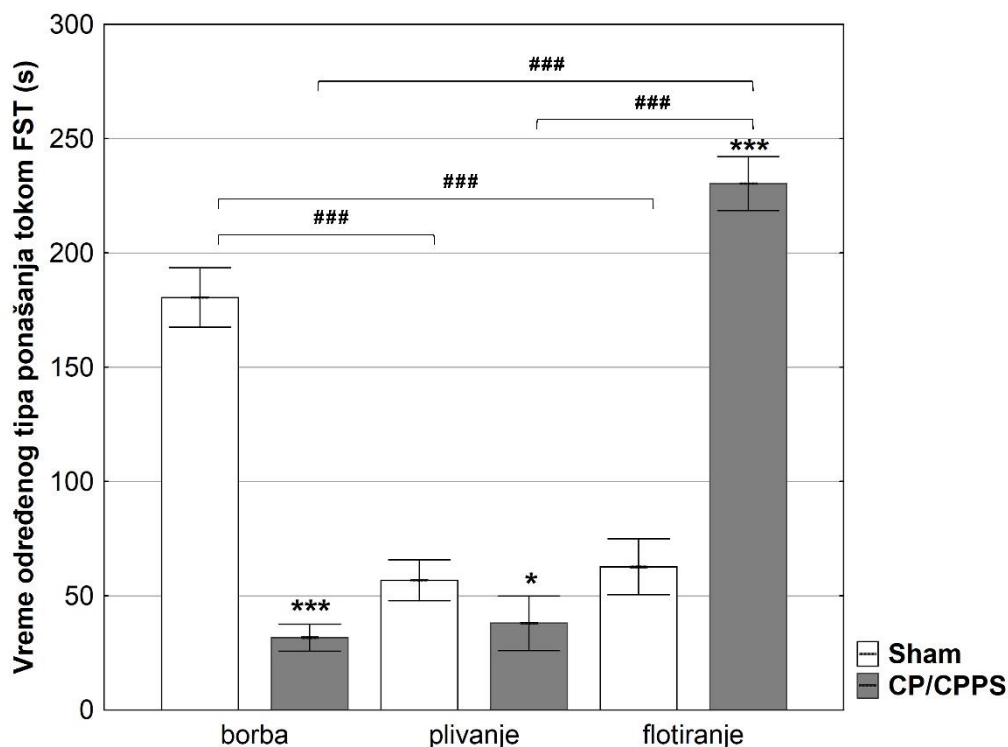
4.4.2. Uticaj CP/CPPS na ponašanje povezano sa depresijom

U cilju utvrđivanja ponašanja povezanog sa depresijom, sve životinje iz grupa Sham i CP/CPPS su 7. postoperativnog dana podvrgnute testu forsiranog plivanja, tokom koga je opservirana distribucija tri tipa ponašanja: borba, plivanje, flotiranje.

Pacovi sa eksperimentalno indukovanim CP/CPPS su proveli statistički značajno manje vremena u borbi ($p < 0,001$) i plivanju ($p < 0,05$), kao i statistički značajno više vremena u flotiranju ($p < 0,001$), u poređenju sa pacovima iz kontrolne Sham grupe (Sham vs. CP/CPPS, Slika 4.4.2.).

Analiza unutargrupne distribucije ponašanja pokazala je da kod CP/CPPS životinja predominantni oblik ponašanja bio flotiranje koje je trajalo statistički značajno duže u poređenju sa borbom ($p < 0,001$) i plivanjem ($p < 0,001$, Slika 4.4.2.).

Ista analiza je pokazala da su Sham pacovi najviše vremena proveli u borbi koja je trajala statistički značajno duže u poređenju sa plivanjem ($p < 0,001$) i flotiranjem ($p < 0,001$, Slika 4.4.2.).



Slika 4.4.2. Distribucija i trajanje različitih tipova ponašanja tokom FST kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Vreme provedeno u borbi, plivanju i flotiranju je izraženo kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Sham), dok je unutargrupna razlika procenjena upotrebom *one-way ANOVA* sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom (### $p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

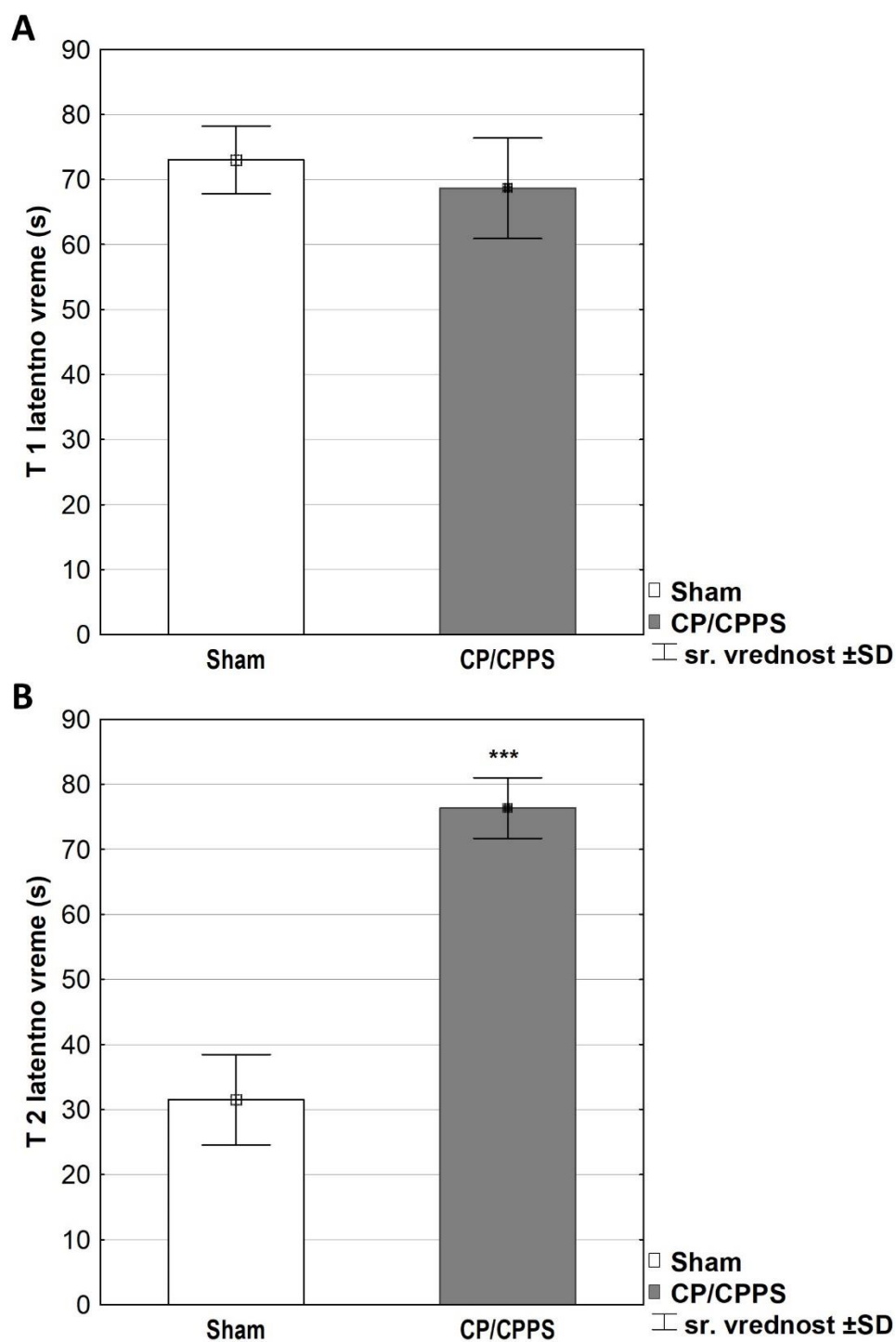
4.4.3. Uticaj CP/CPPS na učenje i pamćenje

U cilju procene kognitivnog ponašanja i kognitivnih funkcija, učenja i pamćenja, sve životinje iz grupa Sham i CP/CPPS su 6. i 7. postoperativnog dana podvrgnute modifikovanom testu uzdignutog krstastog lavirinta.

Tokom prvog dana testa (predtest, 6. postoperativni dan), zabeleženo je latentno vreme transfera životinje iz otvorenog u zatvoreni krak (T1 latentno vreme), a potom je za 24 h, procedura ponovljena (retencija, 7. postoperativni dan) i zabeleženo je T2 latentno vreme.

Tokom predtesta nije utvrđena statistički značajna razlika u trajanju T1 latentnog vremena između CP/CPPS i Sham životinja (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.4.3.A.).

Test retencije je pokazao da su životinje sa eksperimentalnim CP/CPPS imale statistički značajno kraće T2 latentno vreme (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,001$, Slika 4.4.3.B) u poređenju sa kontrolnim životinjama.



Slika 4.4.3. Latentno vreme transfera tokom predtesta (A) i retencije (B) u modifikovanom testu uzdignutog krstastog lavirinta kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Latentno vreme transfera iz otvorenog u zatvoreni krak tokom predtesta (T1 latentno vreme) i retencije (T2 latentno vreme) je izraženo kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa (** $p < 0,001$ vs. Sham).

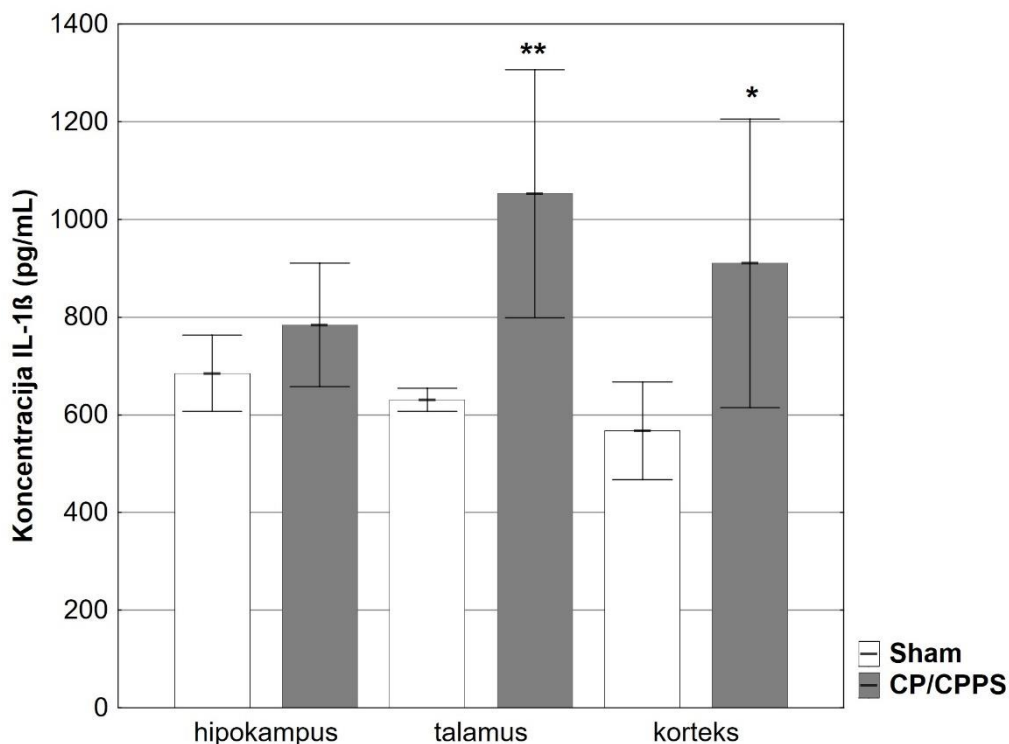
4.5. Biohemijske analize

Nakon opažanja bihejvioralnih odstupanja kod CP/CPPS životinja, u daljem toku istraživanja mogućih mehanicističkih razloga, u cilju ispitivanja hipoteze o širenju perifernog inflamatornog procesa, biohemijskim analizama je utvrđena koncentracije IL-1 β i IL-6 u strukturama mozga, prostati i serumu. Kako su inflamacija i oksidativni stres u tesnoj vezi i povezani sličnim unutarćelijskim putevima, procenjivani su i parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, koncentracija MDA i tiol grupa (P-SH), kao i aktivnost enzima SOD i GPx u strukturama mozga. S obzirom da je ICAM-1 glavni regulator regrutacije leukocita tokom zapaljenskih procesa, merena je i njegova proteinska ekspresija u strukturama mozga. Sve vrednosti su poređene u odnosu na Sham životinje.

4.5.1. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju IL-1 β i IL-6 u strukturama mozga, prostati i serumu

Sve životinje iz grupa Sham i CP/CPPS su 7. postoperativnog dana, nakon završetka bihejvioralnih testova, žrtvovane na adekvatan način, te su uzorkovani krv, izolovane prostate i mozgovi. Određivana je koncentracija IL-1 β i IL-6 u homogenatima izolovanih struktura mozga (hipokampus, talamus, korteks), homogenatima prostate i serumu.

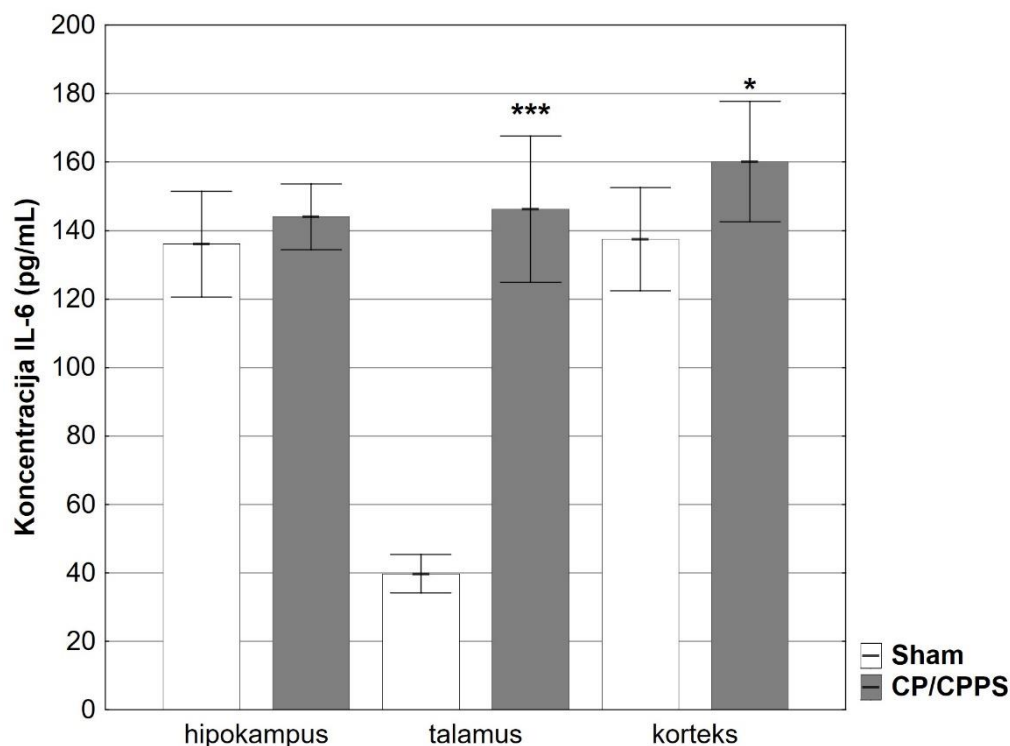
Inflamacija prostate indukovana intraprostatičnom injekcijom 3% λ -karagenina dovela je do povećanja parametara inflamacije u CNS jer je došlo do značajnog porasta koncentracije IL-1 β u talamusu ($p < 0,01$) i cerebralnom korteksu ($p < 0,05$) životinja grupe CP/CPPS u poređenju sa životinjama iz Sham grupe (Sham vs. CP/CPPS, Slika 4.5.1.1.). Koncentracija IL-1 β u hipokampusu životinja sa CP/CPPS, u odnosu na Sham životinje, nije se razlikovala (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.5.1.1.).



Slika 4.5.1.1. Koncentracija IL-1 β u strukturama mozga kod Sham i CP/CPPS životinja

Koncentracije interleukina 1-beta u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu su određene ELISA metodom. Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između grupa je utvrđena t-testom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Koncentracija IL-6 u talamusu CP/CPPS životinja je bila statistički značajno veća u odnosu na životinje iz kontrolne grupe ($p < 0,001$). Slično je primećeno i u cerebralnom korteksu (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,05$). Koncentracije IL-6 u hipokampusu CP/CPPS pacova nije se razlikovala u poređenju sa Sham pacovima (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.5.1.2.).



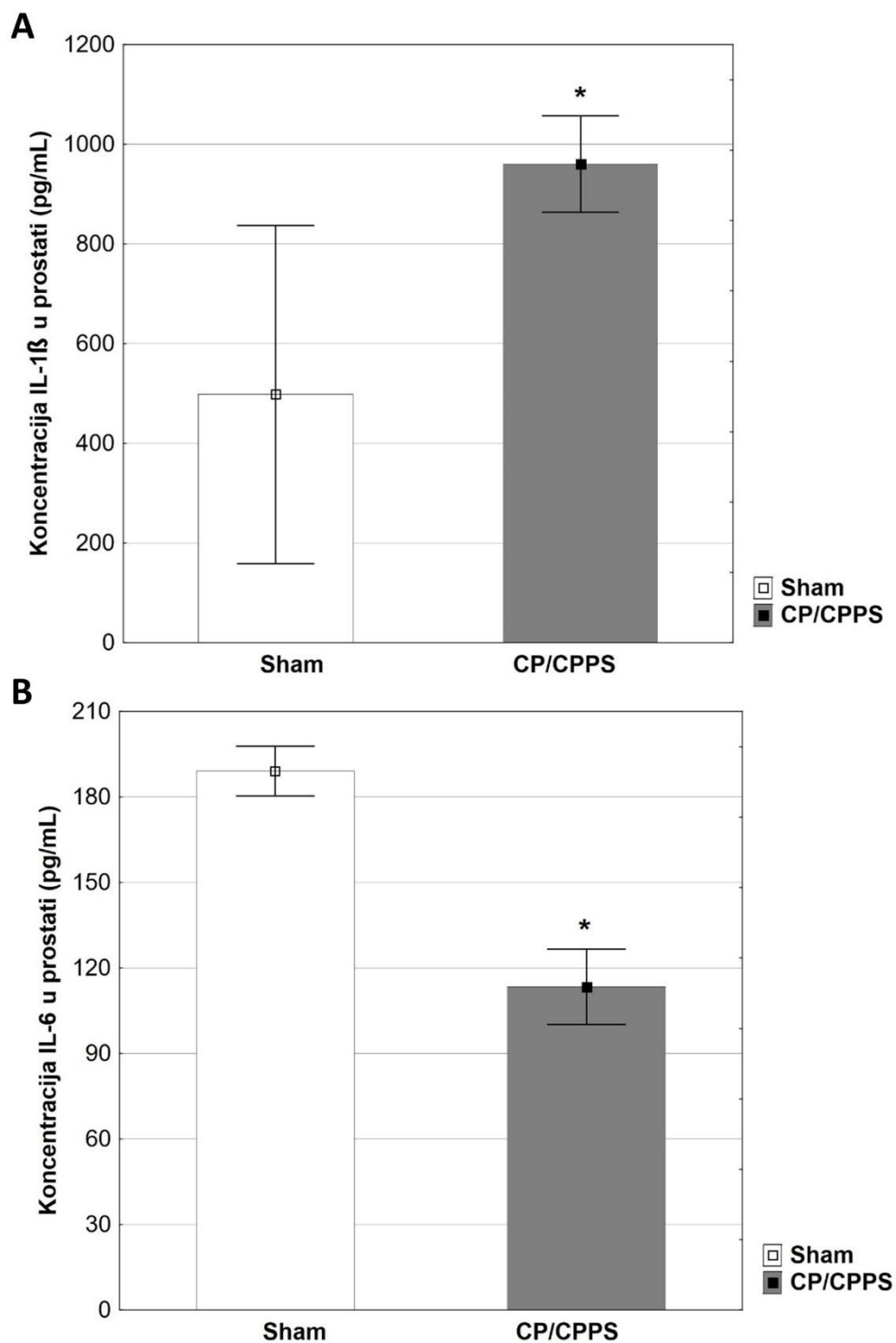
Slika 4.5.1.2. Koncentracija IL-6 u strukturama mozga kod Sham i CP/CPPS životinja

Koncentracije interleukina 6 u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu su određene upotrebom ELISA metode. Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa ($*p < 0,05$, $***p < 0,001$, vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Analiza citokinskog profila u homogenatu prostate je dala suprotne rezultate u pogledu koncentracije IL-1 β i IL-6.

U prostati CP/CPPS životinja, u poređenju sa Sham životinjama, došlo je do statistički značajnog porasta koncentracije IL-1 β (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,05$, Slika 4.5.1.3.A.).

Sa druge strane, koncentracija IL-6 u prostati je kod životinja sa prostatitisom, u poređenju sa životinjama bez prostatitisa, bila statistički značajno snižena (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,05$, Slika 4.5.1.3.B.).

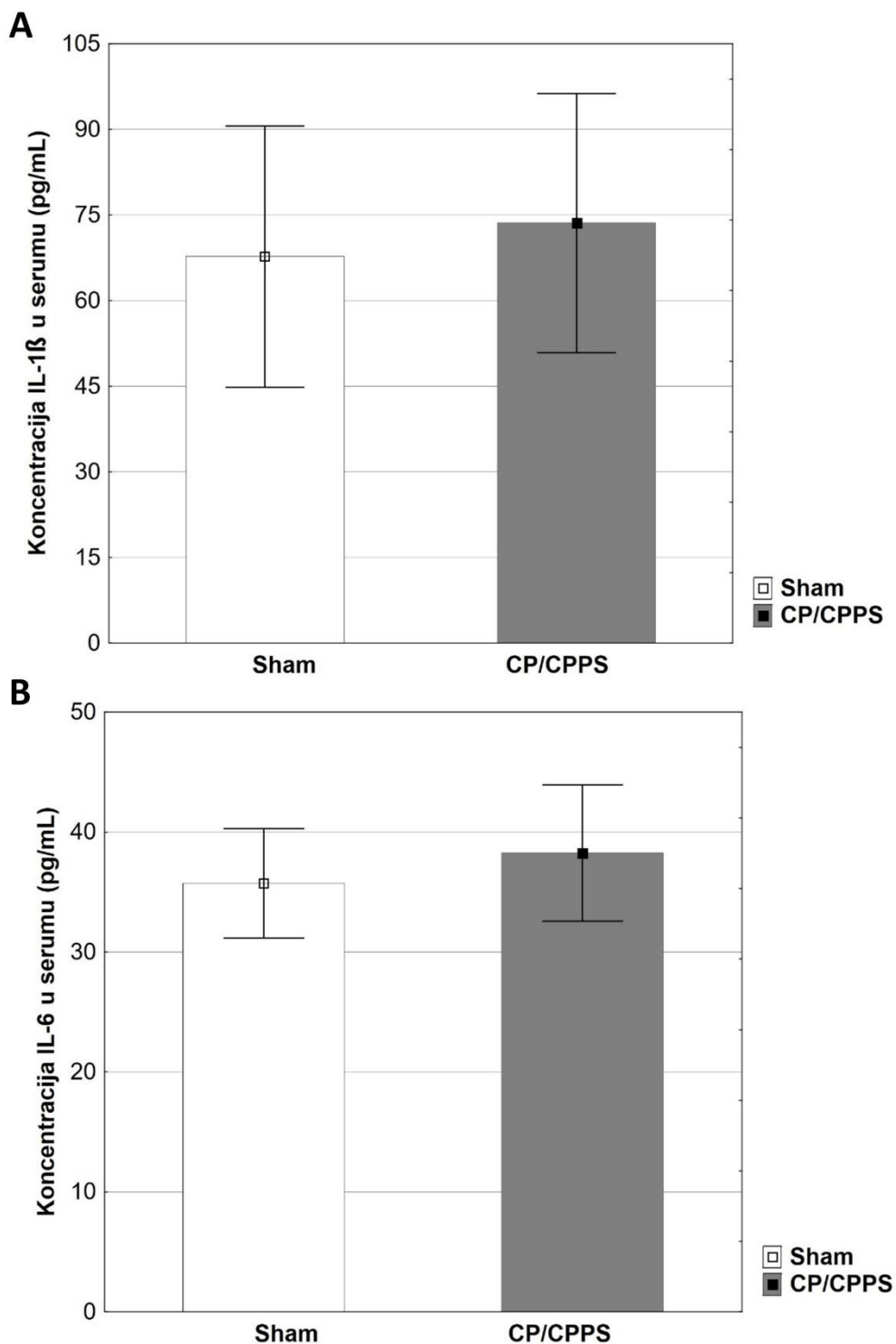


Slika 4.5.1.3. Koncentracija IL-1 β (A) i IL-6 (B) u prostati Sham i CP/CPPS životinja

Koncentracije interleukina 1-beta i interleukina 6 u prostati su određene upotrebom ELISA metode. Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa ($*p < 0,05$, vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Rezultati

Serumske koncentracije IL-1 β (Slika 4.5.1.4.A.) i IL-6 (Slika 4.5.1.4.B.) se nisu značajno razlikovale među grupama Sham i CP/CPPS (Sham vs. CP/CPPS, $p>0,05$).



Slika 4.5.1.4. Koncentracija IL-1 β (A) i IL-6 (B) u serumu Sham i CP/CPPS životinja

Koncentracije interleukina 1-beta i interleukina 6 u serumu su određene upotrebom ELISA metode. Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa ($p>0,05$, vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

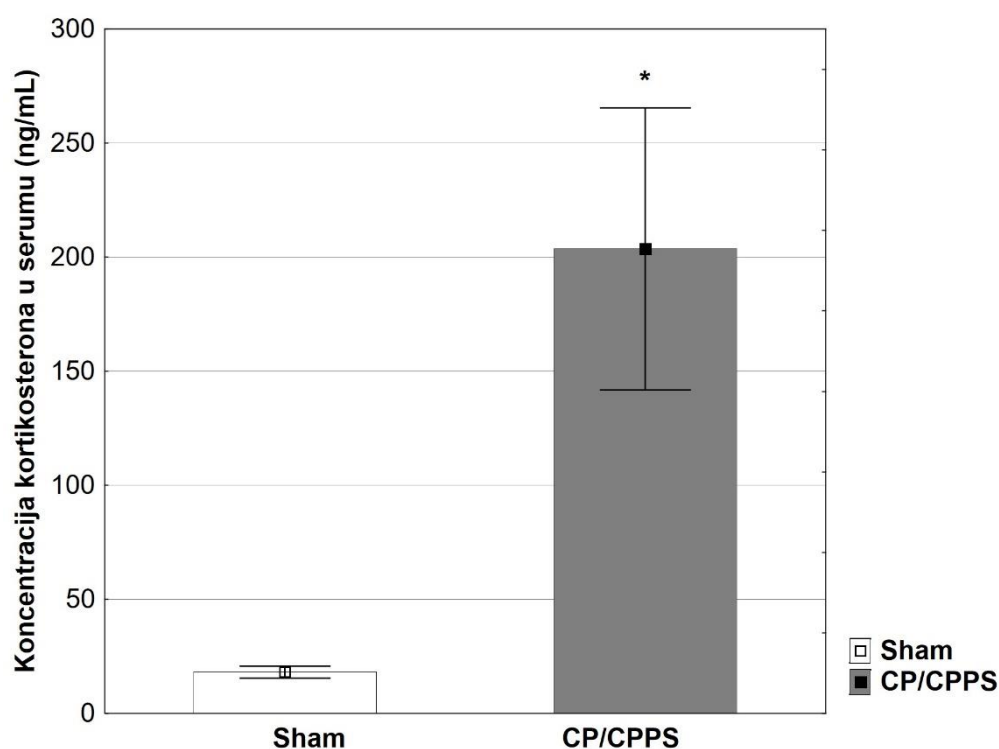
4.5.2. Uticaj CP/CPPS na koncentraciju kortikosterona i testosterona u serumu

Pri uzorkovanju krvi za analizu koncentracije testosterona, uzorci su, u cilju izbegavanja cirkadijalne fluktuacije koncentracije ovog hormona, dobijeni konzistentnim uzorkovanjem krvi između 9:00 i 10:00 h kod svih životinja.

Uzrokovanje krvi i priprema seruma za analizu koncentracije kortikosterona izvršena je nakon završetka bihejvioralnih testova i žrtvovanja životinja.

Koncentracija kortikosterona i testosterona u serumu je određena ELISA metodom na način prethodno opisan u odgovarajućem odeljku Materijal i metode.

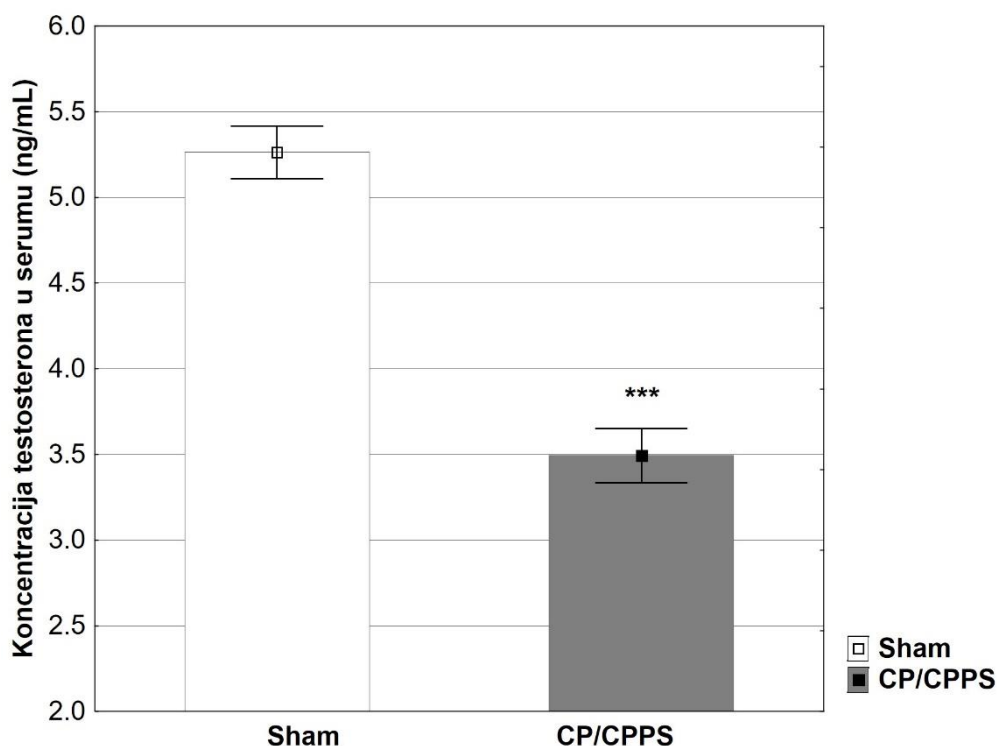
Analiza je pokazala da su životinje sa eksperimentalno indukovanim CP/CPPS, u odnosu na kontrole, pokazivale statistički značajno više serumske koncentracije kortikosterona (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,05$, Slika 4.5.2.1.).



Slika 4.5.2.1. Koncentracija kortikosterona u serumu kod Sham i CP/CPPS životinja

Koncentracije kortikosterona u serumu su određene ELISA metodom. Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa ($*p < 0,05$, vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Sa druge strane, koncentracija serumskog testosterona je kod CP/CPPS životinja, u poređenju sa Sham kontrolama, pokazivala statistički značajno niže nivoe (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0.001$; Slika 4.5.2.2.).



Slika 4.5.2.2. Koncentracija testosterona u serumu kod Sham i CP/CPPS životinja

Koncentracije testosterona u serumu su određene ELISA metodom. Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa (***p*<0,001, vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

4.5.3. Uticaj CP/CPPS na parametre oksidativnog stresa u strukturama mozga

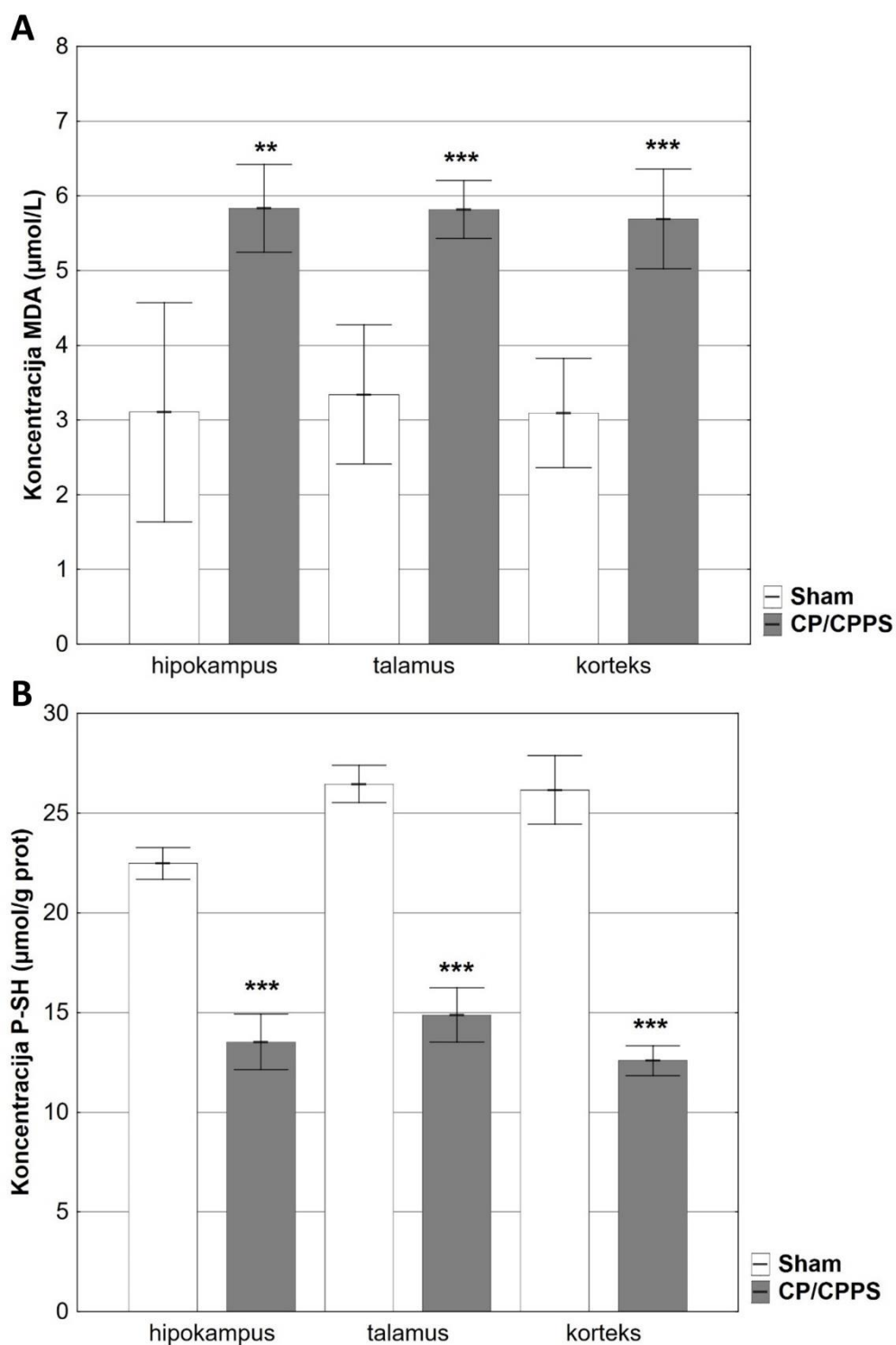
Sve životinje iz grupa Sham i CP/CPPS su 7. postoperativnog dana žrtvovane, a potom su u homogenatima tkiva hipokampusa, talamusa i cerebralnog korteksa, određeni parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

U cilju procene parametara oksidativnog stresa merena je koncentracija MDA, pokazatelja lipidne peroksidacije i P-SH, pokazatelja oštećenja proteina. Procena antioksidativne zaštite izvršena je merenjem aktivnosti enzima SOD i GPx.

Analiza antioksidativne aktivnosti P-SH i intenziteta lipidne peroksidacije (MDA) je pokazala komplementarne rezultate. Naime, markeri oksidativnog stresa bili su značajno povišeni u svim strukturama mozga kod životinja sa prostatitisom.

Kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS, postojao je statistički značajan porast koncentracije MDA u hipokampusu ($p < 0,01$), talamusu ($p < 0,001$) i cerebralnom korteksu (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,001$, Slika 4.5.3.1.A.) u poređenju sa Sham kontrolama.

Analizom koncentracije P-SH, pokazano je da su CP/CPPS životinje, u poređenju sa Sham kontrolnim životinjama, pokazivale statistički značajno niže koncentracije P-SH u hipokampusu ($p < 0,001$), talamusu ($p < 0,001$) i cerebralnom korteksu (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,001$, Slika 4.5.3.1.B). Smanjenje sadržaja tiolnih grupa ukazuje na njihovo značajno „trošenje“ koje se dešava u prisustvu visoko reaktivnih radikala u pokušaju zaštite drugih složenih molekula i struktura.

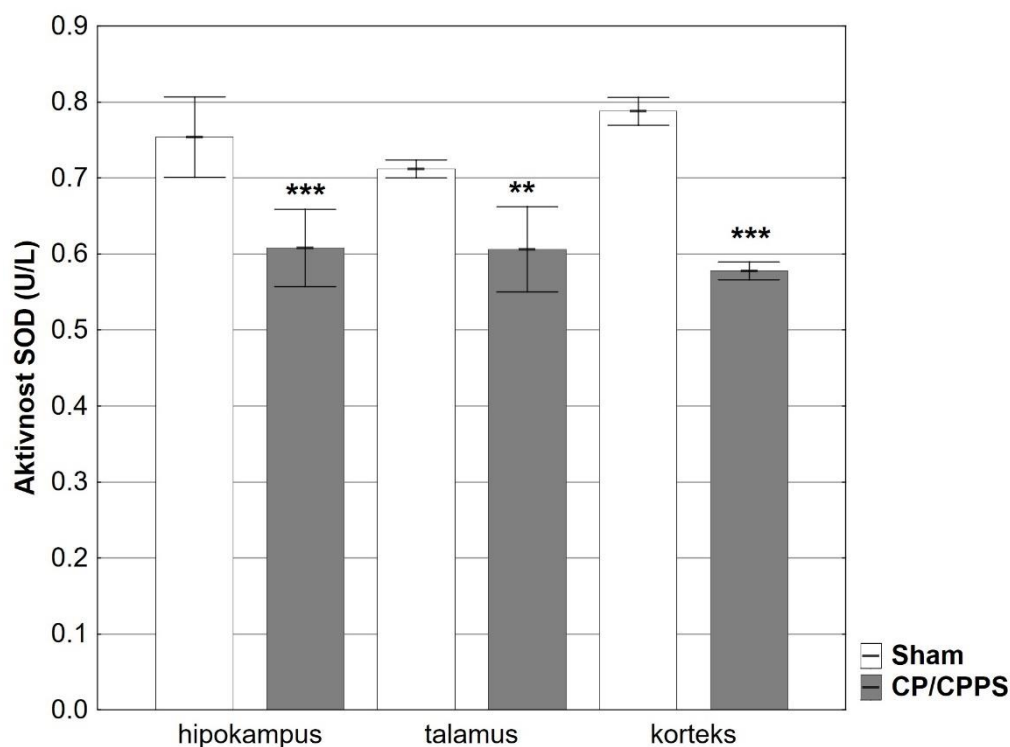


Slika 4.5.3.1. Koncentracija malondialdehida (MDA, A), proteinskih tiol grupa (P-SH, B) u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu Sham i CP/CPPS životinja

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa (**p < 0,01, ***p < 0,001 vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Mogući mehanizam koji bi objasnio visok nivo oksidativnog stresa može da leži u činjenici da je antioksidativna aktivnost zaštitnih enzima bila snižena kod životinja sa prostatitisom indukovanim injekcijom 3% λ -karagenina

Aktivnost enzima SOD je kod CP/CPPS životinja u odnosu na Sham životinje bila statistički značajno niža u hipokampusu ($p < 0.001$), talamusu ($p < 0.01$) i cerebralnom korteksu (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0.001$, Slika 4.5.3.2.).

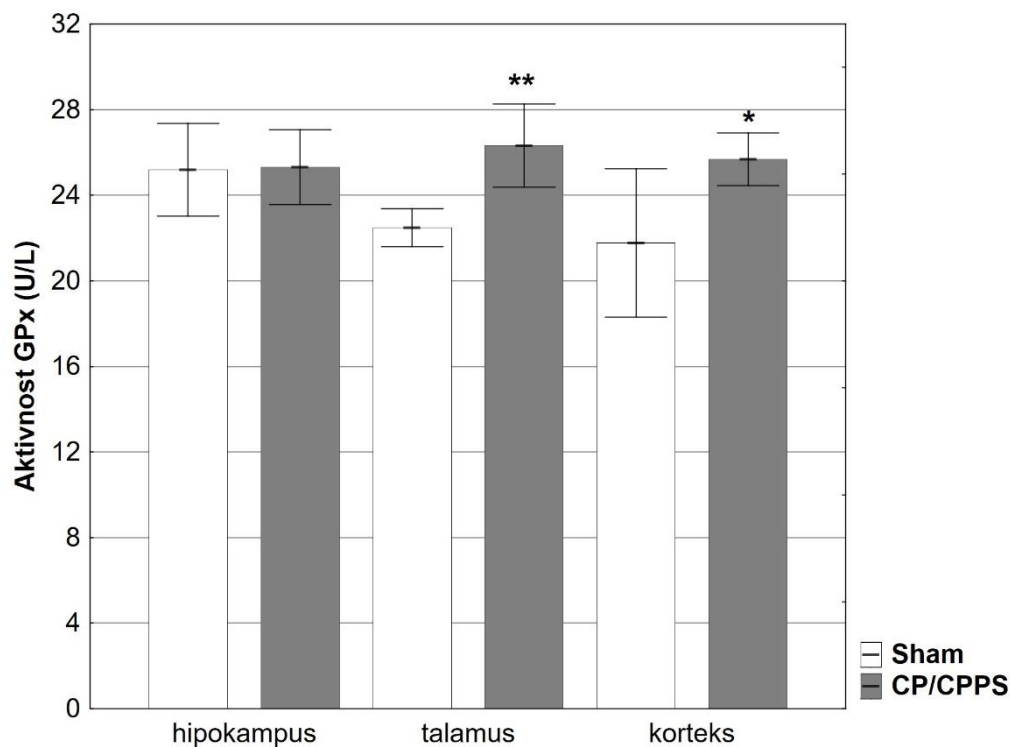


Slika 4.5.3.2. Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu Sham i CP/CPPS životinja.

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

Suprotno tome, aktivnost enzima GPx je kod CP/CPPS životinja bila statistički značajno veća u talamusu ($p < 0,01$) i cerebralnom korteksu ($p < 0,05$), u poređenju sa Sham životinjama (Sham vs. CP/CPPS, Slika 4.5.3.3.)

Tendencija porasta aktivnosti GPx je postojala i u hipokampusu CP/CPPS životinja, ali, u poređenju sa Sham životinjama, ova razlika nije bila statistički značajna (Sham vs. CP/CPPS, $p > 0,05$, Slika 4.5.3.3.).



Slika 4.5.3.3. Aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx) u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu Sham i CP/CPPS životinja.

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

4.5.4. Međusobna povezanost parametara oksidativnog stresa i kortikosterona sa bihevioralnim promenama

U cilju procene povezanosti između parametara oksidativnog stresa i inflamacije sa uočenim bihevioralnim promenama urađene su korelacione matrice. U tom smislu korelirane su koncentracije MDA u tkivu mozga, koncentracije kortikosterona u serumu i parametri bihevioralnih testova za procenu ponašanja povezanog sa anksioznošću kod eksperimentalnih životinja grupe CP/CPPS. Za svaku korelacionu analizu izračunati su Pirsonovi koeficijenti korelacije. Rezultati korelacione analize su predstavljeni korelacionom matricom (Slika 4.5.4.).

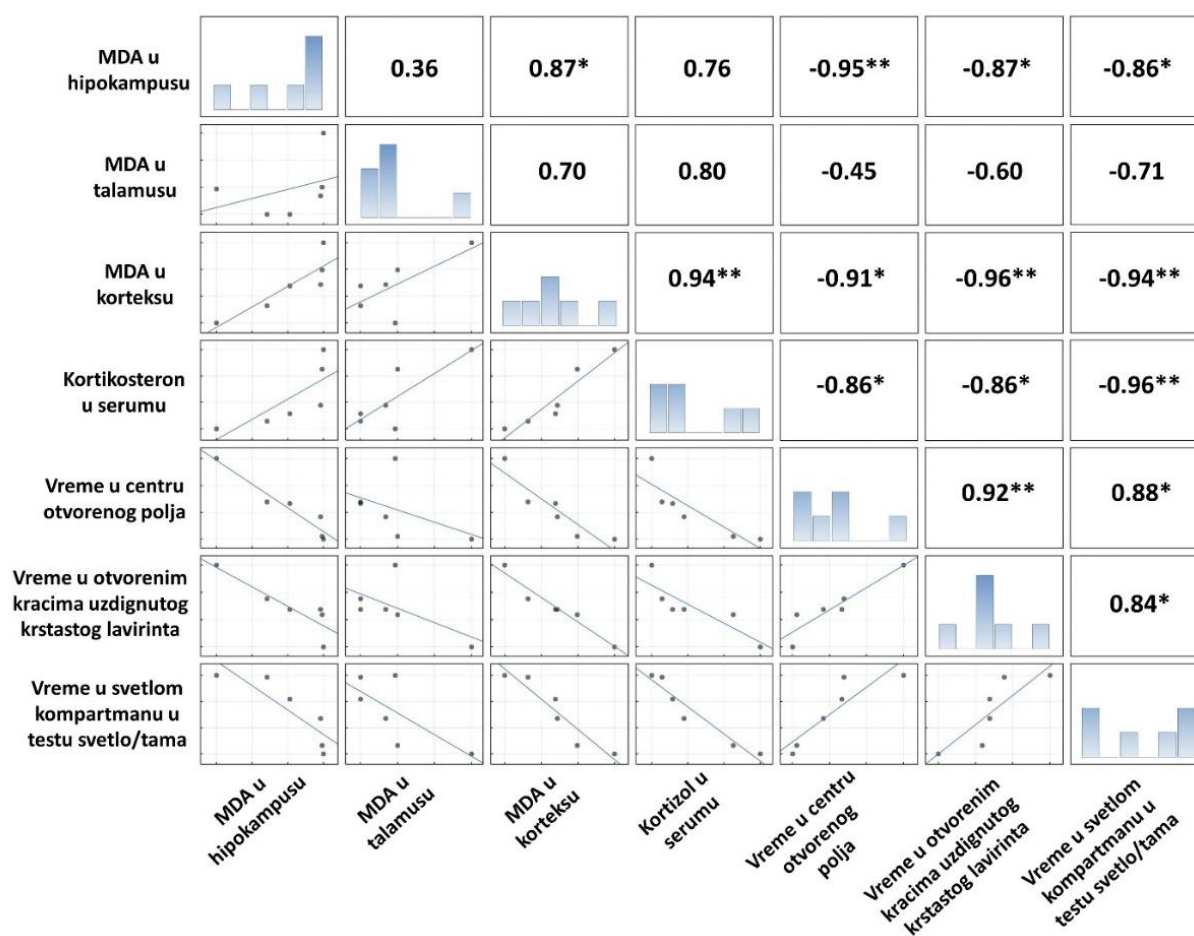
Histogrami koji su na matrici pozicionirani dijagonalno pokazuju distribuciju svake varijable. Donji trougaoni deo matrice je sastavljen od bivarijatnih dijagrama distribucije sa interpolarnom linijom regresije, koja pokazuje međusobni odnos između varijabli. Gornji trougaoni deo matrice je sastavljen od Pirsonovih koeficijenata korelacije koji pokazuju vrstu, jačinu i statističku značajnost međusobnog odnosa između varijabli.

Rezultati korelacione analize su pokazali da postoji jaka negativna korelacija između koncentracije MDA u hipokampusu i vremena koje je životinja provela u centru otvorenog polja ($r = -0,95$, $p < 0,01$), vremena koje je životinja provela u otvorenom kracima uzdignutog krstastog lavirinta ($r = -0,87$, $p < 0,05$) i vremena koje je životinja provela u svetlom kompartmanu testa svetlo/tama ($r = -0,86$, $p < 0,05$). Nije uočena statistički značajna korelacija između koncentracije MDA u talamusu i bilo koje analizirane varijable.

Rezultati

Koncentracije MDA u korteksu su statistički značajno pozitivno korelirale sa koncentracijom kortikosterona u serumu ($r= 0,94$, $p<0,01$), dok su statistički značajno negativno korelirale sa vremenom koje je životinja provela u centru otvorenog polja ($r= -0,91$, $p<0,05$), vremenom koje je životinja provela u otvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta ($r= -0,96$, $p<0,01$) i vremena koje je životinja provela u svetlom kompartmanu testa svetlo/tama ($r= -0,94$, $p<0,01$).

Koncentracija kortikosterona u serumu je statistički značajno negativno korelirala sa vremenom koje je životinja provela u centru otvorenog polja ($r= -0,86$, $p<0,05$), vremenom koje je životinja provela u otvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta ($r= -0,86$, $p<0,05$) i vremenom koje je životinja provela u svetlom kompartmanu testa svetlo/tama ($r= -0,96$, $p<0,01$). Takođe, postojala je statistički značajna korelacija među parametrima tri različita etološka testa za utvrđivanje postojanja ponašanja povezanog sa anksioznošću (Slika 4.5.4.).



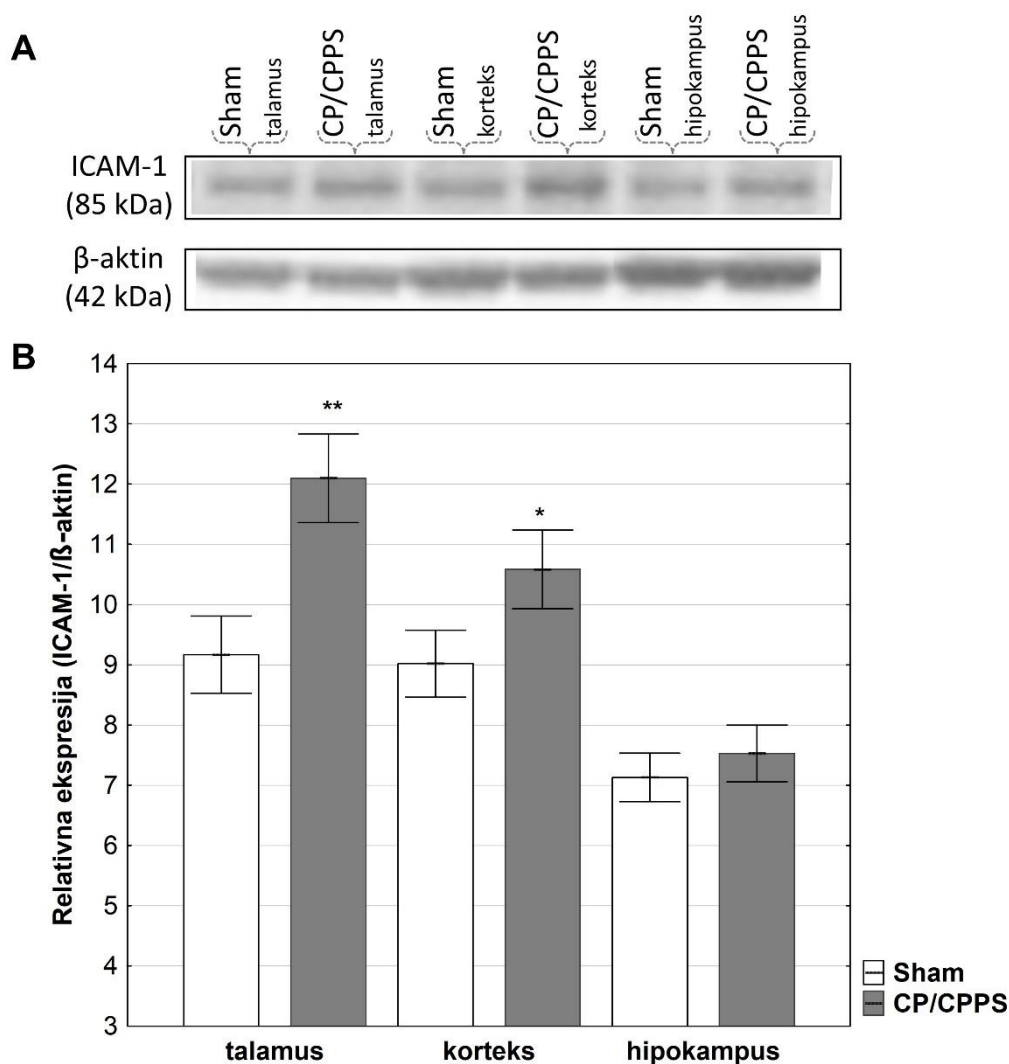
Slika 4.5.4. Korelacija između parametara oksidativnog stresa u tkivu mozga, koncentracije kortikosterona u serumu i parametara bihevioralnih testova za procenu ponašanja povezanog sa anksioznošću kod eksperimentalnih životinja grupe CP/CPPS

Korelaciona matrica pokazuje međusobnu zavisnost između varijabli uključenih u faktorsku analizu: koncentracija malondialdehida (MDA) u hipokampusu, talamusu i korteksu, koncentracija kortikosterona u serumu, vreme provedeno u centru otvorenog polja, vreme provedeno u otvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta i vreme provedeno u svetlom kompartmanu testa svetlo/tama. Histogrami koji pokazuju distribuciju uključenih varijabli su dijagonalno na 1:1 liniji matrice. Donju trougaonu matricu predstavljaju bivarijantni dijagrami rasejanja sa glatkom linijom regresije koja pokazuje međusobni odnos između varijabli. Gornja trougaona matrica je sastavljena od Pirsonovih produkt-moment koeficijenata korelacije koji pokazuju međusobni odnos između varijabli. Statistički značajni nivoi korelacije su obeleženi: * $p<0,05$ i ** $p<0,01$.

4.5.5. Uticaj CP/CPSS na ekspresiju proteina ICAM-1 u strukturama mozga

Nakon žrtvovanja životinja, 7. postoperativnog dana, svim životinjama iz grupa Sham i CP/CPSS je upotrebom *Western blot* analize određivan nivo ekspresije proteina ICAM-1 u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu.

Pacovi tretirani intraprostaticnom injekcijom 3% λ -karagenina su imali statistički značajno veću ekspresiju proteina ICAM-1 u talamusu ($p < 0,01$) i cerebralnom korteksu ($p < 0,05$) u poređenju sa Sham životinjama. Međugrupna razlika u ekspresiji proteina ICAM-1 u hipokampusu pacova nije opservirana (Sham vs. CP/CPSS, $p > 0,05$, Slika 4.5.5.B).



Slika 4.5.5. Ekspresija proteina ICAM-1 u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu Sham i CP/CPSS životinja

Prikazani su reprezentativni blotovi udaljenih traka sa istog gela (A). Ekspresija ICAM-1 proteina u korteksu i talamusu bila je značajno veća u CP/CPSS grupi životinja u poređenju sa kontrolom. ICAM-1 ekspresija standardizovana je u grupi Sham u odnosu na 1 (100%). Densitometrija je prikazana kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

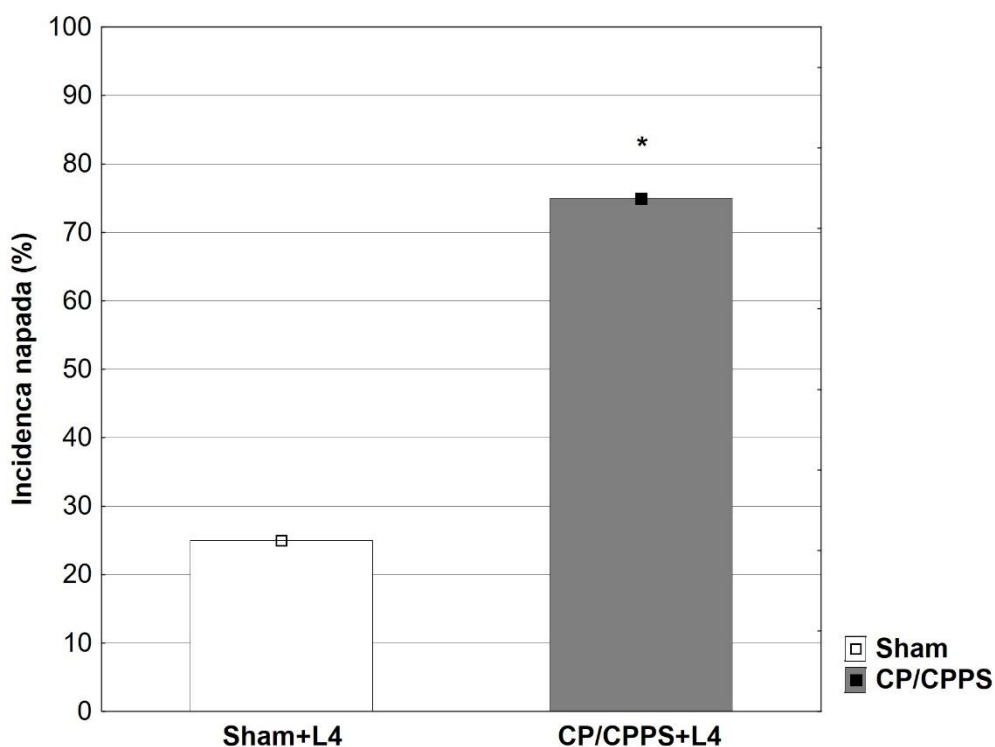
4.6. Uticaj CP/CPPS na bihevioralne i elektroencefalografske (EEG) karakteristike konvulzivnog ponašanja izazvanog lindanom

Kako bi se ispitala ekscitabilnosti CNS, odnosno podložnost životinja ka razvoju hiperekscitabilnosti i konvulzija, korišćena je posebna kohorta životinja, koja nije bila uključena u biohemijske analize. U ovoj kohorti je 7. postoperativnog dana upotrebom subkonvulzivne doze lindana ispitano konvulzivno ponašanje i iktalna EEG aktivnost. Administracijom lindana (4 mg/kg, i.p.) su formirane sledeće eksperimentalne grupe: Sham+L4 (n=8) i CP/CPPS+L4 (n=8).

4.6.1. Uticaj CP/CPPS na bihevioralne karakteristike konvulzivnog ponašanja

Nakon administracije lindana, u vremenskom intervalu od 30 minuta su opservirani sledeći bihevioralni parametri konvulzija: incidenca, latentni period i intenzitet napada, kao i distribucija gradusa napada u grupama životinja.

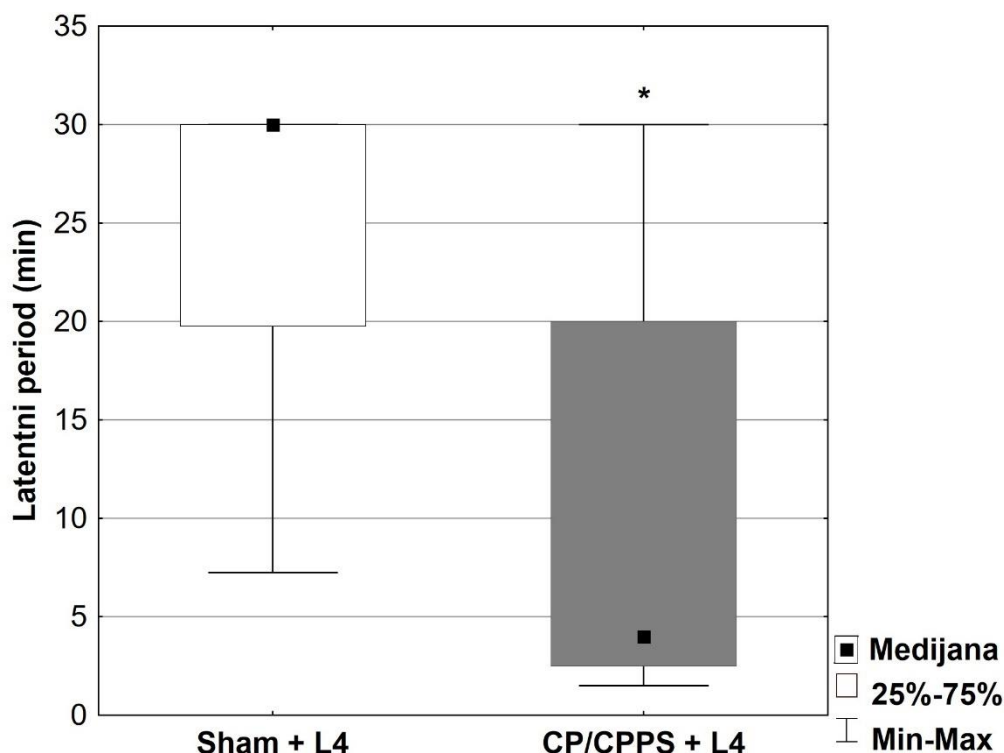
Incidenca napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana u Sham+L4 grupi je iznosila 25% i bila je statistički značajno niža u poređenju sa CP/CPPS+L4 grupom gde je iznosila 75%. (Sham+L4 vs. CP/CPPS+L4, $p < 0,05$, Slika 4.6.1.1.).



Slika 4.6.1.1. Incidenca napada konvulzivnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Sedmog dana nakon operacije, pacovima je intraperitonealno administriran lindan u subkonvulzivnoj dozi (L4; 4 mg/kg) u cilju ispitivanja ekscitabilnosti CNS i formirane su grupe: Sham+L4 i CP/CPPS+L4 (n=8 životinja po grupi). Incidenca je izražena u procentima kao broj životinja koje konvulziraju u odnosu na broj životinja koje nisu dobile konvulzivni napad. Statistička značajnost razlike u incidenci napada je utvrđena upotrebom Fišerovog testa tačne verovatnoće ($*p < 0,05$ vs. Sham+L4).

Analiza latentnog vremena do pojave prvog konvulzivnog napada je pokazala da je ono bilo statistički značajno kraće u grupi CP/CPPS+L4 gde je medijana latence iznosila 4 (2,5-20) minuta, u poređenju sa grupom Sham+L4 gde je medijana latence iznosila 30 (19,75-30) minuta (Sham+L4 vs. CP/CPPS+L4, $p < 0,05$, Slika 4.6.1.2).

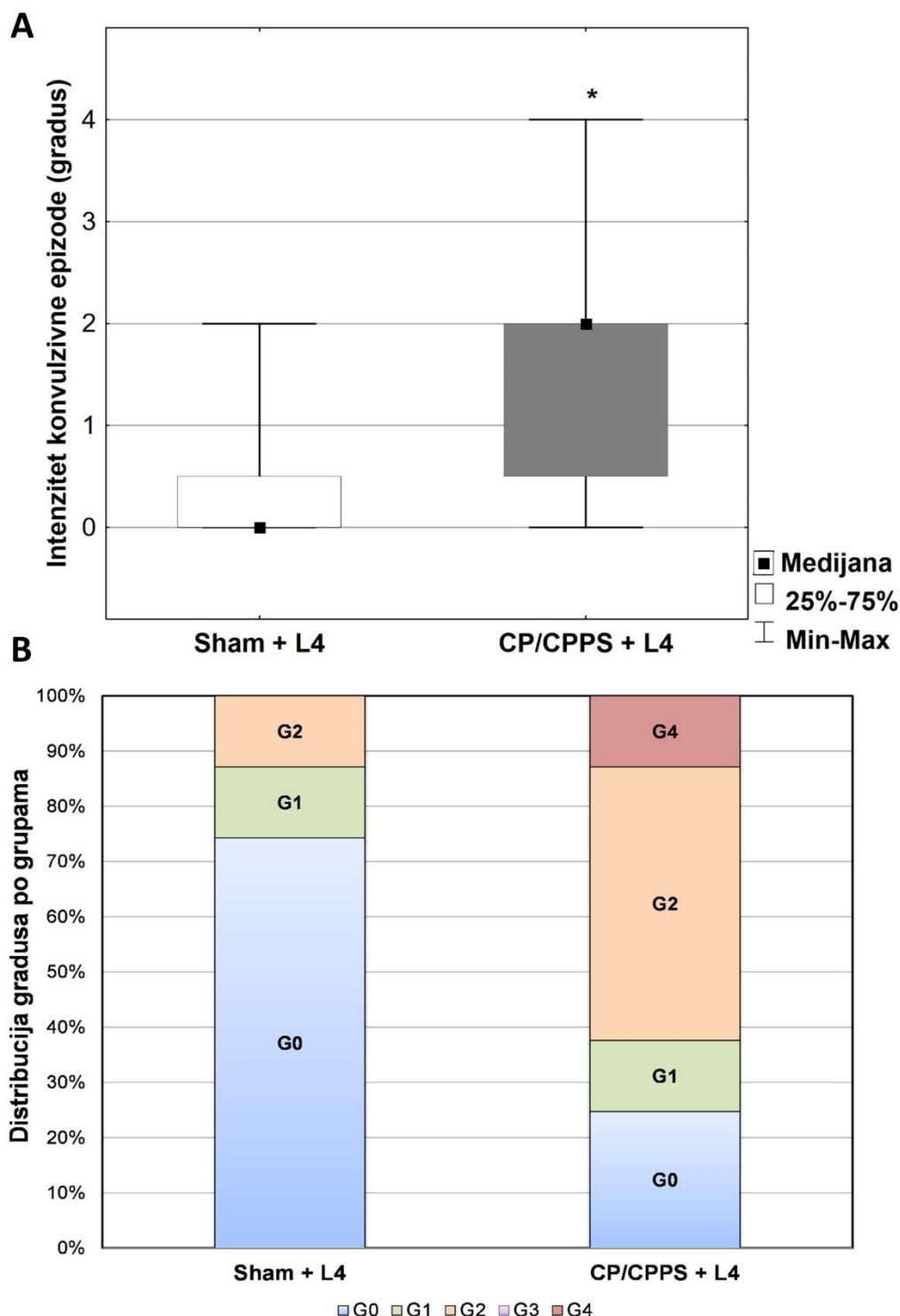


Slika 4.6.1.2. Latentni period konvulzivnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Latentni period u minutima je definisan kao vreme koje protekne od administracije lindana do pojave prvog uočljivog znaka konvulzije i izražen je medijanom, 25. i 75. percentilom. Za životinje bez konvulzivnih napada je uzeta vrednost od 30 minuta. Statistička značajnost razlike u latentnom periodu utvrđena je upotrebom Mann-Whitney U testa ($*p < 0,05$ vs. Sham+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.6.1.1.

Intenzitet napada izazvanih lindanom je bio statistički značajno veći kod životinja iz grupe CP/CPPS+L4 u poređenju sa životinjama iz grupe Sham+L4 (Sham+L4 vs. CP/CPPS+L4, $p < 0,05$, Slika 4.6.1.3.A.). Maksimalni gradus konvulzija u grupi CP/CPPS+L4 je iznosio 4, dok je maksimalni gradus konvulzija u Sham+L4 grupi bio 2. Minimalni gradus je u obema grupama iznosio 0, obzirom na određeni procenat životinja u grupi Sham+L4 (75%) i grupi CP/CPPS+L4 (25%) koje nisu konvulzirale.

Dodatna analiza procentualne distribucije gradusa unutar grupa je pokazala da je procenat životinja iz grupe CP/CPPS+L4 sa gradusom 0 iznosio 25% i nije se statistički značajno razlikovao od grupe Sham+L4 gde je iznosio 75% ($p > 0,05$, Slika 4.6.1.3.B.). Procenat životinja sa gradusom 1 je bio isti u obe grupe i iznosio je 12,5% (Slika 4.6.1.3.B.). Procenat životinja sa gradusom konvulzija 2 je u CP/CPPS+L4 grupi je bio veći i iznosio je 50%, u odnosu na grupu Sham+L4 gde je iznosio 12,5%, ali ova razlika je bez statističke značajnosti ($p > 0,05$, Slika 4.6.1.3.B.). Slična opservacija bez statističke značajnosti ($p > 0,05$) je konstatovana u vezi sa distribucijom gradusa 4, koji je u grupi CP/CPPS iznosio 12,5%, dok je u grupi Sham+L4 iznosio 0%. U obema grupama, Sham+L4 i CP/CPPS+L4, konvulzije gradusa 3 nisu zapažene, te je njiova zastupljenost bila 0%.

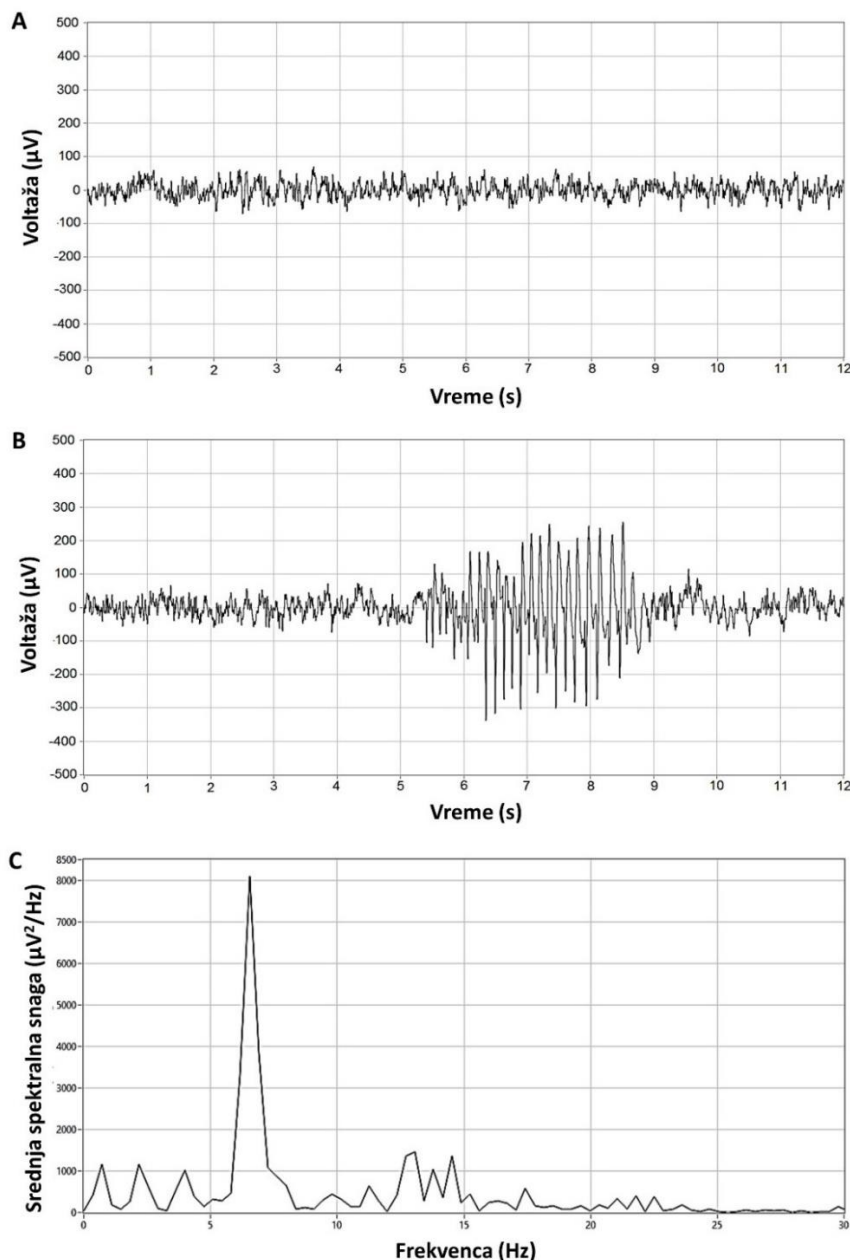


Slika 4.6.1.3. Intenzitet (gradus) (A) i distribucija gradusa konvulzivnih napada (B) izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Intenzitet napada procenjan je na osnovu deskriptivne skale sa gradusima od 0 do 4: 0 - bez konvulzivnog odgovora; 1 - klimanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice, 2 - mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); 3 - progresija u generalizovane kloničke konvulzije sa toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; 4 - status epilepticus. Gradus napada je izražen kao medijana i 25. i 75. percentil, dok je zastupljenost određenog gradusa u svakoj grupi izražen u procentima. Statistička značajnost međugrupne razlike u intenzitetu napada utvrđena je Mann-Whitney U testom ($*p < 0,05$ vs. Sham+L4), a u distribuciji različitih gradusa napada upotrebom Fišerovog testa tačne verovatnoće ($p > 0,05$ vs. Sham+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.6.1.1.

4.6.2. Uticaj CP/PPS na EEG karakteristike konvulzivnog ponašanja

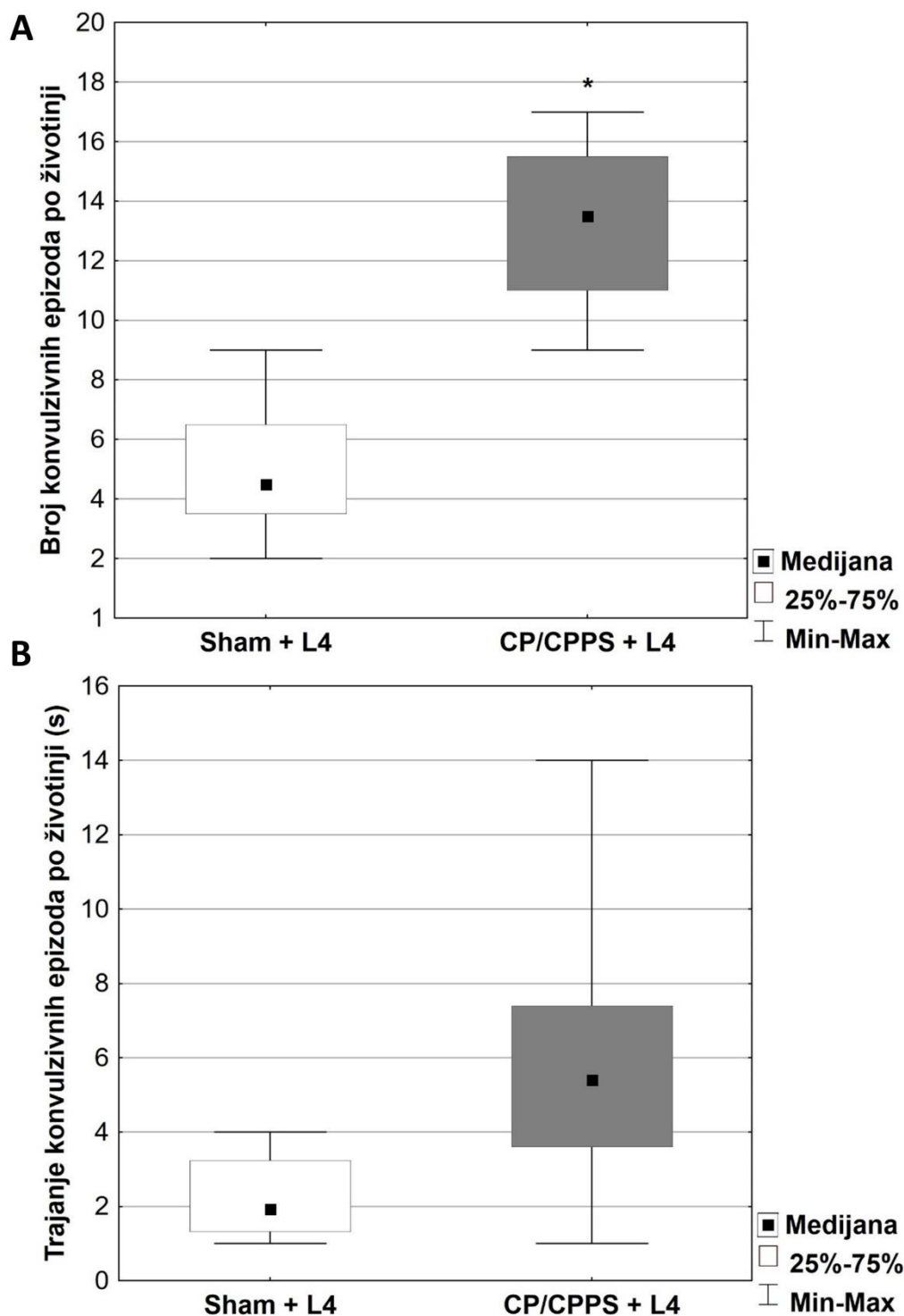
Akvizicija i analiza EEG signala je trajala 30 minuta nakon intraperitonealne aplikacije subkonvulzivne doze lindana. Vizuelna analiza EEG zapisa je pokazala fiziološku EEG aktivnost, bez znakova EEG iktalne aktivnosti kod Sham+L4 životinja (Slika 4.6.2.1.A.). Kod CP/PPS+L4 životinja je zapažena EEG iktalna aktivnost, te su prikazani reprezentativni iktalni periodi u vidu serije šiljaka visoke amplitude (Slika 4.6.2.1.B.), kao i korespondentni spektrogram prikazanog EEG iktalnog perioda koji je dobijen FFT analizom (Slika 4.6.2.1.C.).



Slika 4.6.2.1. Reprezentativni EEG zapis Sham+L4 životinja (A) i iktalni period registrovan u EEG zapisu CP/PPS+L4 životinja (B) sa korespondentnim spektrogramom dobijenim FFT analizom (C)

Reprezentativni zapis bazalne EEG aktivnosti kod Sham+L4 životinja (A), EEG iktalni period registrovan kod CP/PPS+L4 životinja (B) i njegov korespondentni spektrogram dobijen FFT analizom (C). EEG iktalni period karakteriše serija šiljaka visoke amplitude, preko 200-300 µV, sa dominantnom frekvencom od 7-8 Hz u alfa opsegu. Odvod: desni frontalni- levi parijetalni. Srednja spektralna snaga dobijena je FFT analizom pomoću NeuroSciLaBG programa. Za detalje videti opis uz Sliku 4.6.1.1.

Analiza EEG iktalne aktivnosti pokazuje da je broj EEG iktalnih perioda po životinji bio statistički značajno veći u grupi CP/CPPS+L4 ($p < 0,05$, Slika 4.6.2.2.A.), u poređenju sa grupom Sham+L4. Trajanje konvulzivnih epizoda po životinji je bilo veće u grupi CP/CPPS+L4, u poređenju sa grupom Sham+L4, ali razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$, Slika 4.6.2.2.B.).



Slika 4.6.2.2. Broj (A) i trajanje (B) EEG iktalnih perioda po životinji izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Broj i trajanje EEG konvulzivnih epizoda po životinji su ustanovljeni za obe grupe životinja. Vrednosti su izražene kao medijana sa 25. i 75. percentilom i opsegom minimum-maksimum. Statistička značajnost razlika u broju i trajanju EEG konvulzivnih epizoda između životinja iz grupa Sham+L4 i CP/CPPS+L4 je utvrđena Mann-Whitney U testom ($*p < 0,05$ vs. Sham+L4). Za detalje videti opis uz Slike 4.6.1.1. i 4.6.2.1.

Epohe EEG iktalnih perioda CP/CPPS+L4 životinja su obrađene upotrebom FFT, a podaci o trajanju, maksimalnoj frekvenci i ukupnoj spektralnoj gustini snage su u Tabeli 4.6.2.1.

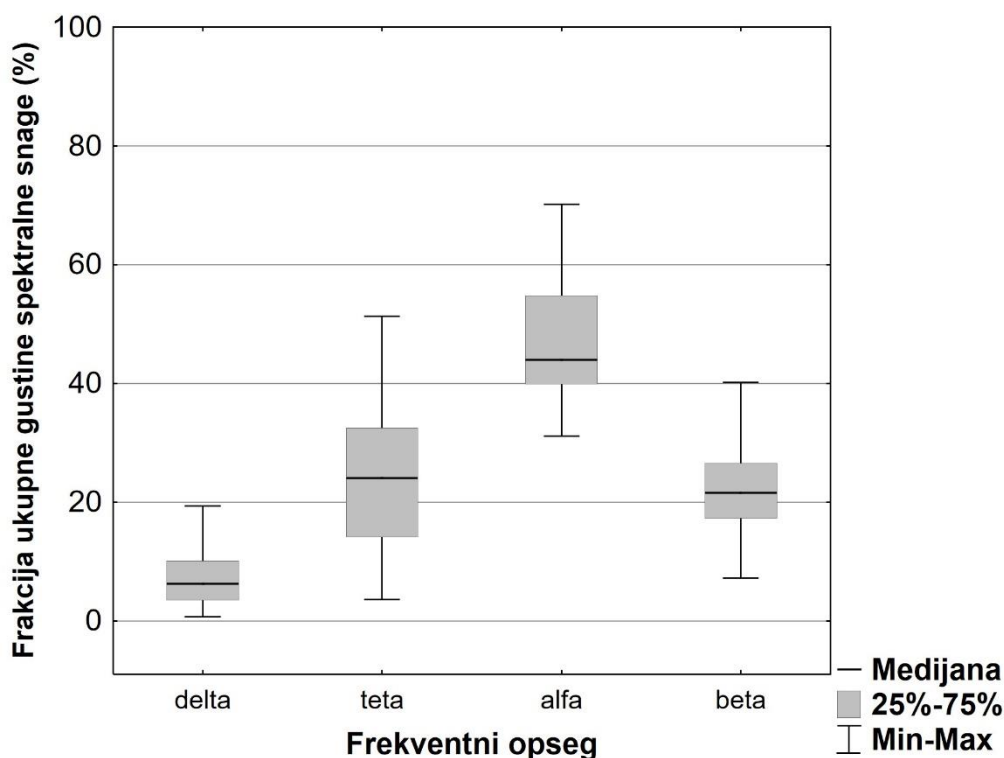
Tabela 4.6.2.1. Karakteristike EEG iktalnih perioda izazvanih lindanom kod CP/CPPS+L4 životinja

<i>Parametri EEG iktalnih perioda</i>	<i>Medijana</i>	<i>25-75 percentil</i>	<i>Min-Max</i>
<i>Trajanje (s)</i>	5,40	3,60-7,40	1,00-14,00
<i>Maksimalna frekvencija (Hz)</i>	7,17	6,83-7,72	5,85-16,12
<i>Ukupna spektralna gustina snage ($\mu V^2/Hz$)</i>	17 260,06	12 539,58-22 998,22	2 893,05-32 770,41

Kako raspodela podataka ne ispunjava kriterijume normalne raspodele, vrednosti podataka su prikazane u vidu medijane sa 25. i 75. percentilom i opsegom minimum-maksimum.

Dalja analiza rezultata FFT analize je pokazala procentualni udeo spektralne snage u delta, teta, alfa i beta frekvencijskim domenima u odnosu na ukupnu spektralnu gustinu snage EEG iktalnih perioda. Dominantna EEG aktivnost tokom EEG iktalnih perioda bila je u rasponu alfa ritma, čija je medijana frakcije iznosila 43,99 (39,88-54,8) % ($p < 0,001$ vs. delta, teta, beta, Slika 4.6.2.3. i Tabela 4.6.2.2.). Najmanje zastupljena EEG aktivnost je bila u delta ritmu, sa medijanom frakcije 6,26 (3,51-10,06) % ($p < 0,001$ vs. teta, beta, alfa, Slika 4.6.2.3.).

Međusobnim poređenjem procentualne zastupljenosti četiri standardna frekventna opsega (delta, teta, alfa, beta) u odnosu na ukupnu spektralnu gustinu snage, uočeno je da su se njihove frakcije međusobno statistički značajno razlikovale u svim statističkim parovima (detalji u statističkoj matrici, Tabela 4.6.2.2.), izuzev para teta-beta, što odražava značajnu stratifikaciju EEG aktivnosti tokom EEG iktalnih perioda (Slika 4.6.2.3. i Tabela 4.6.2.2.).



Slika 4.6.2.3. Frakcija delta, teta, beta i alfa EEG aktivnosti u ukupnoj gustini spektralne snage EEG iktalnih perioda izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod CP/CPPS+L4 životinja

Vrednosti su prikazane kao medijana sa 25. i 75. percentilom i opsegom minimum-maksimum. Za detalje videti opis uz Sliku 4.6.1.1. i 4.6.2.1.

Tabela 4.6.2.2. Statistička matrica razlika u međusobnoj procentualnoj zastupljenosti frekventnih opsega (delta, teta, alfa, beta) u odnosu na ukupnu spektralnu gustinu snage u EEG iktalnim periodima izazvanim lindanom kod CP/CPPS+L4 životinja

vs.	Delta	Teta	Alfa	Beta
Delta		p<0,001	p<0,001	p<0,001
Teta	p<0,001		p<0,001	p>0,05
Alfa	p<0,001	p<0,001		p<0,001
Beta	p<0,001	p>0,05	p<0,001	

Statistička značajnost međusobnih razlika u zastupljenosti četiri standardna frekventna opsega u relativnoj gustini spektralne snage utvrđena je Kruskal-Wallis testom, a dobijene značajnosti predstavljene su u matriks tabeli. Za detalje videti opis uz Sliku 4.6.1.1., 4.6.2.1. i 4.6.2.3.

4.7. Uticaj CP/CPPS na histološke karakteristike tkiva prostate

Sedmog postoperativnog dana, nakon što su obavljene bihevioralni testovi, svi pacovi iz grupa Sham i CP/CPPS su žrtvovani na standardni način.

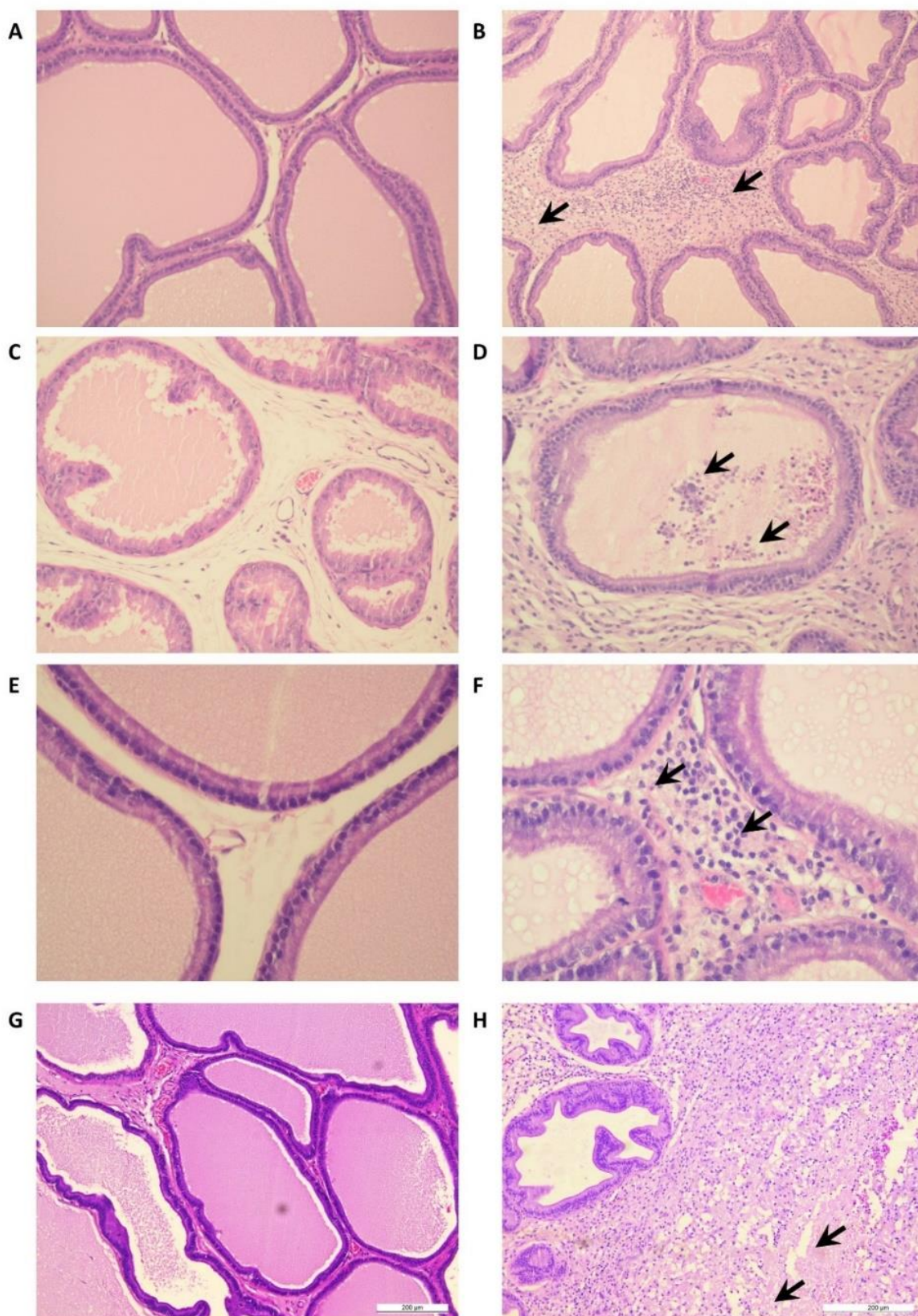
Izolovane su prostate, standardno procesuirana i obojene (H/E), a preparati su posmatrani na svetlosnom mikroskopu.

Prostate pacova iz Sham grupe, koje su injektirane sterilnim 0,9% NaCl su bile normalne histološke građe bez prisustva elemenata zapaljenja (Slika 4.7.A.,C.,E.,G.).

Suprotno tome, intraprostatična injekcija 3% λ -karagenina je dovela do inflamacije prostate kod pacova iz grupe CP/CPPS.

Uniformne inflamatorne promene kod svih životinja u grupi CP/CPPS su obuhvatale:

1. predominantnu mononuklearnu leukocitnu infiltraciju intersticijuma sa proliferativnim promenama intersticijuma (Slika 4.7.B.,F.),
2. deskvamaciju ćelija i leukocitnu infiltraciju u tubulo-alveolarnim žlezdama (Slika 4.7.D.),
3. sporadičnu intersticijalnu nekrozu (Slika 4.7.H.).



Slika 4.7. Histološke karakteristike prostate kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Zapaža se očuvana histološka građa prostate, bez leukocitne infiltracije i destrukcije tkiva kod kontrolnih životinja, uveličanja $\times 100-400$ (A, C, E, G). Slike prostata CP/CPPS pacova pokazuju: intersticijalnu proliferaciju sa leukocitnom infiltracijom, uveličanje $\times 100$ (B) i uveličanje $\times 400$ (F), deskvamaciju ćelija i leukocitnu infiltraciju u tubulo-alveolarnim žlezdama, uveličanje $\times 200$ (D), nekrozu intersticijuma, uveličanje $\times 200$ (H).

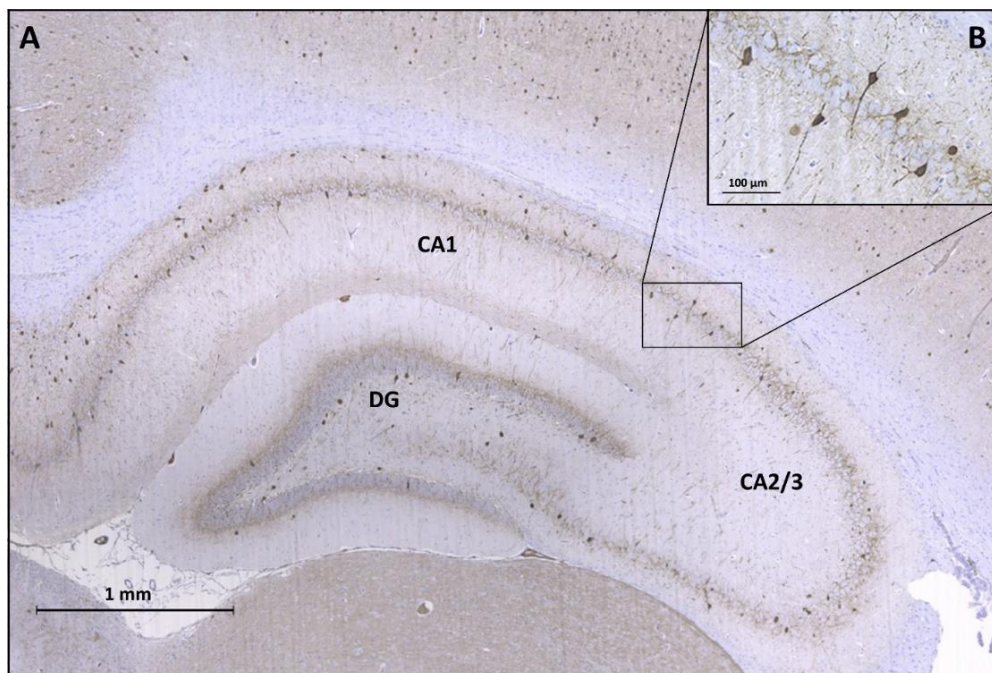
4.8. Uticaj CP/CPSS na imunohistohemijsku ekspresiju markera neurogeneze i gliogeneze u hipokampusu

Osim analize promena na biohemijskom nivou, učinjena je i imunohistohemijska analiza hipokampusa. Po završetku eksperimenata, 7. postoperativnog dana, pacovi su žrtvovani dekapitacijom na giljotini, a potom su pažljivom disekcijom iz lobanja pacova izdvojeni mozgovi u cilju imunohistohemijske analize ekspresije markera neurogeneze i gliogeneze: Ki-67, DCX, GFAP, kao i markera inhibitornih interneurona: PV.

4.8.1. Uticaj CP/CPSS na ekspresiju PV+ interneurona u hipokampusu

U cilju ispitivanja distribucije i promene u broju GABAergičkih interneurona u regionima hipokampusa: CA1, CA2/3 i DG kod eksperimentalnih CP/CPSS životinja, kao i kod kontrolnih Sham životinja, izvršeno je imunohistohemijsko bojenje antitelom na PV.

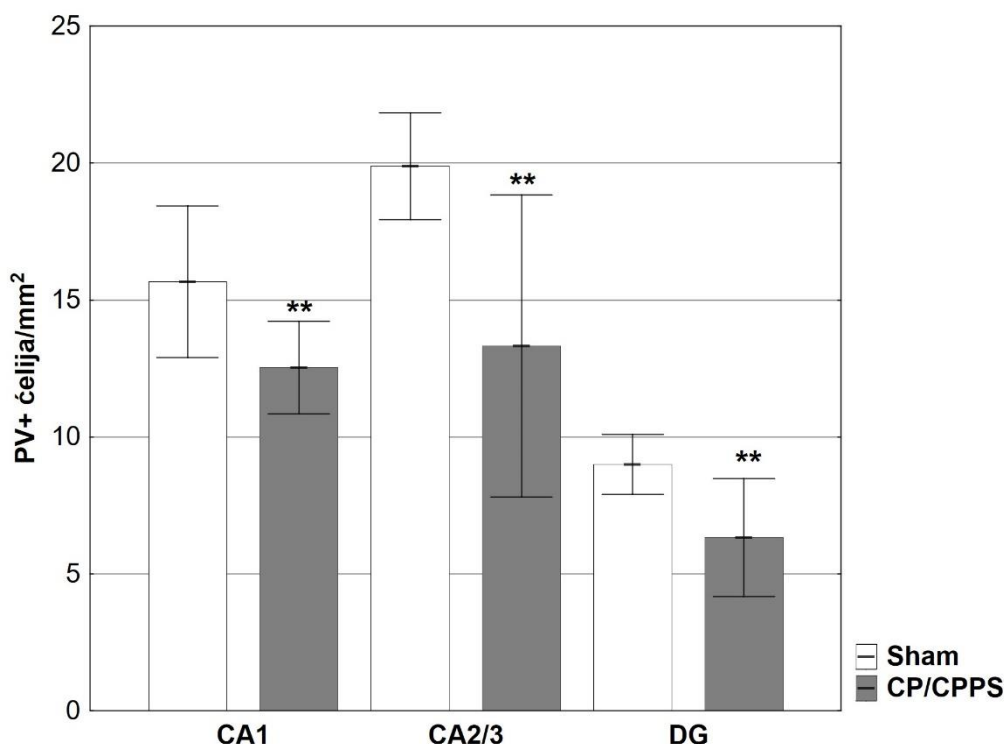
Pokazano da su PV+ interneuroni u hipokampusima životinja iz obe grupe lokalizovani predominantno u blizini sloja piramidalnih ćelija u regionima CA1 i CA2/3, kao i u granularnom ćelijskom sloju regiona DG (Slika 4.8.1.1.A, B.).



Slika 4.8.1.1. Reprezentativna fotomikrografija PV+ interneurona u hipokampusu

Prikazani su CA1, CA2/3 i DG regioni hipokampusa (A) uz uvećani prikaz PV+ interneurona (B) koji su predominantno lokalizovani u sloju piramidalnih ćelija CA1, CA2/3 regiona i granularnom ćelijskom sloju DG regiona hipokampusa.

Kvantitativna analiza broja PV+ interneurona (Slika 4.8.1.2.) je pokazala da se kod CP/CPSS životinja nalazi statistički značajno manji broj interneurona u CA1 ($p < 0,01$), CA2/3 ($p < 0,01$), kao i u DG regionu hipokampusa ($p < 0,01$), u poređenju sa Sham životinjama.



Slika 4.8.1.2. Broj PV+ interneurona u CA1, CA2/3 i DG regionima hipokampusa kontrolnih i eksperimentalnih životinja

Kvantifikovanje PV+ interneurona je prikazano kao broj PV+ ćelija standardizovan prema površini određene zone hipokampusa u 1 mm². Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom t-testa (**p<0,01 vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

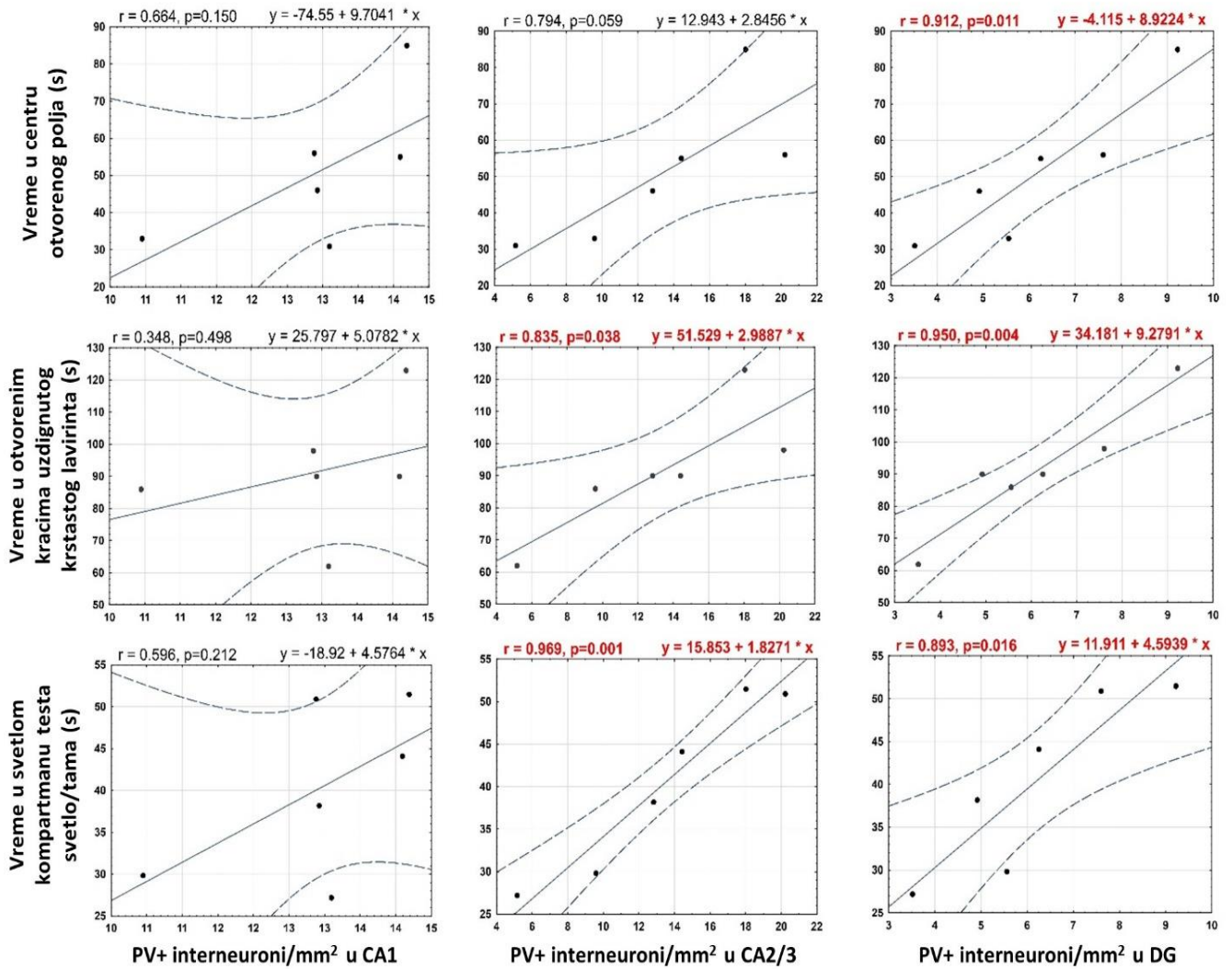
U cilju procene povezanosti broja PV+ interneurona u CA1, CA2/3 i DG regionima hipokampusa i parametara tri etološka testa za utvrđivanje ponašanja povezanog sa anksioznošću kod pacova iz grupe CP/CPPS, sprovedena je regresiona analiza.

Rezultati ove analize su prikazani na Slici 4.8.1.3. Analiza je pokazala da je broj PV+ interneurona u CA2/3 regionu hipokampusa statistički značajno pozitivno korelirao sa vremenom koje su CP/CPPS životinje provele u otvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta ($r=0,835$, $p<0,05$) i sa vremenom koje su životinje provele u svetlom kompartmanu testa svetlo/tama ($r=0,969$, $p<0,001$).

Takođe, postojala je statistički značajna pozitivna korelacija između broja PV+ interneurona u DG regionu hipokampusa i vremena koje su CP/CPPS životinje provele u centru otvorenog polja ($r=0,912$, $p<0,05$), vremena koje su CP/CPPS životinje provele u otvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta ($r=0,950$, $p<0,01$) i vremena koje su CP/CPPS životinje provele u svetlom kompartmanu testa svetlo/tama ($r=0,893$, $p<0,05$).

Nije uočena statistički značajna korelacija između broja PV+ interneurona u CA1 regionu hipokampusa i parametra ponašanja povezanog sa anksioznošću u etološkim testovima (test otvorenog polja, test uzdignutog krstastog lavirinta i test svetlo/tama) kod životinja iz grupe CP/CPPS ($r=0,664$, $p>0,05$; $r=0,348$, $p>0,05$; $r=0,596$, $p>0,05$, redom).

Isto opažanje postoji i po pitanju korelacije broja PV+ interneurona u regionu CA2/3 hipokampusa i vremena koje su CP/CPPS životinje provele u centru otvorenog polja ($r=0,794$, $p>0,05$).

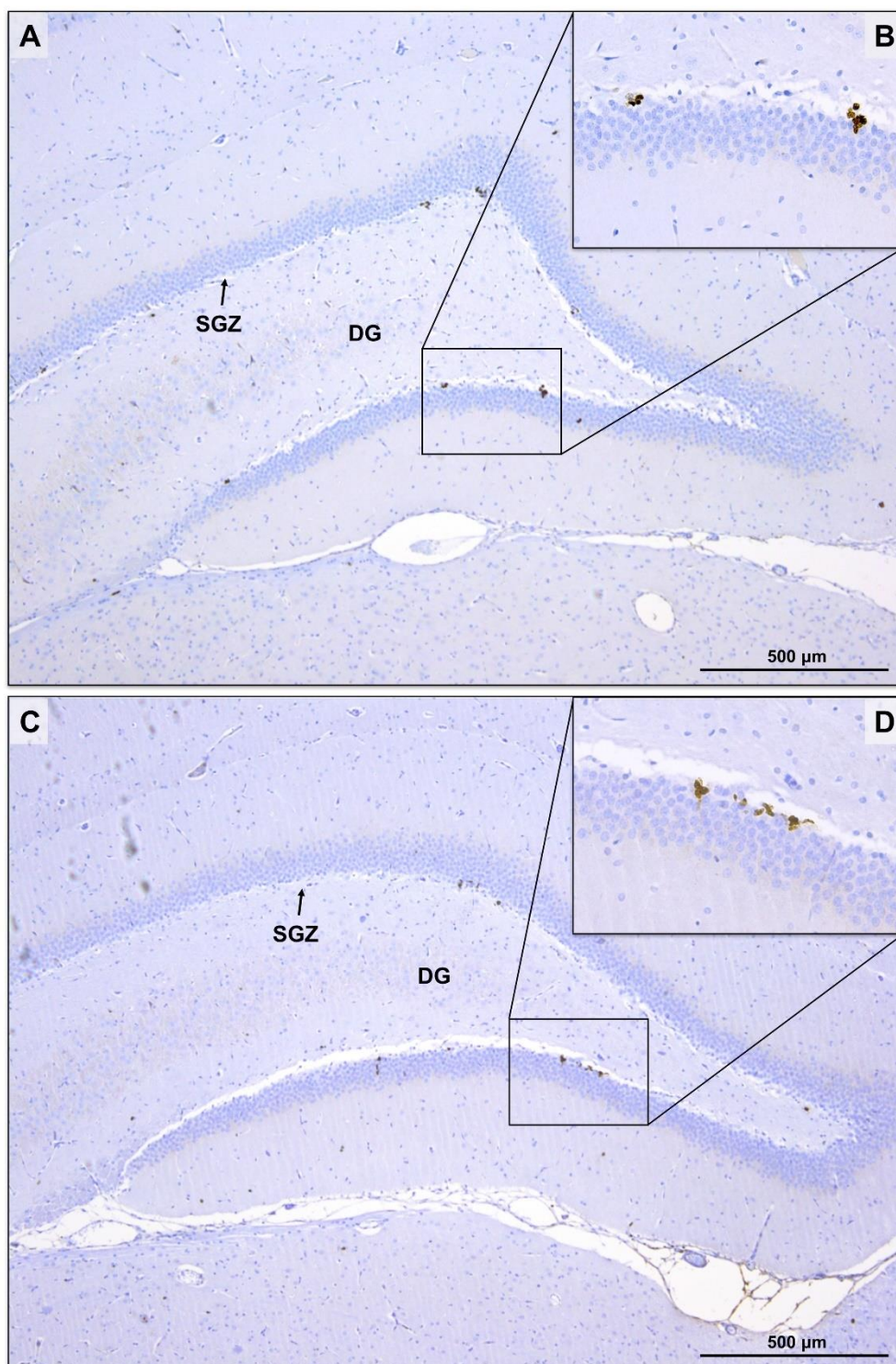


Slika 4.8.1.3. Korelacija broja PV+ interneurona u različitim regionima hipokampusa (CA1, CA2/3 i DG) i parametara etoloških testova za utvrđivanje ponašanja povezanog sa anksioznošću kod CP/CPPS životinja

Regresiona analiza pokazuje da je broj PV+ interneurona u CA2/3 regionu hipokampusa pozitivno korelirao sa parametrima koji ukazuju na ponašanje povezano sa anksioznošću u testovima otvorenog polja, uzdignutog krstastog lavirinta i svetlo/tama. Takođe, postojala je i jaka pozitivna korelacija između broja PV+ interneurona u DG regionu hipokampusa i parametara koji ukazuju na ponašanje povezano sa anksioznošću u testovima otvorenog polja, uzdignutog krstastog lavirinta i svetlo/tama. Pirsonov koeficijent korelacije (Pirsonov r) i nivo statističke značajnosti korelacije (p-vrednost) su takođe prikazani na slici. Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

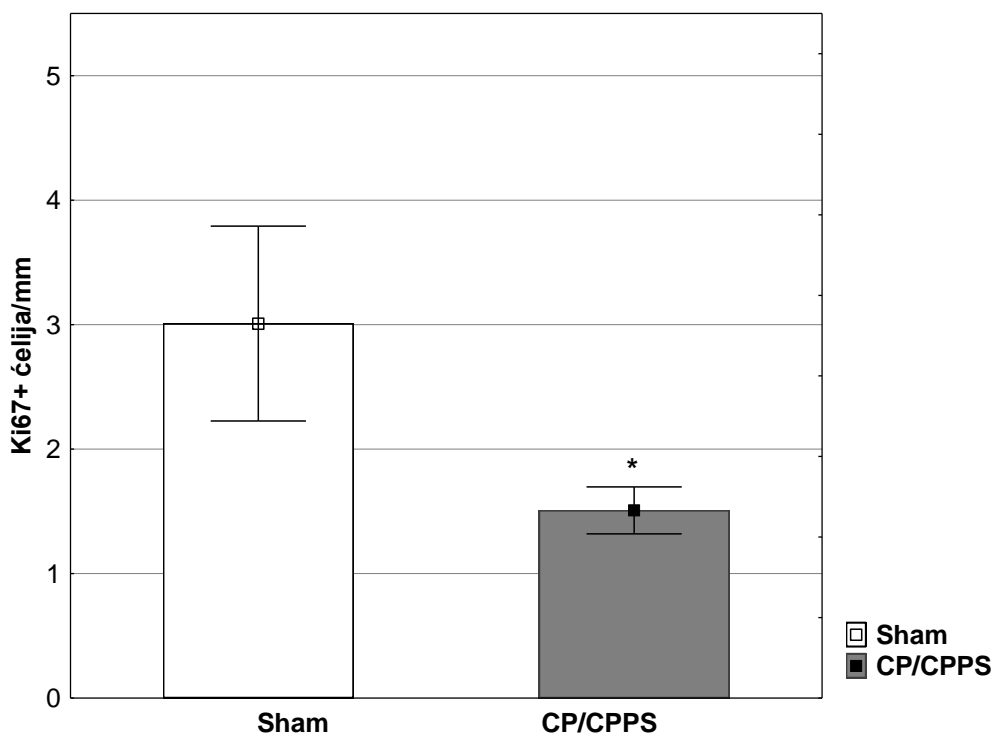
4.8.2. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju Ki-67+ ćelija u hipokampusu

Ekspresija Ki-67-imunoreaktivnosti u hipokampusima životinja iz grupa Sham i CP/CPPS je predominantno lokalizovana duž SGZ u DG (Slika 4.8.2.1.A-D.). Kvantitativna analiza broja Ki-67+ ćelija je pokazala je on bio statistički značajno manji kod CP/CPPS životinja, u poređenju sa odgovarajućim Sham kontrolama (Sham vs. CP/CPPS, $p < 0,05$, Slika 4.8.2.2.).



Slika 4.8.2.1. Reprezentativna fotomikrografija Ki-67+ ćelija u hipokampusu Sham (A, B) i CP/CPPS životinja (C, D)

Prikaz subgranularne zone (SGZ) koja se prostire duž dentatnog girusa (DG) hipokampusa Sham (A) i CP/CPPS životinja (C) uz uvećani prikaz nekoliko Ki-67+ ćelija kod Sham (B) i CP/CPPS životinja (D) lokalizovanih u DG duž SGZ. Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

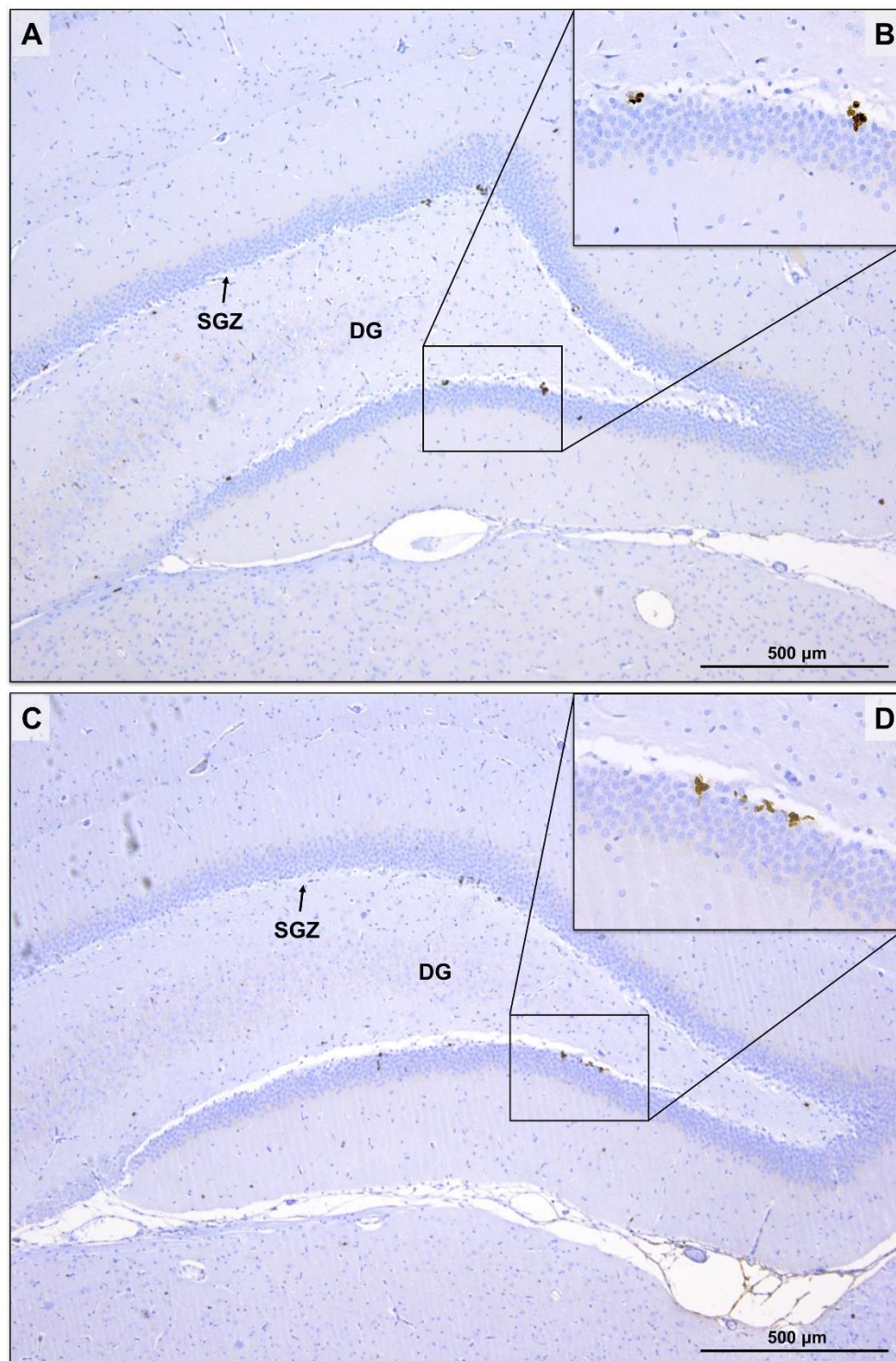


Slika 4.8.2.2. Broj Ki-67+ ćelija u hipokampusu Sham i CP/CPPS životinja

Kvantifikovanje ekspresije Ki-67 prikazano je kao broj Ki-67+ ćelija standardizovan prema 1mm dužine SGZ. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa (* $p < 0,05$ vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

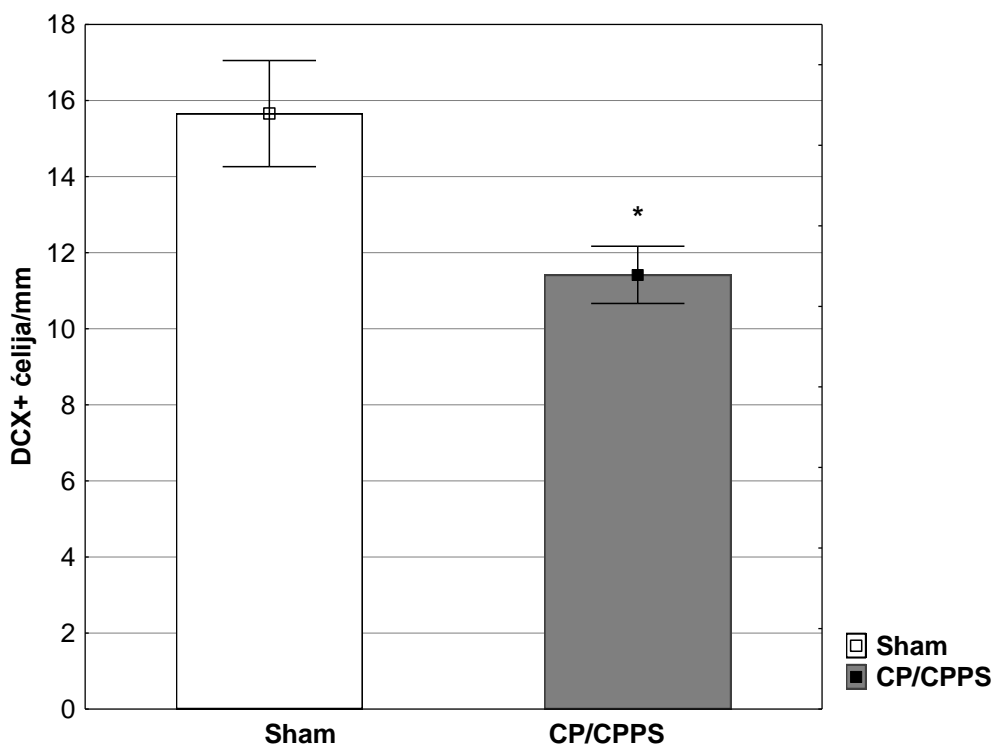
4.8.3. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju DCX+ ćelija u hipokampusu

DCX imunoreaktivni neuroni u hipokampusima CP/CPPS i Sham životinja su bili predominantno lokalizovani duž SGZ u DG hipokampusu (Slika 4.8.3.1.A-D.). Kvantifikovanjem ekspresije DCX zaključeno je da su CP/CPPS životinje imale statistički značajno manji ($p < 0,05$) broj DCX+ ćelija duž SGZ u DG, u odnosu na Sham životinje (Slika 4.8.3.2.).



Slika 4.8.3.1. Reprezentativna fotomikrografija DCX+ ćelija u hipokampusu Sham (A, B) i CP/PPS životinja (C, D)

Prikaz subgranularne zone (SGZ) koja se prostire duž dentatnog girusa (DG) hipokampusa Sham (A) i CP/PPS životinja (C) uz uvećani prikaz nekoliko DCX+ ćelija kod Sham (B) i CP/PPS životinja (D) lokalizovanih u DG duž SGZ. Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.



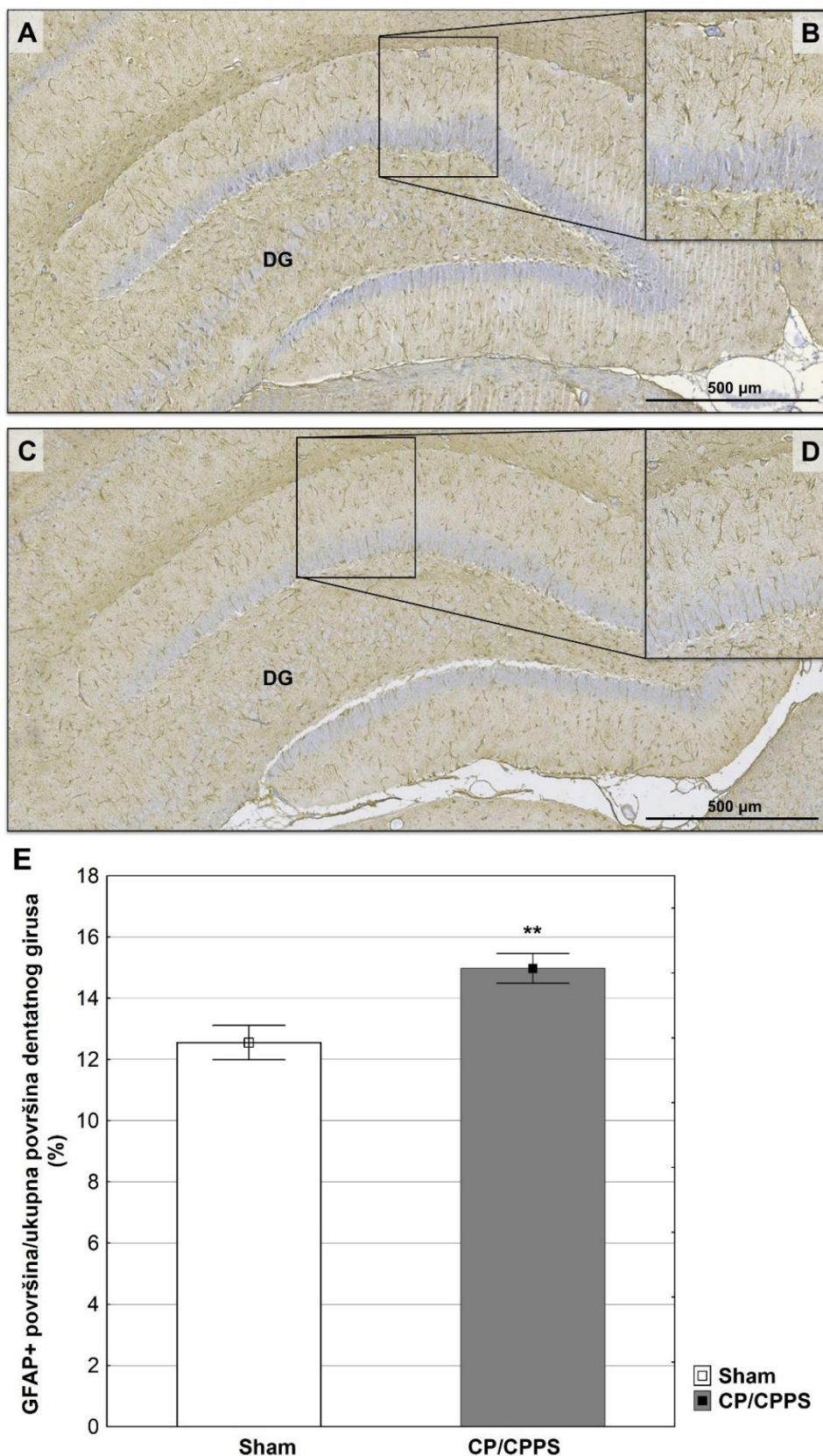
Slika 4.8.3.2. Broj DCX+ ćelija u hipokampusu Sham i CP/CPPS životinja

Kvantifikovanje ekspresije DCX prikazano je kao broj DCX+ ćelija standardizovan prema 1mm dužine SGZ. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlika između dve grupe je utvrđena upotrebom *t*-testa (* $p < 0,05$ vs. Sham). Za detalje videti opis uz Sliku 4.1.

4.8.4. Uticaj CP/CPPS na ekspresiju GFAP+ astrocita u hipokampusu

Astrociti, koji uobičajeno sadrže GFAP su rasprostranjeni širom DG hipokampusa. Na fotomikrografiji se jasno mogu uočiti ćelijska tela i produžeci GFAP+ astrocita kod Sham i CP/CPPS životinja (Slika 4.8.4.A-D.).

Kvantifikovanje zastupljenosti GFAP, učinjeno izračunavanjem frakcije površine GFAP+ ćelija u odnosu na ukupnu površinu DG, pokazuje da se kod CP/CPPS životinja zapaža statistički značajno veća zastupljenost GFAP+ ćelija ($p < 0,01$) u DG hipokampusa, u odnosu na Sham životinje (Slika 4.8.4.E.).



Slika 4.8.4. Reprezentativna fotomikrografija GFAP+ astrocita u hipokampusu Sham (A,B) i CP/CPPS (C,D) životinja i kvantifikovanje GFAP imunoreaktivnost astrocita (E)

Prikaz obeležene zone dentatnog girusa (DG) hipokampusu Sham (A) i CP/CPPS životinja (C) uz uvećani prikaz nekoliko GFAP+ ćelija Sham (B) i CP/CPPS životinja (D) lokalizovanih širom DG hipokampusu. Kvantifikovanje GFAP+ ćelija (E) je prikazano kao frakcija površine koja pripada GFAP+ astrocitima u procentima (%) u odnosu na ukupnu površinu DG, a vrednosti su srednja vrednost \pm standardna devijacija. Značajnost razlike između grupa je utvrđena t-testom ($*p < 0,01$ vs. Sham). Za detalje videti opis Slike 4.1.

4.9. Uticaj modulacije nivoa CO na pacove sa eksperimentalnim CP/CPPS

Kako bismo ispitali modulatorni efekat CO, aplikovan je njegov donor, molekul CORM-A1 u sedmodnevnom postoperativnom periodu.

Procenjen je uticaj modulacije nivoa endogenog CO na bihevioralne, elektrofiziološke i histološke alteracije tkiva prostate koje se javljaju u sklopu eksperimentalnog CP/CPPS.

Životinje su podvrgnute merenju skrotalnog praga bola evF esteziometrom, ispitivanju ponašanja povezanog sa anksioznošću (L/D, EPM, OF testovi), ispitivanju ponašanja povezanog sa depresijom (FST).

Nakon žrtvovanja pacova, prostate su H/E tehnikom obrađene i histološki ispitane.

4.9.1. Uticaj CORM-A1 na skrotalni prag bola

Skrotalni prag bola na mehaničku draž je utvrđivan kod svih životinja iz grupa Sham-PBS, Sham-CORM, CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM u preoperativnom periodu (bazalni uslovi, 2 i 1 dan pre operacije), kao i u postoperativnom periodu (2., 3. i 7. dana nakon operacije).

U bazalnim uslovima nije zapažena razlika u skrotalnom pragu bola između grupa (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p > 0,05$, Slika 4.9.1.).

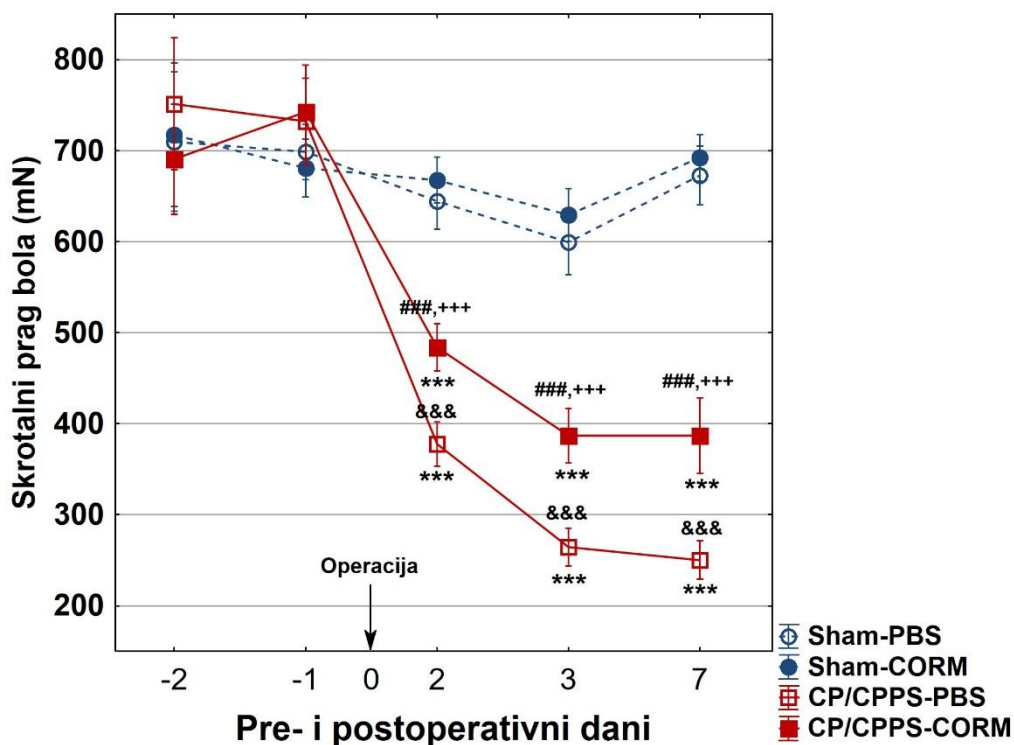
Takođe, kod životinja iz grupa Sham-PBS i Sham-CORM, operacija nije dovela do statistički značajne postoperativne promene u skrotalnom pragu bola u poređenju sa početnim vrednostima pre operacije ($p > 0,05$, Slika 4.9.1.).

Intraprostatična injekcija 3% λ -karagenina je, u poređenju sa kontrolnim tretmanom, dovela do razvoja eksperimentalnog CP/CPPS i do statistički značajnog smanjenja skrotalnog praga bola na mehaničku draž (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,001$; Slika 4.9.1.) 2., 3. i 7. dana nakon operacije.

Takođe, kod eksperimentalnih životinja iz grupa CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM je utvrđeno postojanje statistički značajnog smanjenja praga bola na mehaničku draž u 2., 3. i 7. postoperativnom danu u poređenju sa vrednostima pre intraprostatične injekcije ($p < 0,001$, Slika 4.9.1.).

Posebno bitno, statistička analiza je pokazala da je u svim analiziranim postoperativnim danima, aplikacija CORM-A1 dovela do visoko statistički značajnog povećanja skrotalnog praga bola u odnosu na kontrolni tretman rastvaračem (CP/CPPS-PBS vs. CP/CPPS-CORM, $p < 0,001$, Slika 4.9.1.).

Dodatno, statistička analiza je pokazala da aplikacija CORM-A1 kod kontrolnih životinja u svim analiziranim preoperativnim i postoperativnim danima nije dovela do promene skrotalnog praga bola u odnosu na kontrolni tretman rastvaračem (Sham-PBS vs. Sham-CORM, $p > 0,05$, Slika 4.9.1.).



Slika 4.9.1. Uticaj CORM-A1 na skrotalni prag bola kod životinja sa CP/CPPS

Životinje su testirane evF esteziometrom 2 i 1 dan pre, kao i 2., 3. i 7. dana nakon operacije. U zavisnosti od intraprostatičnog tretmana, životinje su podeljene u dve grupe: Sham (intraprostatična injekcija 0,9% NaCl) i CP/CPPS (intraprostatična injekcija 3% λ -karagenina). Dve grupe životinja su u sedmodnevnom postoperativnom periodu tretirane drugačije, te su formirane četiri grupe životinja: Sham-PBS i CP/CPPS-PBS (i.p. injekcija PBS svakodnevno tokom 7 dana) i Sham-CORM i CP/CPPS-CORM (i.p. injekcija CORM-A1 svakodnevno tokom 7 dana). Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u skrotalnom pragu bola između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem (&&& $p < 0,001$ vs. Sham-PBS; +++ $p < 0,001$ vs. Sham-CORM; ### $p < 0,001$ vs. CP/CPPS-PBS). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom (** $p < 0,001$, vs. -1).

4.9.2. Uticaj CORM-A1 na ponašanje povezano sa anksioznošću

Sve životinje iz grupa Sham-PBS, Sham-CORM, CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM su 2., 3., i 7. postoperativnog dana podvrgnute L/D, EPM i OF testovima

Uticaj modulacije nivoa CO na ponašanje pacova u testu svetlo/tama

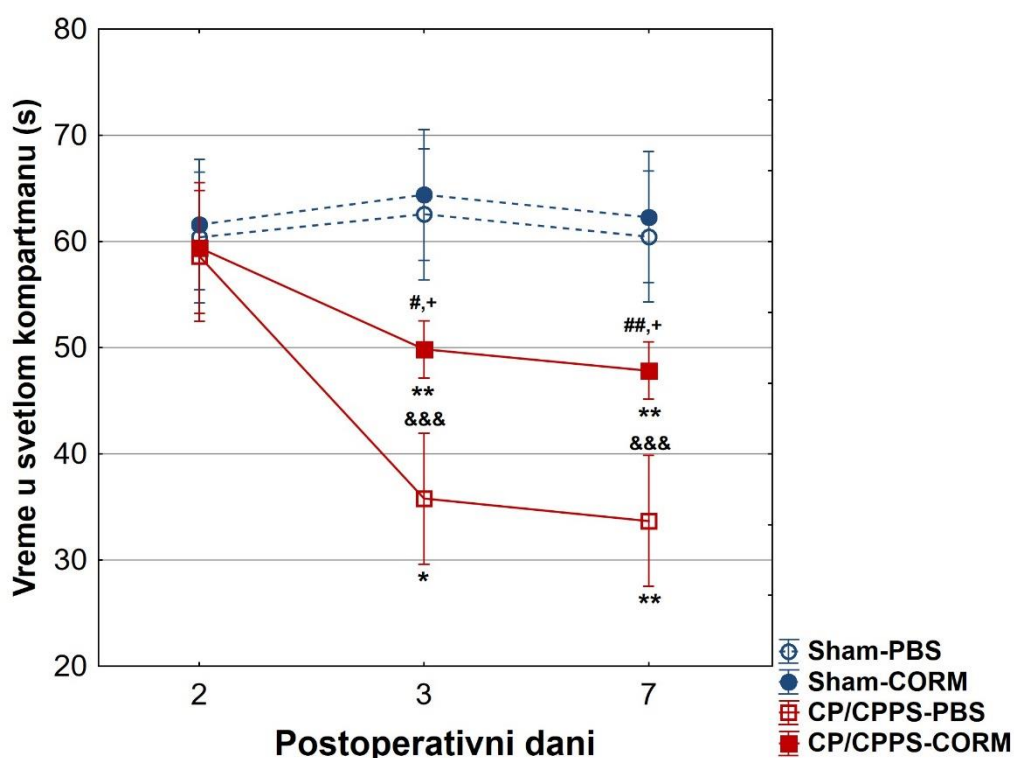
Analiza ponašanja u L/D testu je pokazala da u 2. postoperativnom danu nije postojala statistički značajna međugrupna razlika u vremenu provedenom u svetlom kompartmanu između eksperimentalnih i kontrolnih životinja (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p > 0,05$; Slika 4.9.2.1).

Životinje iz grupa CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM su provele statistički značajno manje vremena u svetlom kompartmanu 3. (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,05$) i 7. postoperativnog dana (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,05$) u poređenju sa korespondentnim kontrolama (Slika 4.9.2.1).

Dodatno, životinje sa prostatitisom koje su u postoperativnom periodu tretirane CORM-A1 su provele statistički značajno više vremena u svetlom kompartmanu 3. ($p < 0,05$) i 7. postoperativnog dana ($p < 0,01$) u poređenju sa životinjama sa prostatitisom koje su postoperativno tretirane PBS (CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS; Slika 4.9.2.1).

Unutargrupno poređenje parametara ovog testa je pokazalo da su CP/CPPS-PBS životinje provele statistički značajno manje vremena u svetlom kompartmanu u 3. ($p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.1.). Slična opservacija važi i za CP/CPPS-CORM životinje koje su provele statistički značajno manje vremena u svetlom kompartmanu u 3. ($p < 0,01$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.1.).

Unutargrupna razlika navedenih parametara testa nije postojala kod životinja iz grupa Sham-PBS i Sham-CORM ($p > 0,05$).



Slika 4.9.2.1. Uticaj CORM-A1 na vreme provedeno u svetlom kompartmanu u testu svetlo/tama kod životinja sa CP/CPPS

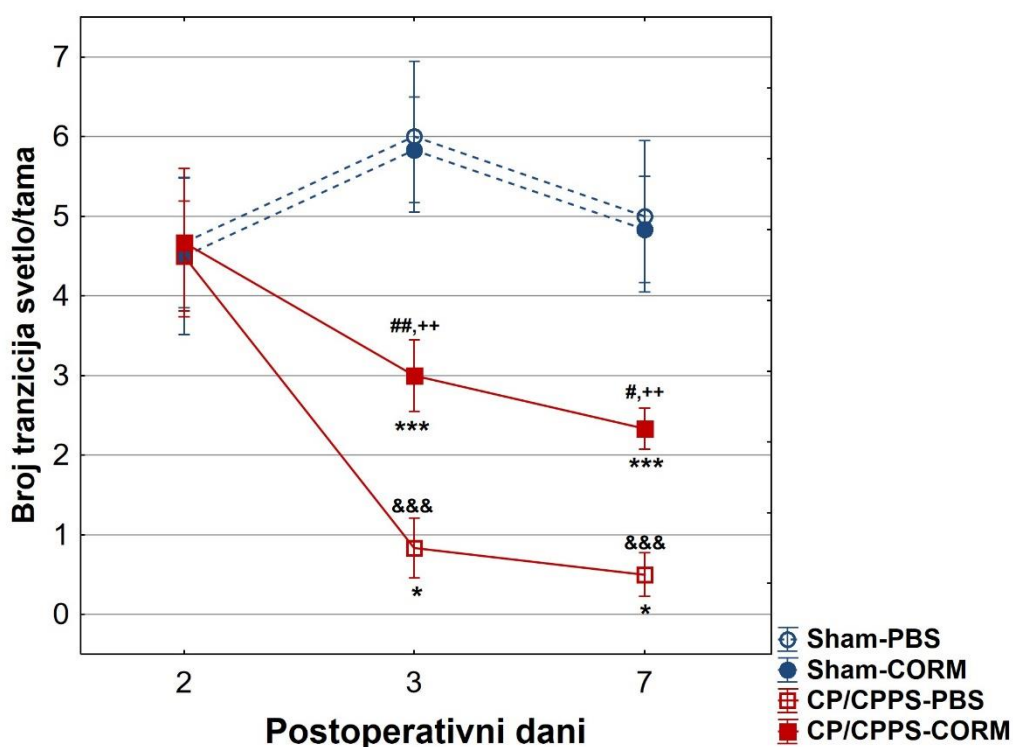
Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u vremenu provedenom u svetlom kompartmanu između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($&&&p < 0,001$ vs. Sham-PBS; $+p < 0,05$, vs. Sham-CORM; $\#p < 0,05$, $\#\#p < 0,01$ vs. CP/CPPS-PBS). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

U 2. postoperativnom danu nije postojala statistički značajna međugrupna razlika u broju tranzicija iz svetlog u tamni kompartman (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p > 0,05$; CP/CPPS-PBS vs. CP/CPPS-CORM, $p > 0,05$; Slika 4.9.2.2.).

Životinje sa prostatitisom iz obeju grupa su napravile statistički značajno manji broj tranzicija u 3. (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,01$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-

CORM, $p < 0,01$), u poređenju sa korespondentnim kontrolama (Slika 4.9.2.2.). Dodatno, životinje sa prostatitisom koje su postoperativno tretirane CORM-A1 su imale statistički značajno više tranzicija u 3. (CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p < 0,01$) i 7. postoperativnog dana (CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p < 0,05$), u poređenju sa životinjama sa prostatitisom koje su postoperativno tretirane PBS (Slika 4.9.2.2.).

Analiza unutargrupne distribucije vrednosti ovog parametra u postoperativnom periodu je pokazala da su životinje iz grupe CP/CPPS-PBS napravile statistički značajno manji broj tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana u 3. ($p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.2.). Slično ovome, kod CP/CPPS-CORM životinja, broj tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana je bio statistički značajno manji u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.2.). Unutargrupna razlika distribucije navedenog parametra testa nije opservirana kod životinja iz grupa Sham-PBS i Sham-CORM ($p > 0,05$).



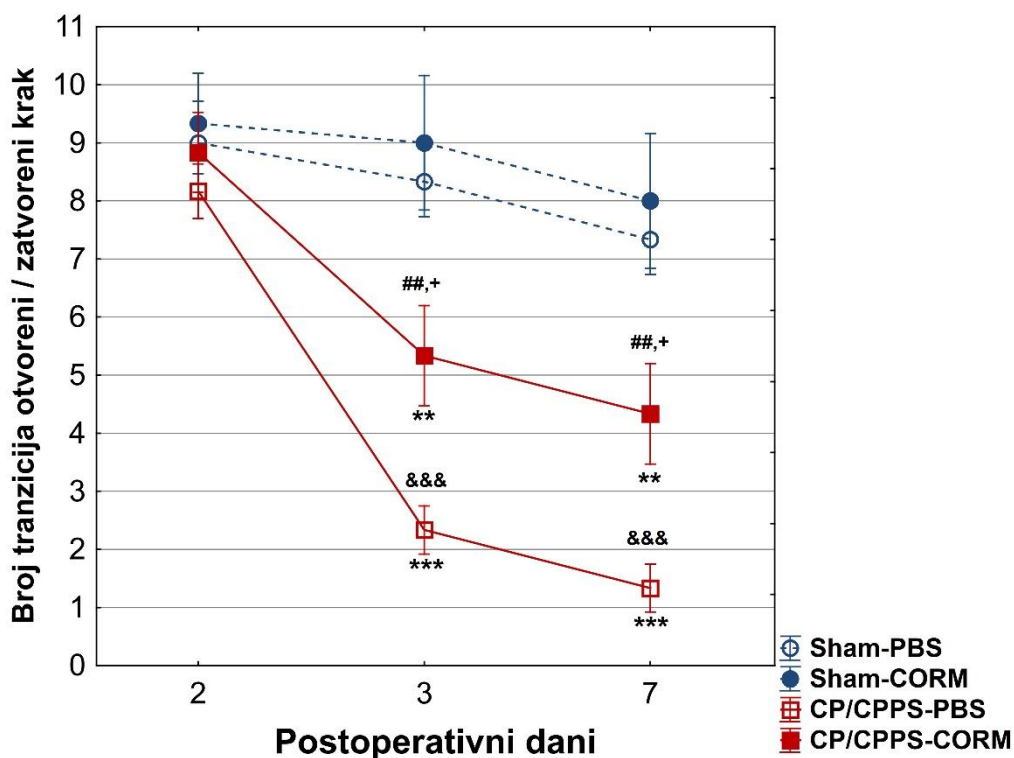
Slika 4.9.2.2. Uticaj CORM-A1 na broj tranzicija iz svetlog u tamni kompartman u testu svetlo/tama kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u broju tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem (&&& $p < 0,001$ vs. Sham-PBS; ++ $p < 0,01$ vs. Sham-CORM; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. CP/CPPS-PBS). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

Uticaj modulacije nivoa CO na ponašanje pacova u testu uzdignutog krstastog lavirinta

Drugog postoperativnog dana nije bilo značajne međugrupne razlike u broju tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p > 0,05$; Slika 4.9.2.3.).

Eksperimentalne CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM životinje su napravile statistički značajno manji broj tranzicija u 3. (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,05$) i u 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,05$) u poređenju sa kontrolama (Slika 4.9.2.3.). Poređenje životinja sa prostatitisom postoperativno tretiranih CORM-A1 i postoperativno tretiranih PBS je pokazalo da su CP/CPPS-CORM životinje napravile statistički značajno veći broj tranzicija u 3. ($p < 0,001$) i u 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$), u poređenju sa CP/CPPS-PBS životinjama (Slika 4.9.2.3.).



Slika 4.9.2.3. Uticaj CORM-A1 na broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova uzdignutog krstastog lavirinta kod životinja sa CP/CPPS

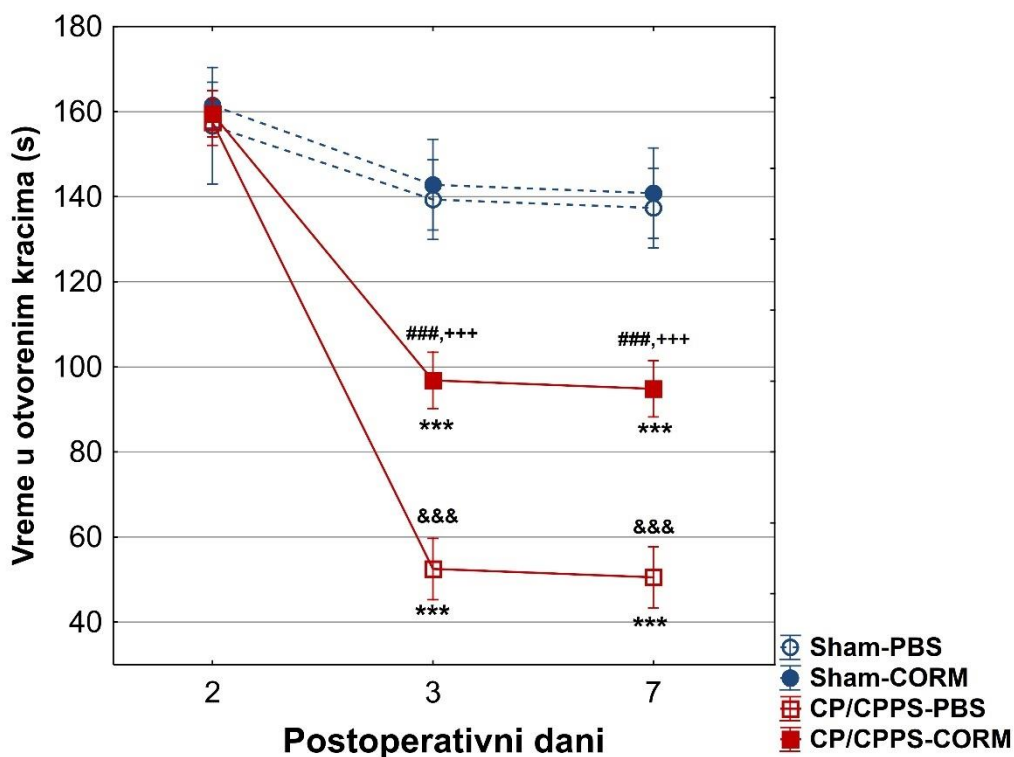
Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost međugrupne razlike u broju tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($\&\&\&p < 0,001$ vs. Sham-PBS; $+p < 0,05$, vs. Sham-CORM; $\#\#\#p < 0,01$, vs. CP/CPPS-PBS). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($**p < 0,01$, $***p < 0,001$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

Unutargrupno poređenje kod CP/CPPS-PBS životinja je pokazalo da su napravile statistički značajno manji broj tranzicija u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.3.). Slično, CP/CPPS-CORM životinje su napravile statistički značajno manji broj tranzicija u 3. ($p < 0,01$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.3.). Statistički značajna unutargrupna razlika distribucije broja tranzicija nije opservirana kod životinja iz grupa Sham-PBS i Sham-CORM ($p > 0,05$, Slika 4.9.2.3.).

Slična opservacija je postojala u pogledu vremena provedenog u otvorenim kracima lavirinta u 2. postoperativnom danu, gde je primećeno da nije postojala statistički značajna međugrupna razlika ovog parametra (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p > 0,05$; Slika 4.9.2.4.).

Životinje sa prostatitisom iz obeju grupa su provele statistički značajno manje vremena u otvorenim kracima u 3. (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,001$) i u 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,001$), u poređenju sa kontrolnim životinjama bez prostatitisa (Slika 4.9.2.4.). Dodatno poređenje je pokazalo da su životinje sa prostatitisom koje su postoperativno tretirane CORM-A1, u odnosu na one koje su tretirane rastvaračem PBS, provele statistički značajno više vremena u otvorenim kracima u 3. ($p < 0,001$), kao i u 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u poređenju sa životinjama sa prostatitisom koje su postoperativno tretirane PBS (CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, Slika 4.9.2.4.).

Analiza unutargrupne distribucije vremena provedenog u otvorenim kracima lavirinta je pokazala da su životinje sa prostatitisom iz grupa CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM provele statistički značajno manje vremena u otvorenim kracima u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.4.). Unutargrupna razlika ovog parametra testa nije opservirana kod životinja iz grupa Sham-PBS i Sham-CORM ($p > 0,05$, Slika 4.9.2.4.).

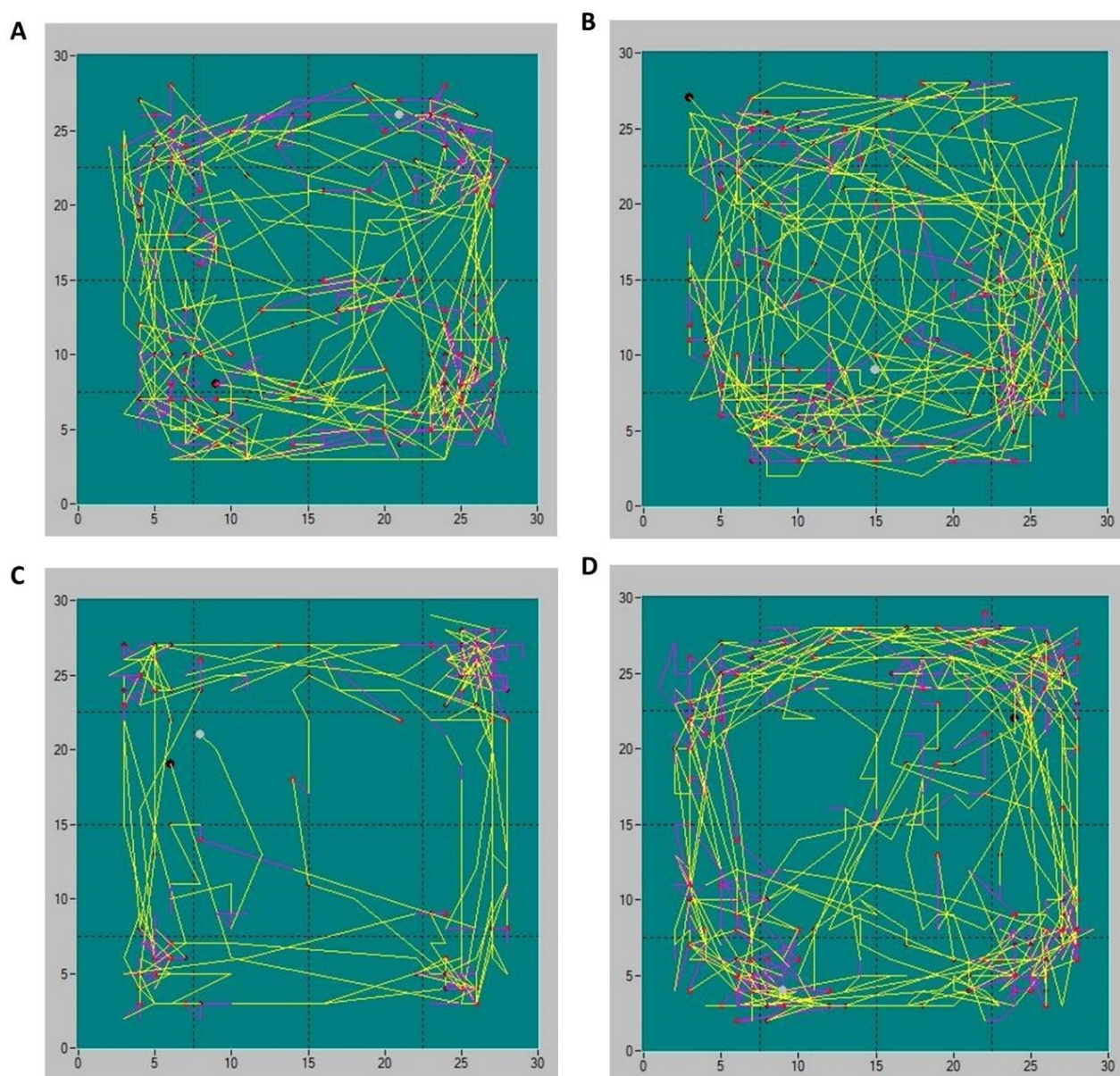


Slika 4.9.2.4. Uticaj CORM-A1 na vreme provedeno u otvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost međugrupne razlike u vremenu provedenom u otvorenim kracima je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($\&\&\&p < 0,001$ vs. Sham-PBS; $+++p < 0,001$, vs. Sham-CORM; $###p < 0,001$, vs. CP/CPPS-PBS). Statistička značajnost unutargrupnih razlika je procenjena istim testom ($***p < 0,001$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

Uticaj modulacije nivoa CO na ponašanje pacova u testu otvorenog polja

Vizuelna inspekcija i analiza registrovane lokomotorne aktivnosti su pokazali različite obrasce ponašanja kontrolnih i eksperimentalnih životinja. Na Slici 4.9.2.5. su prikazani reprezentativni snimci trajektorije kretanja životinja.



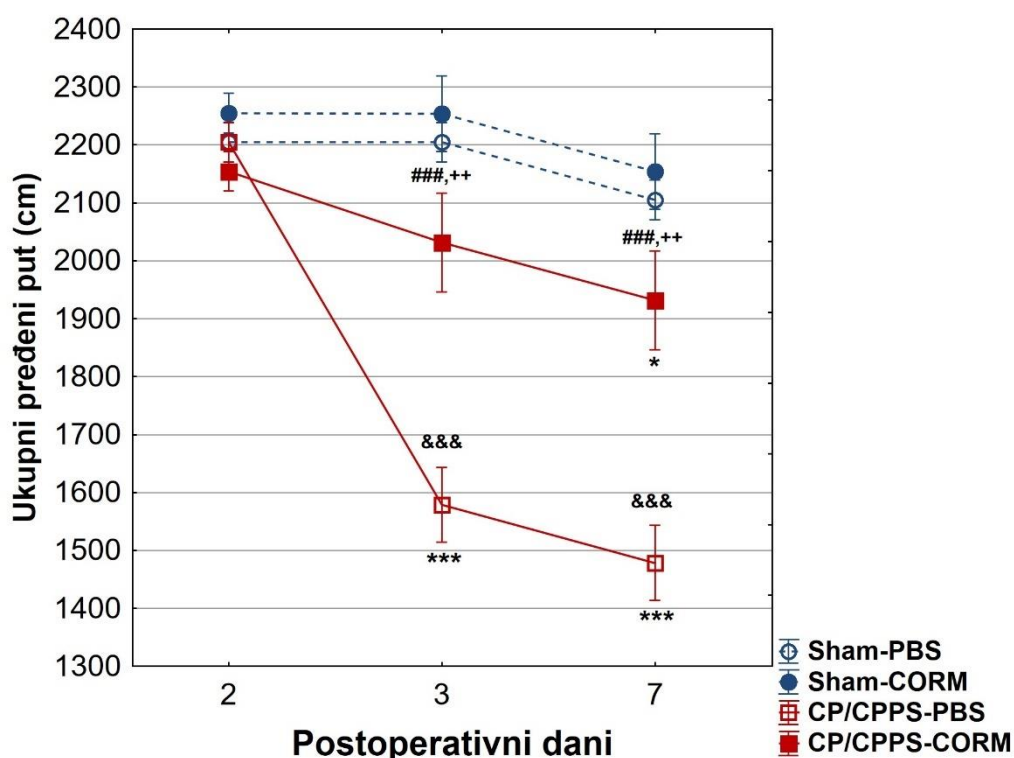
Slika 4.9.2.5. Reprezentativni obrasci horizontalne i vertikalne lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja kod Sham-PBS (A), Sham-CORM (B), CP/CPSS-PBS (C) i CP/CPSS-CORM (D) životinja

Testiranje u otvorenom polju je vršeno tokom 15 minuta, pojedinačno za svaku životinju. Automatsko registrovanje spontane lokomotorne aktivnosti je izvršeno pomoću sistema infracrvenih senzora, a potom analizirano pratećim programskim paketom (Conducta 1.0).

Analiza horizontalne lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja je pokazala da u 2. postoperativnom danu nije postojala statistički značajna međugrupna razlika u ukupnom pređenom putu (CP/CPSS-PBS vs. Sham-PBS, $p > 0,05$; CP/CPSS-CORM vs. Sham-CORM, $p > 0,05$; CP/CPSS-CORM vs. CP/CPSS-PBS, $p > 0,05$; Slika 4.9.2.6.). Eksperimentalne životinje sa prostatitisom iz grupa CP/CPSS-PBS i CP/CPSS-CORM su prešle statistički značajno kraći ukupni put tokom 3. (CP/CPSS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPSS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,01$) i 7. postoperativnog dana (CP/CPSS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPSS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,01$), u poređenju sa korespondentnim Sham-PBS i Sham-CORM kontrolama (Slika 4.9.2.6.).

Životinje sa prostatitisom postoperativno tretirane CORM-A1 su imale statistički značajno duži ukupni pređeni put u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u poređenju sa životinjama sa prostatitisom postoperativno tretiranim PBS (CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, Slika 4.9.2.6.).

Unutargrupna distribucija ukupnog pređenog puta je pokazala da je kod CP/CPPS-PBS životinja on bio statistički značajno kraći u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.6.). Sa druge strane, CP/CPPS-CORM životinje su napravile statistički značajno manji ukupni pređeni put u 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.6.), dok ova razlika nije bila statistički značajna u 3. postoperativnom danu ($p > 0,05$, Slika 4.9.2.6.). Unutargrupna razlika navedenog parametara testa nije opservirana kod kontrolnih Sham-PBS i Sham-CORM životinja ($p > 0,05$, Slika 4.9.2.6.).



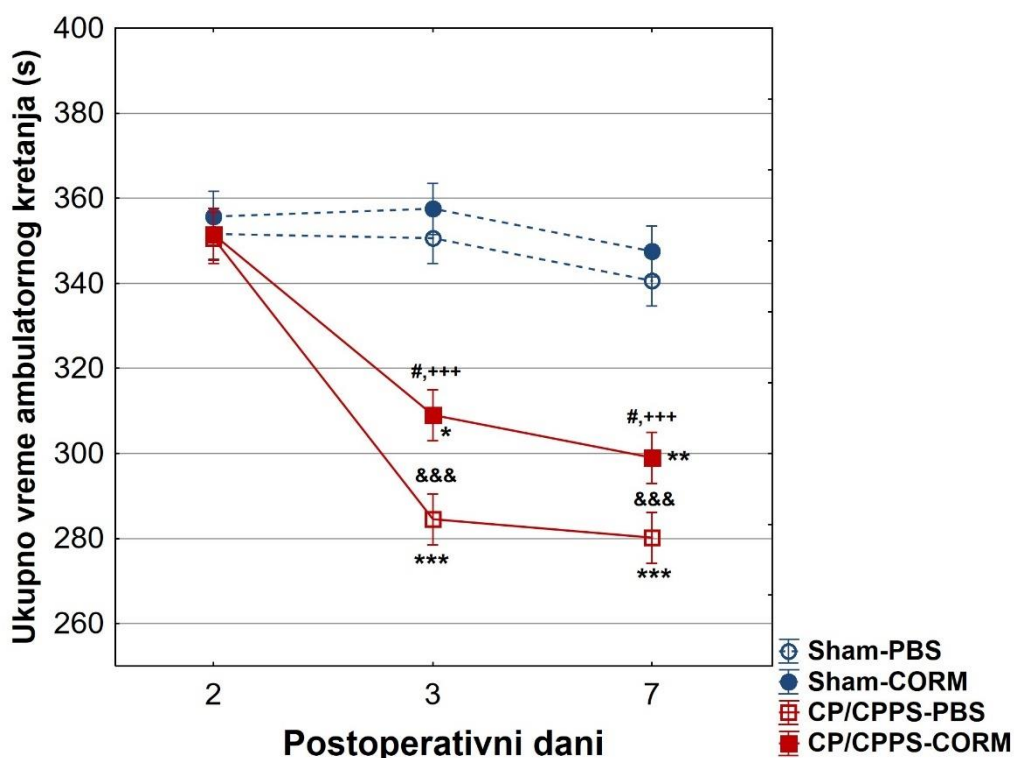
Slika 4.9.2.6. Uticaj CORM-A1 na ukupni pređeni put u testu otvorenog polja kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u ukupnom pređenom putu između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($\&\&\&p < 0,001$, vs. Sham-PBS; $++p < 0,01$, vs. Sham-CORM; $###p < 0,001$ vs. CP/CPPS-PBS). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($*p < 0,05$, $***p < 0,001$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

Takođe, ukupno vreme ambulatornog kretanja (Slika 4.9.2.7.) je kod životinja iz grupa CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM, u poređenju sa kontrolnim životinjama Sham-PBS i Sham-CORM, bilo statistički značajno kraće u 3. (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,001$). Dodatno poređenje je pokazalo da su životinje sa prostatitisom koje su postoperativno tretirane CORM-A1, u odnosu na životinje sa prostatitisom koje su tretirane rastvaračem PBS, imale statistički značajno duže ukupno vreme ambulatornog kretanja u 3. (CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p < 0,05$), kao i u 7.

postoperativnom danu (CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p < 0,05$). U 2. postoperativnom danu, nije postojala statistički značajna međugrupna razlika u ovom parametru (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p > 0,05$; Slika 4.9.2.7.).

Analiza unutargrupne distribucije u ukupnom vremenu ambulatornog kretanja kod CP/CPPS-PBS životinja je pokazala da je ono bilo statistički značajno kraće u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.7.). Takođe i CP/CPPS-CORM životinje su imale statistički značajno manje ukupno vreme ambulatornog kretanja u 3. ($p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.7.). Unutargrupna razlika ovog parametara testa nije opservirana kod životinja iz grupa Sham-PBS i Sham-CORM ($p > 0,05$, Slika 4.9.2.7.).



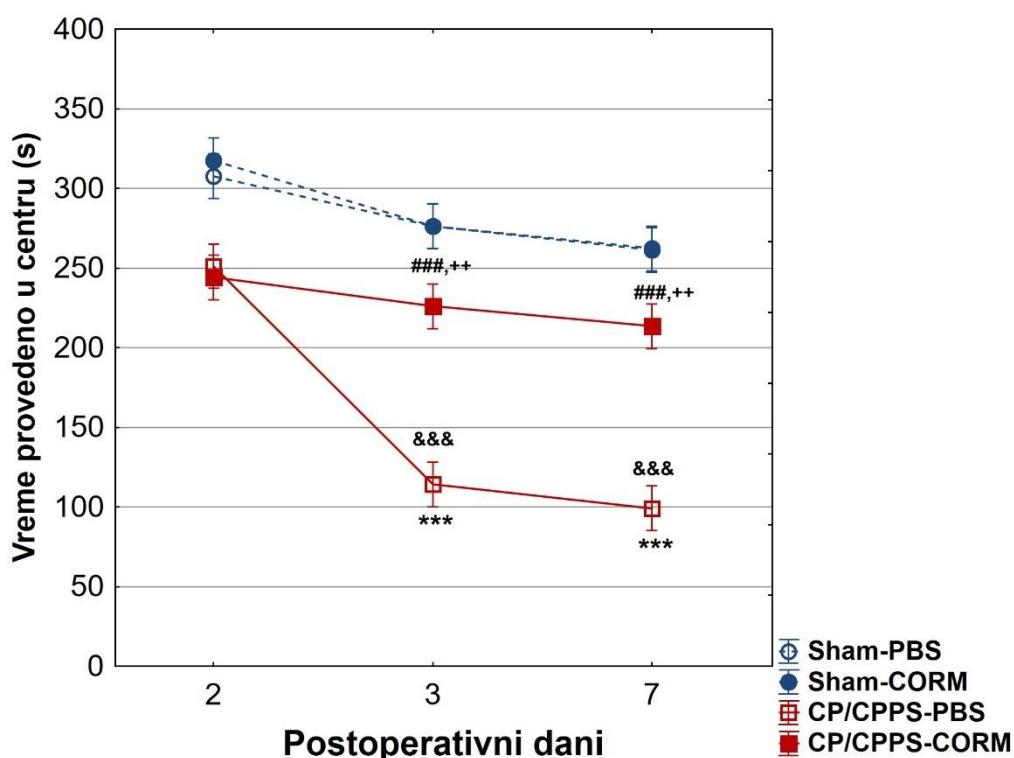
Slika 4.9.2.7. Uticaj CORM-A1 na ukupno vreme ambulatornog kretanja u testu otvorenog polja kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u ukupnom vremenu ambulatornog kretanja između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem (&&& $p < 0,001$ vs. Sham-PBS; +++ $p < 0,001$ vs. Sham-CORM; # $p < 0,05$, vs. CP/CPPS-PBS). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

Analiza vremena provedenog u centru otvorenog polja je pokazala da se ono u 2. postoperativnom danu nije statistički značajno međugrupno razlikovalo (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p > 0,05$; Slika 4.9.2.8.). Sa druge strane, CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM životinje sa prostatitisom su provele statistički značajno manje vremena u centru otvorenog polja u 3. (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,01$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,01$), u poređenju sa korespondentnim Sham-PBS i Sham-CORM kontrolama (Slika 4.9.2.8.).

Postojala je statistički značajna razlika između životinja sa prostatitisom, postoperativno tretiranih injekcijama CORM-A1 i postoperativno tretiranih PBS. Naime, CP/CPPS-CORM životinje su, u odnosu na CP/CPPS-PBS životinje, provele statistički značajno više vremena u centru otvorenog polja, kako u 3. ($p < 0,001$), tako i u 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p < 0,001$, Slika 4.9.2.8.).

Unutargrupna distribucija ovog parametara testa kod CP/CPPS-PBS životinja je pokazala da su one provele statistički značajno manje vremena u centru otvorenog polja u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.8.). Unutargrupna razlika navedenih parametara testa nije opservirana kod životinja iz grupa Sham-PBS, Sham-CORM i CP/CPPS-CORM ($p > 0,05$, Slika 4.9.2.8.).



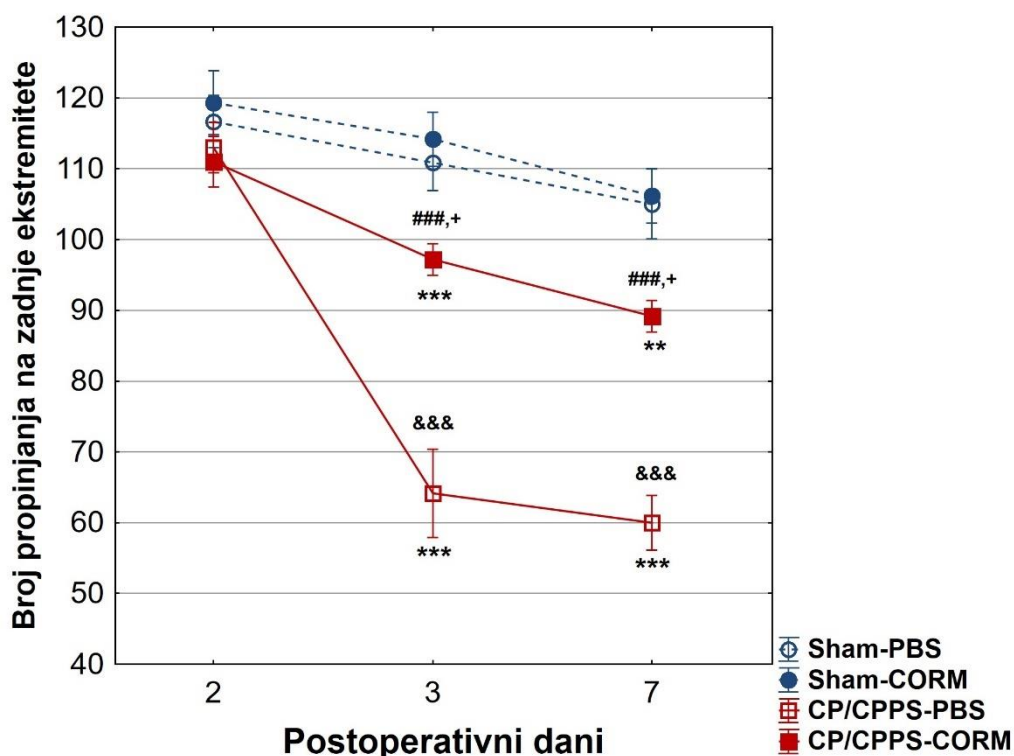
Slika 4.9.2.8. Uticaj CORM-A1 na vreme provedeno u centru otvorenog polja kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost međugrupne razlike u vremenu provedenom u centru otvorenog polja je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($\&\&\&p < 0,001$ vs. Sham-PBS; $++p < 0,01$ vs. Sham-CORM; $###p < 0,001$ vs. CP/CPPS-PBS). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($***p < 0,001$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

Broj propinjanja na zadnje ekstremitete se u 2. postoperativnom danu nije statistički značajno međugrupno razlikovao (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p > 0,05$; CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p > 0,05$; Slika 4.9.2.9.). Međutim, CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM životinje su napravile statistički značajno manji broj propinjanja na zadnje ekstremitete u 3. (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,05$), u poređenju sa Sham-PBS i Sham-CORM životinjama (Slika 4.9.2.9.).

Postoperativno CORM-A1-tretirane životinje sa prostatitisom, u odnosu na PBS-tretirane životinje, napravile su statistički značajno veći broj propinjanja na zadnje ekstremitete, kako u 3. (CP/CPSS-CORM vs. CP/CPSS-PBS, $p < 0,001$, Slika 4.9.2.9.), tako i u 7. postoperativnom danu (CP/CPSS-CORM vs. CP/CPSS-PBS, $p < 0,001$, Slika 4.9.2.9.).

Unutargrupno poređenje ovog parametra testa kod CP/CPSS-PBS životinja je pokazalo da su one imale statistički značajno manji broj propinjanja na zadnje ekstremitete u 3. (vs. 2, $p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu (vs. 2, $p < 0,001$). Takođe, CP/CPSS-CORM životinje su napravile statistički značajno manji broj propinjanja na zadnje ekstremitete u 3. (vs. 2, $p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu (vs. 2, $p < 0,01$). Navedeni parametar se nije statistički značajno unutargrupno razlikovao kod Sham-PBS i Sham-CORM životinja ($p > 0,05$, Slika 4.9.2.9.).



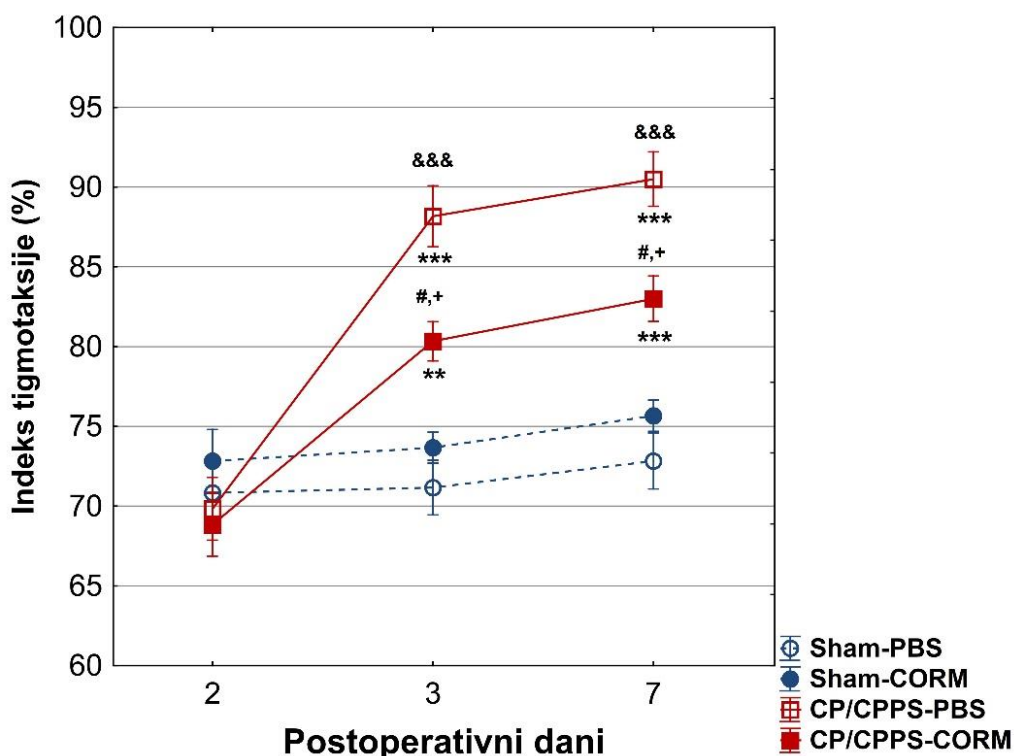
Slika 4.9.2.9. Uticaj CORM-A1 na broj propinjanja na zadnje ekstremitete u testu otvorenog polja kod životinja sa CP/CPSS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost međugrupne razlike u broju propinjanja na zadnje ekstremitete je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem (&&& $p < 0,001$ vs. Sham-PBS; + $p < 0,05$ vs. Sham-CORM; ### $p < 0,001$ vs. CP/CPSS-PBS). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

Analiza indeksa tigmotaksije je pokazala da je on kod CP/CPSS-PBS i CP/CPSS-CORM životinja sa prostatitisom bio statistički značajno veći u 3. (CP/CPSS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPSS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPSS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$; CP/CPSS-CORM vs. Sham-CORM, $p < 0,05$), u poređenju sa Sham-PBS i Sham-CORM grupama (Slika 4.9.2.10.). Postojala je razlika između životinja sa prostatitisom koje su postoperativno tretirane CORM-A1 i tretiranih rastvaračem PBS. Naime, životinje iz grupe CP/CPSS-CORM su u odnosu na CP/CPSS-PBS životinje imale statistički značajno manji indeks tigmotaksije, kako u 3. ($p < 0,05$), tako i u 7. postoperativnom danu (CP/CPSS-CORM vs. CP/CPSS-PBS, $p < 0,05$, Slika 4.9.2.10.). Indeks tigmotaksije nije pokazivao statistički značajnu

međugrupnu razliku u 2. postoperativnom danu (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p>0,05$; CP/CPPS-CORM vs. Sham-CORM, $p>0,05$; CP/CPPS-CORM vs. CP/CPPS-PBS, $p>0,05$; Slika 4.9.2.10.).

Unutargrupno poređenje ovog parametara kod CP/CPPS-PBS životinja je pokazalo da su one ispoljavale statistički značajno veći indeks tigmotaksije u 3. ($p<0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p<0,001$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.10.). Takođe, CP/CPPS-PBS životinja su imale statistički značajno veći indeks tigmotaksije u 3. (vs. 2, $p<0,01$) i 7. postoperativnom danu (vs. 2, $p<0,001$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.9.2.10). Unutargrupna razlika indeksa tigmotaksije nije opservirana kod životinja iz grupa Sham-PBS i Sham-CORM ($p>0,05$, Slika 4.9.2.10.).



Slika 4.9.2.10. Uticaj CORM-A1 na indeks tigmotaksije u testu otvorenog polja kod životinja sa CP/CPPS

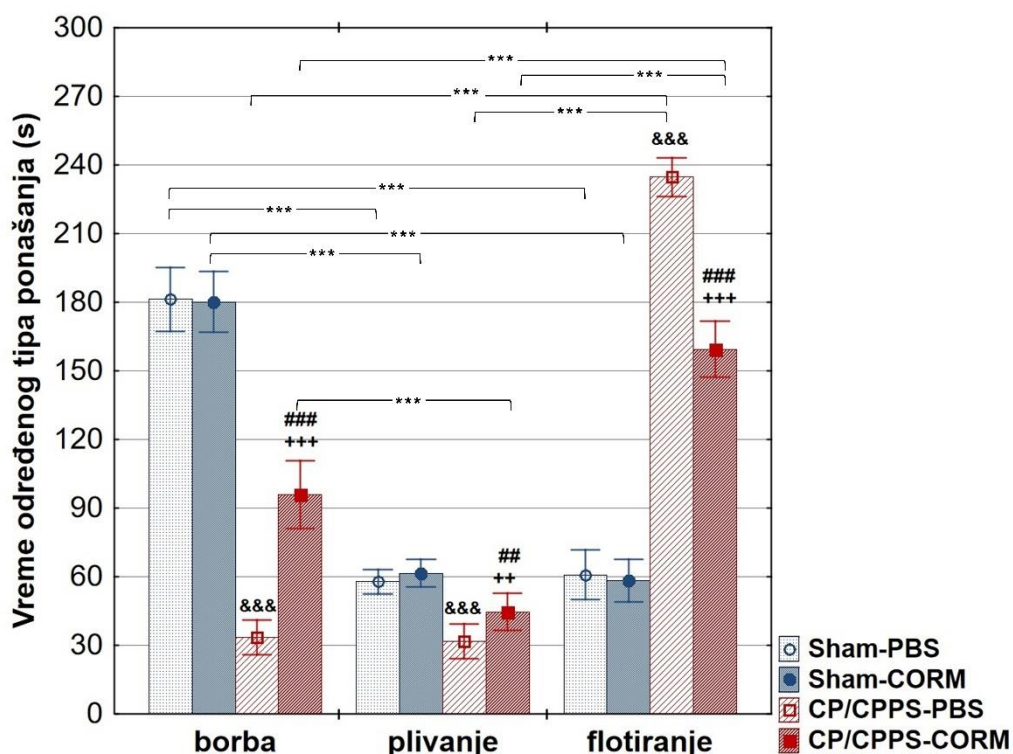
Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u indeksu tigmotaksije je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem (&&& $p<0,001$ vs. Sham-PBS; + $p<0,05$ vs. Sham-CORM; # $p<0,05$ vs. CP/CPPS-PBS). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom (** $p<0,01$, *** $p<0,001$, vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

4.9.3. Uticaj CORM-A1 na ponašanje povezano sa depresijom

Sham-PBS i Sham-CORM životinje bez prostatitisa su provele statistički značajno duže vreme u borbi u odnosu na vreme u plivanju ($p<0,001$, Slika 4.9.3.) i flotiranju ($p<0,001$, Slika 4.9.3.). Eksperimentalne CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM životinje su provele statistički značajno više vremena u flotiranju u odnosu na vreme u plivanju ($p<0,001$, Slika 4.9.3.) i borbi ($p<0,001$, Slika 4.9.3.). CP/CPPS-CORM životinje su provele statistički značajno kraće vreme u plivanju u odnosu na vreme u borbi ($p<0,001$, Slika 4.9.3.).

Međugrupno poređenje je pokazalo da je intraprostatična injekcija 3% λ -karagenina kod CP/CPPS-PBS životinja dovela do visoko statistički značajnog skraćenja vremena provedenog u borbi (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$, Slika 4.9.3) i plivanju (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$, Slika 4.9.3) i produženja vremena u flotiranju (CP/CPPS-PBS vs. Sham-PBS, $p < 0,001$, Slika 4.9.3.), u odnosu na kontrolne Sham-PBS životinje.

Međugrupno poređenje obrazaca ponašanja tokom FST je pokazalo da je tretman CORM-A1 kod životinja grupe CP/CPPS-CORM doveo do statistički značajnog produženja vremena u borbi ($p < 0,001$, Slika 4.9.3.) i plivanju ($p < 0,01$, Slika 4.9.3.) i skraćenja vremena u flotiranju ($p < 0,001$, Slika 4.9.3.), u odnosu na životinje sa prostatitisom koje su posoperativno tretirane rastvaračem (CP/CPPS-PBS).



Slika 4.9.3. Uticaj CORM-A1 na distribuciju i trajanje borbe, plivanja i flotiranja tokom testa forsiranog plivanja kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Unutargrupna razlika u distribuciji borbe, plivanja i flotiranja je procenjena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer post hoc testiranjem ($***p < 0,001$). Statistička značajnost razlika u distribuciji borbe, plivanja i flotiranja između grupa je utvrđena istim testom (&&& $p < 0,001$ vs. Sham-PBS; ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ vs. Sham-CORM; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. CPPS-PBS). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

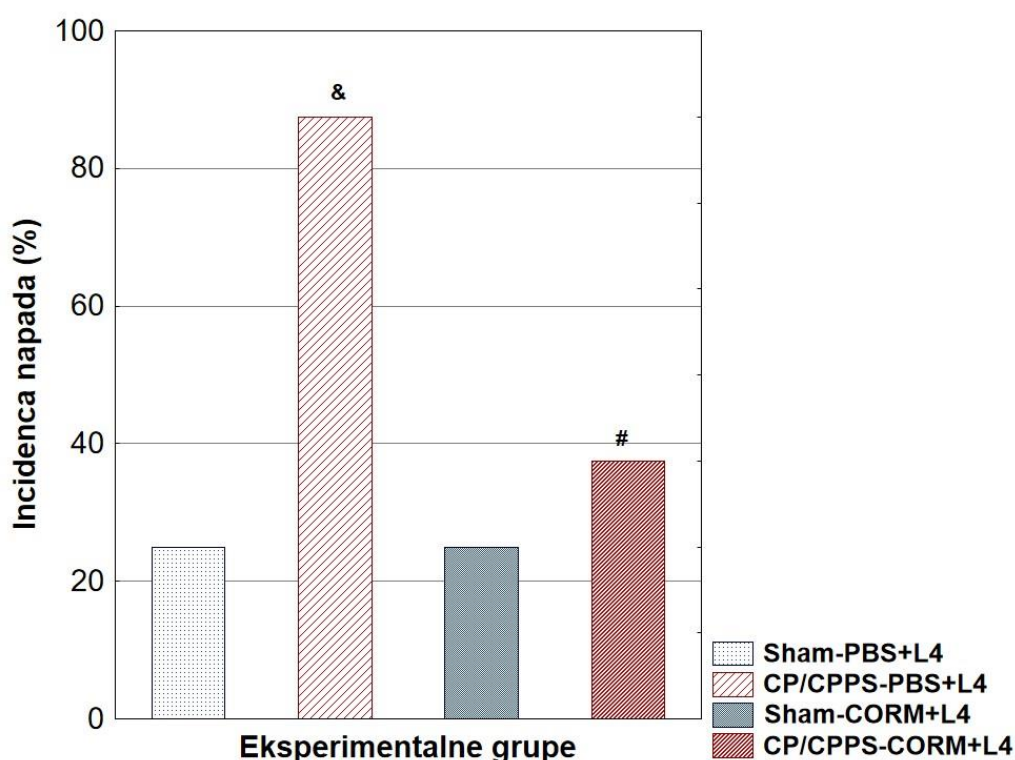
4.9.4. Uticaj CORM-A1 na bihejvioralne i EEG karakteristike konvulzivnog ponašanja izazvanog lindanom

U cilju procene ekscitabilnosti CNS, posebna kohorta životinja, koja nije bila uključena u ostale bihejvioralne analize, podvrgnuta je 7. postoperativnog dana subkonvulzivnoj dozi lindana, formirane su eksperimentalne grupe: Sham-PBS+L4 (n=8), Sham-CORM+L4 (n=8), CP/CPPS-PBS+L4 (n=8) i CP/CPPS-CORM+L4 (n=8) i ispitani su konvulzivno ponašanje i iktalna EEG aktivnost.

Uticaj modulacije nivoa CO na bihevioralne karakteristike konvulzivnog ponašanja

Incidenca napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana u Sham-PBS+L4 grupi životinja bez prostatitisa, postoperativno tretiranih PBS je bila manja i iznosila je 25%, što je statistički značajno niže u poređenju sa CP/CPSS-PBS+L4 grupom životinja sa prostatitisom, postoperativno tretiranih PBS sa incidencom napada 87,5% ($p < 0,05$, Slika 4.9.4.1.). Incidenca napada u Sham-CORM+L4 grupi životinja bez prostatitisa postoperativno tretiranih CORM-A1 je 25% i nije se statistički značajno razlikovala od CP/CPSS-CORM+L4 grupe životinja sa prostatitisom postoperativno tretiranih CORM-A1 sa incidencom napada 37,5 % ($p > 0,05$, Slika 4.9.4.1.).

Postoperativni tretman CORM-A1 kod životinja sa prostatitisom je statistički značajno snizio incidencu napada u poređenju sa životinjama sa prostatitisom tretiranih PBS (CP/CPSS-PBS+L4 vs. CP/CPSS-CORM+L4, $p < 0,05$, Slika 4.9.4.1.).

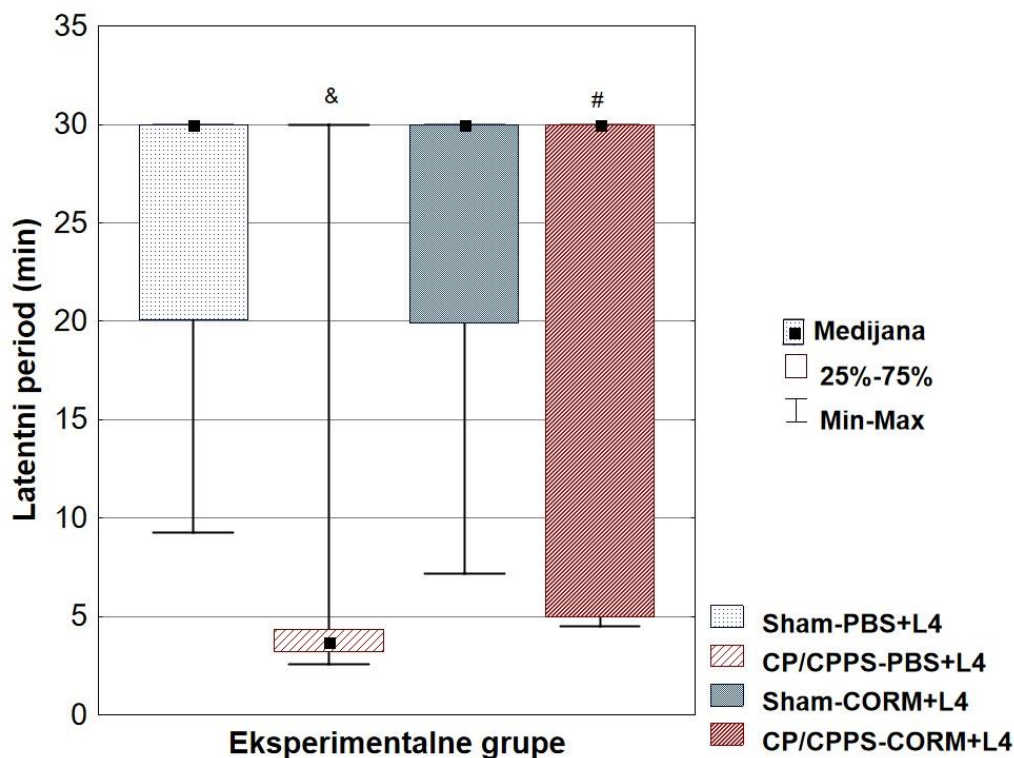


Slika 4.9.4.1. Uticaj CORM-A1 na incidencu konvulzivnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPSS

Sedmog dana nakon operacije, pacovima je i.p administriran lindan u subkonvulzivnoj dozi (L4; 4 mg/kg), u cilju ispitivanja ekscitabilnosti CNS i formirane su grupe: Sham-PBS+L4, Sham-CORM+L4, CP/CPSS-PBS+L4 i CP/CPSS-CORM+L4 ($n=8$ životinja, po grupi). Incidenca je izražena u procentima kao broj životinja koje su imale konvulzivni napad u odnosu na broj životinja koje nisu konvulzirale. Statistička značajnost razlike u incidenci napada je utvrđena je upotrebom Fišerovog testa tačne verovatnoće (& $p < 0,05$ vs. Sham-PBS+L4; # $p < 0,05$ vs. CP/CPSS-PBS+L4).

Analiza latentnog vremena do pojave prvog konvulzivnog napada je pokazala da je ono bilo statistički značajno kraće u grupi CP/CPSS-PBS+L4 u poređenju sa grupom Sham-PBS+L4 ($p < 0,05$, Slika 4.9.4.2.).

Pokazano je da je postoperativni tretman donorom CO kod životinja sa prostatitisom statistički značajno produžio medijanu latentnog vremena do prvog napada u poređenju sa životinjama sa prostatitisom koje su postoperativno tretirane rastvaračem (CP/CPSS-CORM+L4 vs. CP/CPSS-PBS+L4, $p < 0,05$, Slika 4.9.4.2.).



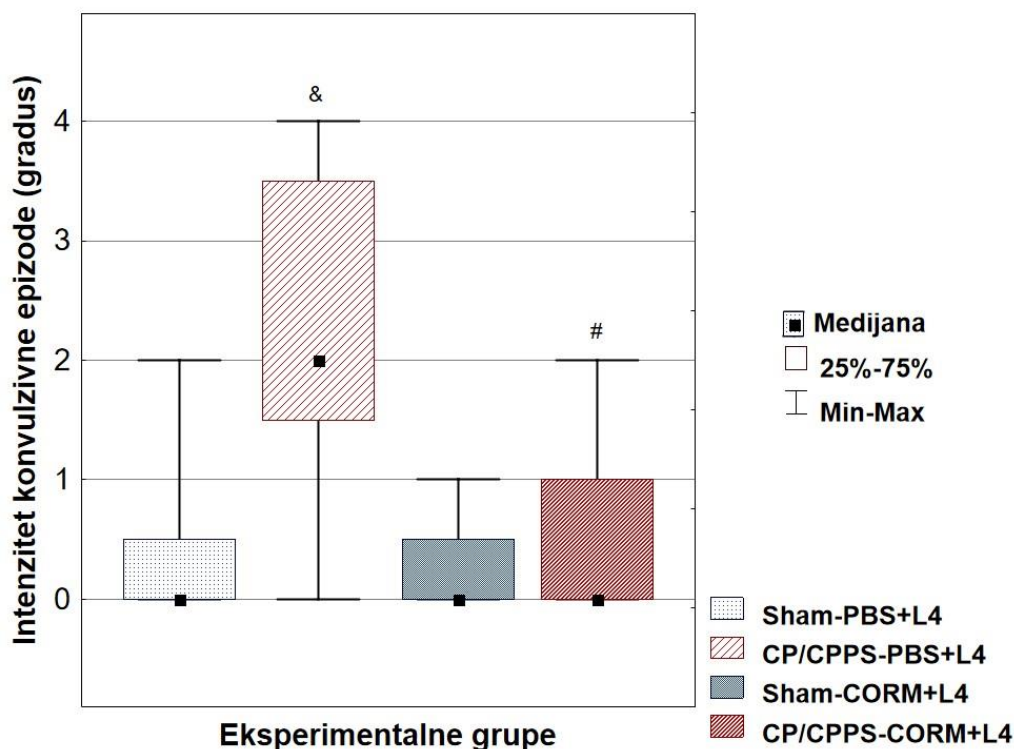
Slika 4.9.4.2. Uticaj CORM-A1 na latentni period konvulzivnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPSS

Latentni period je definisan kao vreme koje protekne od administracije lindana do pojave prvog uočljivog znaka konvulzije. Za životinje bez konvulzivnih napada je uzeta vrednost od 30 minuta. Statistička značajnost razlike u latentnom periodu među grupama je utvrđena upotrebom Kruskal-Wallis testa sa Mann-Whitney post hoc testom (& $p < 0,05$ vs. Sham-PBS+L4; # $p < 0,05$ vs. CP/CPSS-PBS+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.4.1.

Intenzitet napada izazvanih lindanom je bio statistički značajno veći kod životinja iz grupe CP/CPSS-PBS+L4 u poređenju sa životinjama iz grupe Sham-PBS+L4 ($p < 0,05$, Slika 4.9.4.3.) Sem toga, maksimalni gradus konvulzija u grupi CP/CPSS-PBS+L4 je iznosio 4, dok je maksimalni gradus konvulzija u Sham-PBS+L4 grupi bio 2.

Intenzitet napada izazvanih lindanom kod životinja iz grupe CP/CPSS-CORM+L4 nije se statistički značajno razlikovao u odnosu na grupu Sham-CORM+L4 (CP/CPSS-CORM+L4 vs. Sham-CORM+L4, $p > 0,05$, Slika 4.9.4.3.).

Postoperativni tretman CORM-A1 kod životinja iz grupe CP/CPSS-CORM+L4 je doveo do statistički značajnog smanjenja intenziteta napada u poređenju sa životinjama iz grupe CP/CPSS-PBS+L4 ($p < 0,05$, Slika 4.9.4.3.).



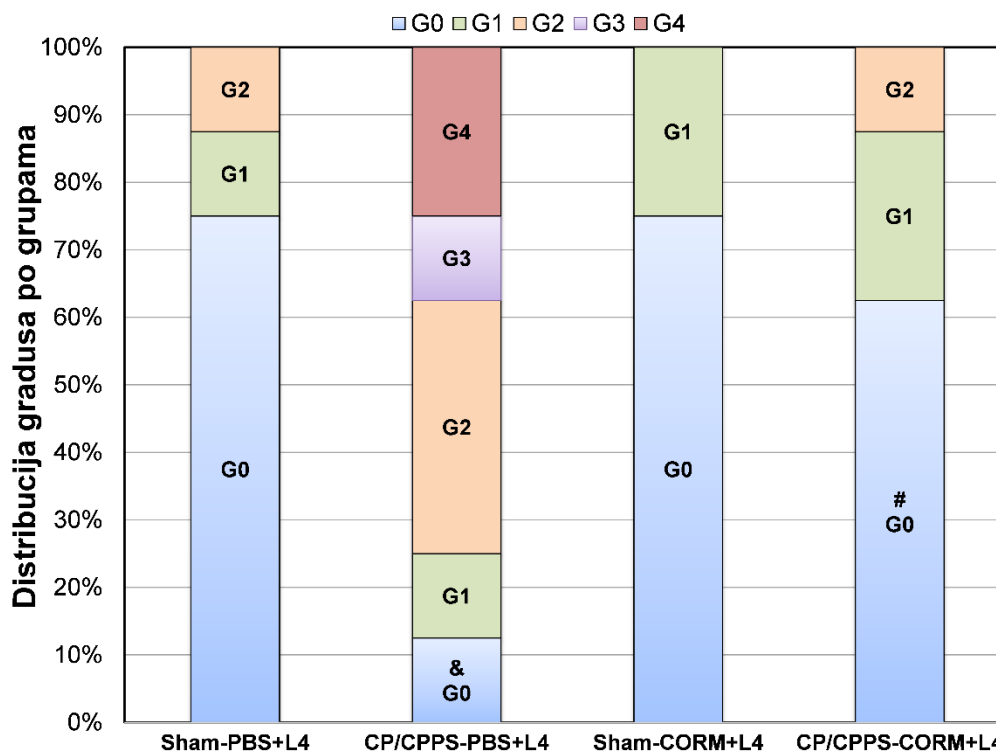
Slika 4.9.4.3. Uticaj CORM-A1 na Intenzitet konvulzivnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPPS

Intenzitet napada procenivan je na osnovu deskriptivne skale sa gradusima od 0 do 4: 0 - bez konvulzivnog odgovora; 1 - klamanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice, 2 - mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); 3 - progresija u generalizovane kloničke konvulzije praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; 4 - status epilepticus. Statistička značajnost razlika u intenzitetu napada između životinja iz različitih grupa je utvrđena upotrebom Kruskal-Wallis testa sa Mann-Whitney post hoc testom (& $p < 0,05$ vs. Sham-PBS+L4; # $p < 0,05$ vs. CP/CPPS-PBS+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.4.1.

Analiza distribucije gradusa napada unutar grupa je pokazala da je u grupi životinja Sham-PBS+L4 najveći procenat životinja (75%) imao napade gradusa 0, zatim su napadi gradusa 1 i 2 opservirani u istom procentu (12,5%), dok napadi gradusa 3 i 4 nisu opservirani. U grupi životinja CP/CPPS-PBS+L4 su napadi gradusa 0, 1 i 3 bili zastupljeni u istom procentu (12,5%), dok je gradus 4 pokazivao zastupljenost kod 25% životinja, a najveći procenat životinja (37,5%) je imao napade gradusa 2. Napadi gradusa 0 su opservirani kod 75% Sham-CORM+L4 životinja, gradusa 1 kod 25%, dok napadi gradusa 2-4 nisu opservirani. Kod CP/CPPS-CORM+L4 životinja koje su postoperativno tretirane CORM-A1, napadi gradusa 0 su bili najzastupljeniji (62,5%), dok su napadi gradusa 1 i 2 opservirani kod 25%, odnosno 12,5% životinja, a napadi gradusa 3 i 4 nisu zapaženi.

Međugrupno poređenje distribucije gradusa napada je pokazalo da je gradus 0 bio statistički značajno manje zastupljen kod životinja CP/CPPS-PBS+L4 u odnosu na korespondentne kontrole iz grupe Sham-PBS+L4 ($p < 0,05$, Slika 4.9.4.4). Takođe, ista opservacija važi i za graduse 2, 3 i 4 koji su bili zastupljeniji kod životinja CP/CPPS-PBS+L4, u odnosu na Sham-PBS+L4 životinje, ali ova razlika nije bila statistički značajna (CP/CPPS-PBS+L4 vs. Sham-PBS+L4, $p > 0,05$, Slika 4.9.4.4.).

Postoperativni tretman donorom CO kod životinja CP/CPPS-CORM+L4 je doveo do statistički značajnog povećanja zatupljenosti gradusa 0 u poređenju sa životinjama sa prostatitisom iz grupe CP/CPPS-PBS+L4 koje su postoperativno dobijale rastvarač PBS ($p < 0,05$, Slika 4.9.4.4.). Ista opservacija je zapažena po pitanju gradusa 2, ali ova razlika nije bila statistički značajna (CP/CPPS-CORM+L4 vs. CP/CPPS-PBS+L4, $p > 0,05$, Slika 4.9.4.4.).



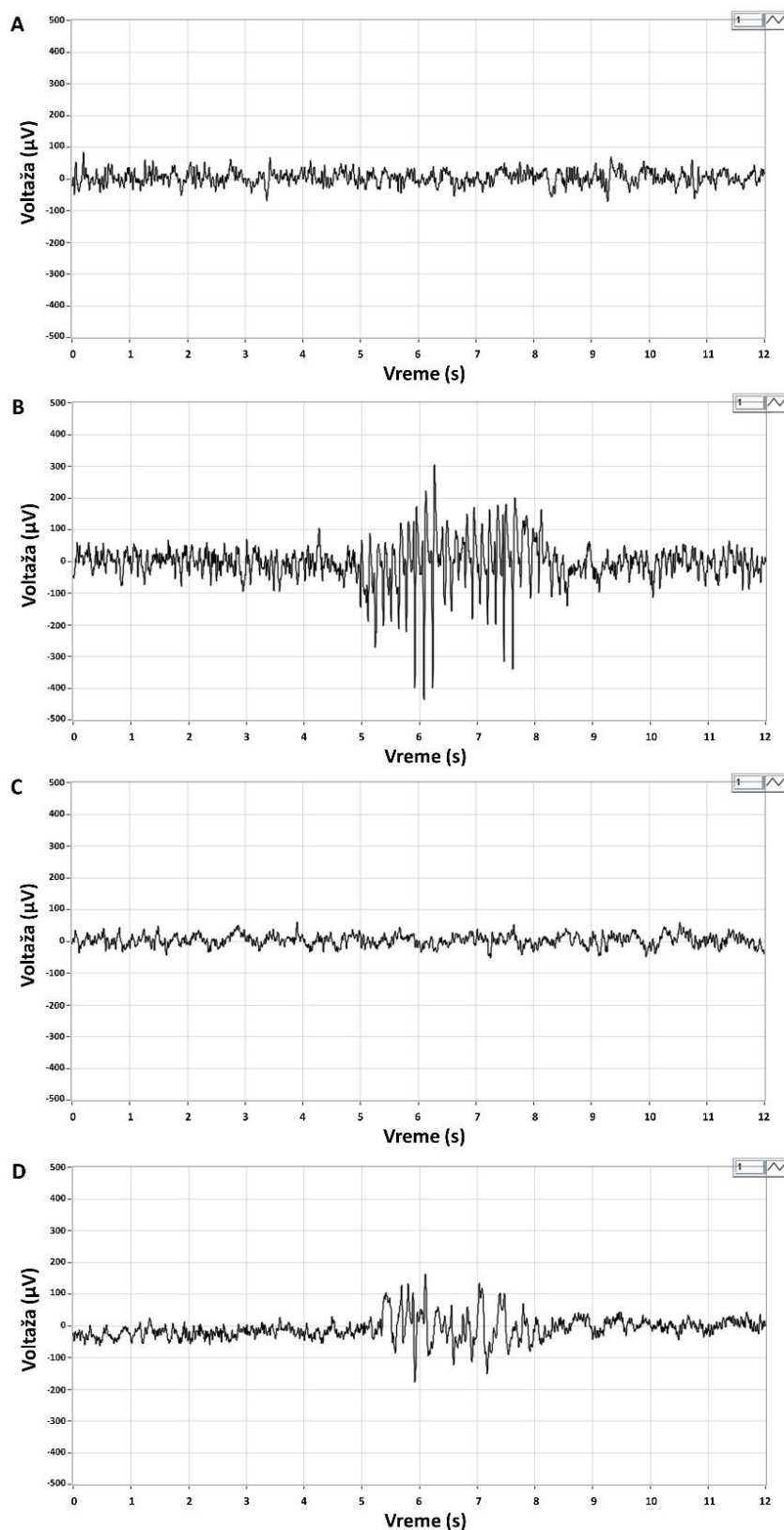
Slika 4.9.4.4. Uticaj CORM-A1 na distribuciju gradusa konvulzivnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPPS-PBS+L4

Zastupljenost određenog gradusa konvulzija u svakoj grupi životinja je izražena u procentima. Statistička značajnost međugrupne razlike u distribuciji različitih gradusa napada procenjena upotrebom Fišerovog testa tačne verovatnoće (& $p < 0,05$ vs. Sham-PBS+L4; # $p < 0,05$ vs. CP/CPPS-PBS+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.4.1.

Uticaj modulacije nivoa CO na elektroencefalografske (EEG) karakteristike iktalne aktivnosti izazvane lindanom kod životinja sa CP/CPPS

Kako bi se izvršila analiza EEG karakteristika konvulzivnih napada, životinjama su implantirane registrujuće EEG elektrode, a potom je učinjena akvizicija i analiza EEG signala u trajanju od 30 minuta nakon intraperitonealne aplikacije subkonvulzivne doze lindana.

Vizuelna analiza EEG zapisa je pokazala bazalnu EEG aktivnost bez znakova EEG iktalne aktivnosti kod kontrolnih životinja bez prostatitisa u grupama Sham-PBS+L4 i Sham-CORM+L4 (Slika 4.9.4.5.A.,C.). Kod CP/CPPS-PBS+L4 i CP/CPPS-CORM+L4 životinja je opservirana EEG iktalna aktivnost, te su prikazani reprezentativni iktalni periodi u vidu serije šiljaka visoke amplitude kod CP/CPPS-PBS+L4 životinja (Slika 4.9.4.5.B.) i nešto niže amplitude i frekvencije kod životinja iz grupe CP/CPPS-CORM+L4 (Slika 4.9.4.5.D.), koji su registrovani u tridesetominutnom EEG zapisu nakon aplikacije subkonvulzivne doze lindana (4mg/kg, i.p.).



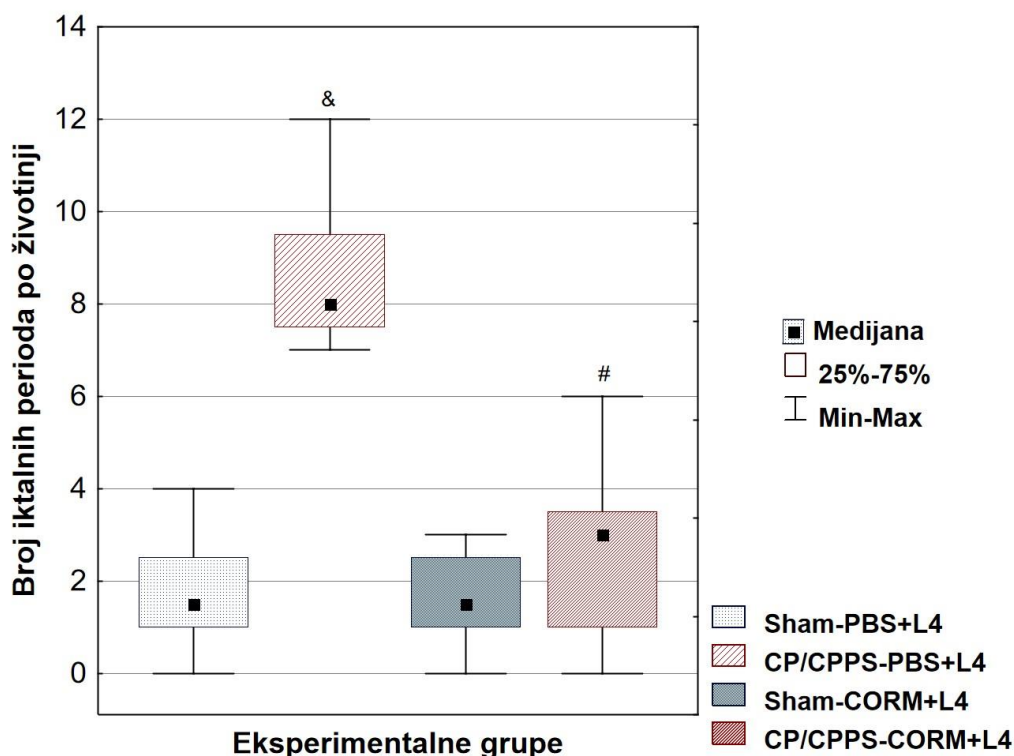
Slika 4.9.4.5. Reprezentativni EEG zapis moždane aktivnosti Sham-PBS+L4 (A) i Sham-CORM+L4 (C) životinja i EEG iktalni periodi kod CP/CPPS-PBS+L4 (B) i CP/CPPS-CORM+L4 (D) životinja

Pacovima je intraperitonealno aplikovana subkonvulzivna doza lindana (4 mg/kg, i.p.) sedmog postoperativnog dana i EEG aktivnost je registrovana tokom 30 min. Iktalni period karakteriše serija šiljaka visoke amplitude, preko 200-300 µV, sa dominantnom frekvencom od 7-8 Hz u alfa opsegu. Odvod: desni frontalni- levi parijetalni. Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.4.1.

Broj EEG iktalnih perioda po životinji je bio statistički značajno veći u grupi CP/CPSS-PBS+L4 u poređenju sa grupom Sham-PBS+L4 ($p < 0,05$, Slika 4.9.4.6.).

Detaljna analiza EEG iktalne aktivnosti je pokazala da postoje razlike između životinja postoperativno tretiranih CO donorom, CORM-A1, i onih koje su postoperativno tretirane rastvaračem PBS.

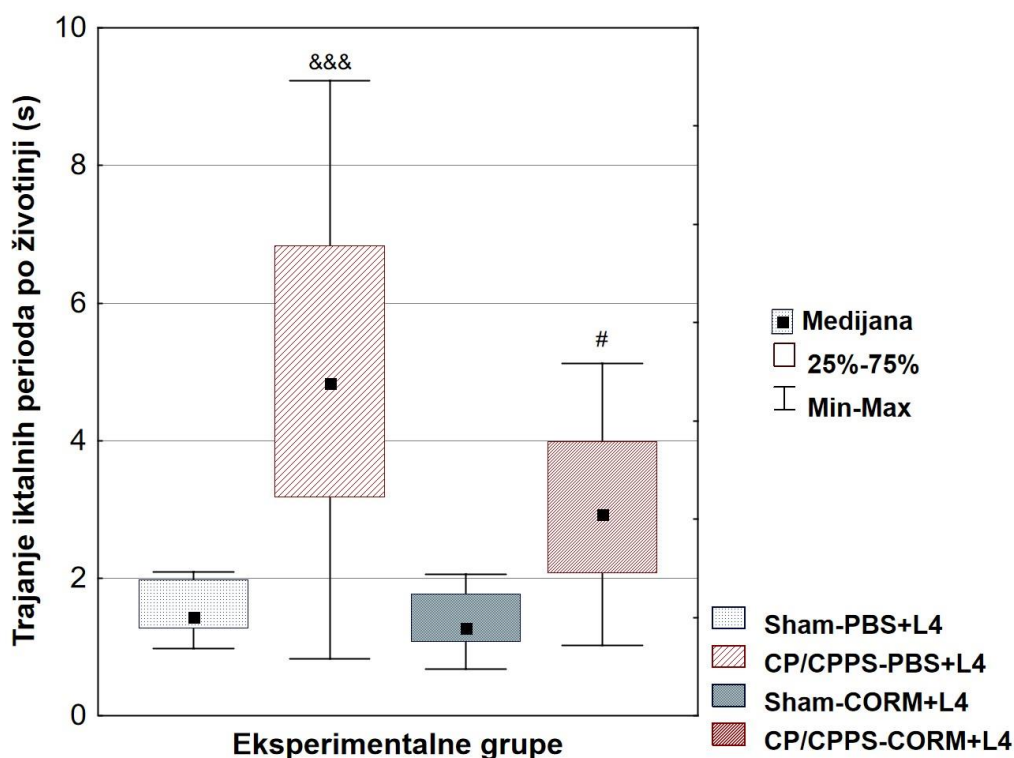
Naime, pokazano je da je postoperativni tretman životinja sa prostatitisom donorom CO (grupa CP/CPSS-CORM+L4), doveo do statistički značajnog smanjenja broja EEG iktalnih perioda u poređenju sa životinjama sa prostatitisom koje su postoperativno tretirane PBS (grupa CP/CPSS-PBS+L4, $p < 0,05$, Slika 4.9.4.6.).



Slika 4.9.4.6. Uticaj CORM-A1 na broj EEG iktalnih perioda po životinji izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPSS

Broj EEG iktalnih perioda po životinji je ustanovljen za sve 4 grupe životinja. Statistička značajnost razlika u broju EEG iktalnih perioda po životinji između životinja iz različitih grupa je utvrđena upotrebom Kruskal-Wallis testa sa Mann-Whitney post hoc testom (& $p < 0,05$ vs. Sham-PBS+L4; # $p < 0,05$ vs. CP/CPSS-PBS+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.4.1.

Slična opservacija je dobijena analizom trajanja EEG iktalnih perioda po životinji. Trajanje EEG iktalnih perioda po životinji je bilo statistički značajno veće u grupi CP/CPSS-PBS+L4 u poređenju sa grupom Sham-PBS+L4 ($p < 0,001$, Slika 4.9.4.7.). Sa druge strane, pokazano je da je postoperativni tretman donorom CO doveo do statistički značajnog kraćeg trajanja EEG iktalnih perioda (CP/CPSS-CORM+L4 vs. CP/CPSS-PBS+L4 $p < 0,05$, Slika 4.9.4.7.)



Slika 4.9.4.7. Uticaj CORM-A1 na trajanje EEG iktalnih perioda kod životinja sa CP/CPSS

Statistička značajnost razlika u trajanju EEG iktalnih perioda po životinji između životinja iz različitih grupa je utvrđena upotrebom Kruskal-Wallis testa sa Mann-Whitney U post hoc testom ($***p < 0,001$ vs. Sham-PBS+L4; $\#p < 0,05$ vs. CP/CPSS-PBS+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.4.1.

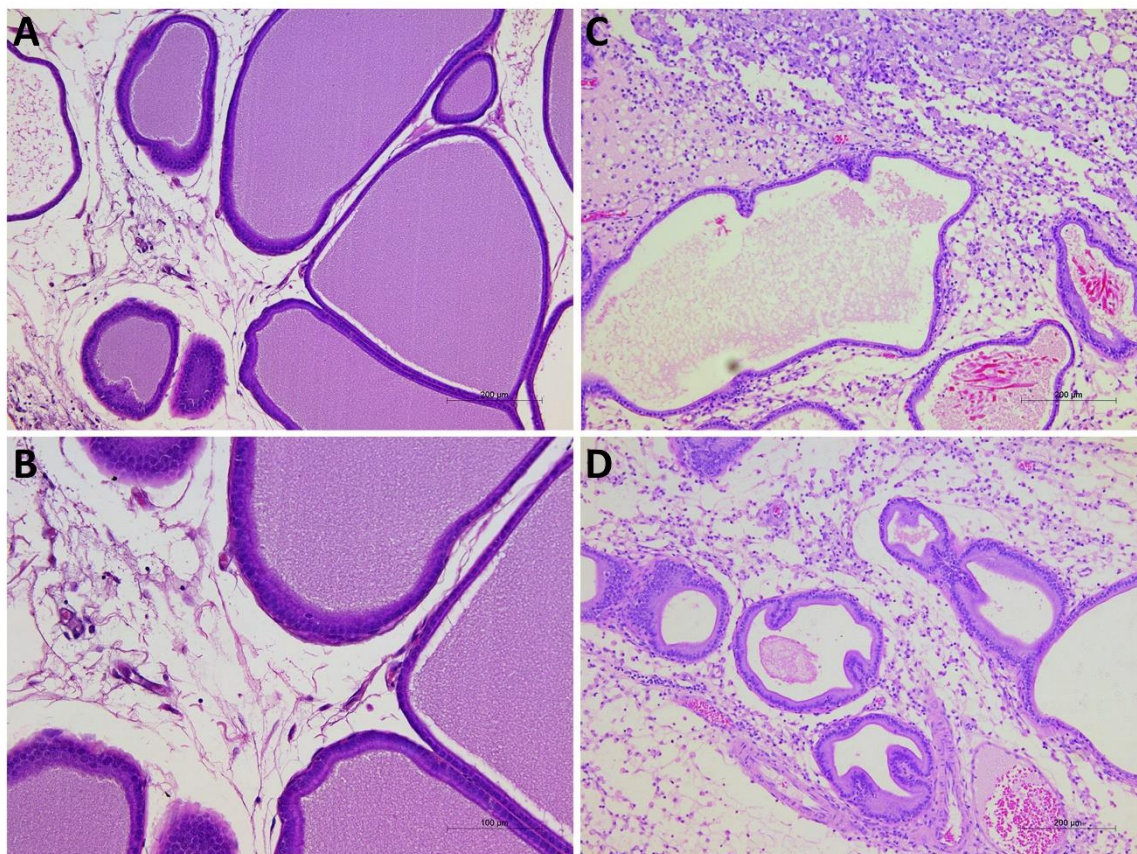
4.9.5. Uticaj CORM-A1 na histološke karakteristike prostate

Nakon završetka bihevioralnih testova, sedmog postoperativnog dana, svi pacovi iz grupa Sham-PBS, Sham-CORM, CP/CPSS-PBS i CP/CPSS-CORM su žrtvovani na standardni način, izolovane su prostate i standardnom procedurom obojene (H/E), pa su preparati posmatrani na svetlosnom mikroskopu.

Prostate pacova iz grupa Sham-PBS i Sham-CORM, koje su tretirane intraprostaticom injekcijom sterilnog 0,9% NaCl su pokazivale očuvanu i nenarušenu histološku građu bez prisustva inflamacije (Slika 4.9.5.A.,B.).

Suprotno tome, intraprostatica injekcija 3% λ -karagenina kod CP/CPSS-PBS pacova je dovela do inflamacije koja se manifestovala sledećim nalazom na histološkom preparatu: izražena intersticijalna proliferacija, zapaljenski mononuklearni infiltrat, hijalinizacija i nekroza, kao i kongestija krvnih sudova (Slika 4.9.5.C.).

Sedmodnevni postoperativni tretman CP/CPSS-CORM životinja donorem CO (CORM-A1) je smanjio obim patoloških promena u prostati jer je konstatovano da su intersticijalna proliferacija i zapaljenski infiltrat prisutni, ali je hijalinizacija slabije prisutna, dok se nekroza u intersticijumu nije uočavala (Slika 4.9.5.D.).



Slika 4.9.5. Reprezentativne fotomikrografije tkiva prostate životinja iz Sham-PBS (A), Sham-CORM (B), CP/CPPS-PBS (C) i CP/CPPS-CORM (D) grupa

U kontrolnim grupama životinja jasno se uočava normalno tkivo prostate, bez patoloških promena (A, B). Tkivo prostate u CP/CPPS-PBS grupi pokazuje izraženu intersticijalnu proliferaciju, zapaljenski infiltrat, hijalinizaciju i nekrozu i kongestiju krvnih sudova (C). CORM-A1 tretman smanjuje obim patoloških promena u grupi CP/CPPS-CORM jer su intersticijalna proliferacija i zapaljenski infiltrat prisutni, ali je hijalinizacija slabija, a nekroza u intersticijumu se ne uočava (D). Za detalje videti opis uz Sliku 4.9.1.

4.10. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na pacove sa CP/CPPS

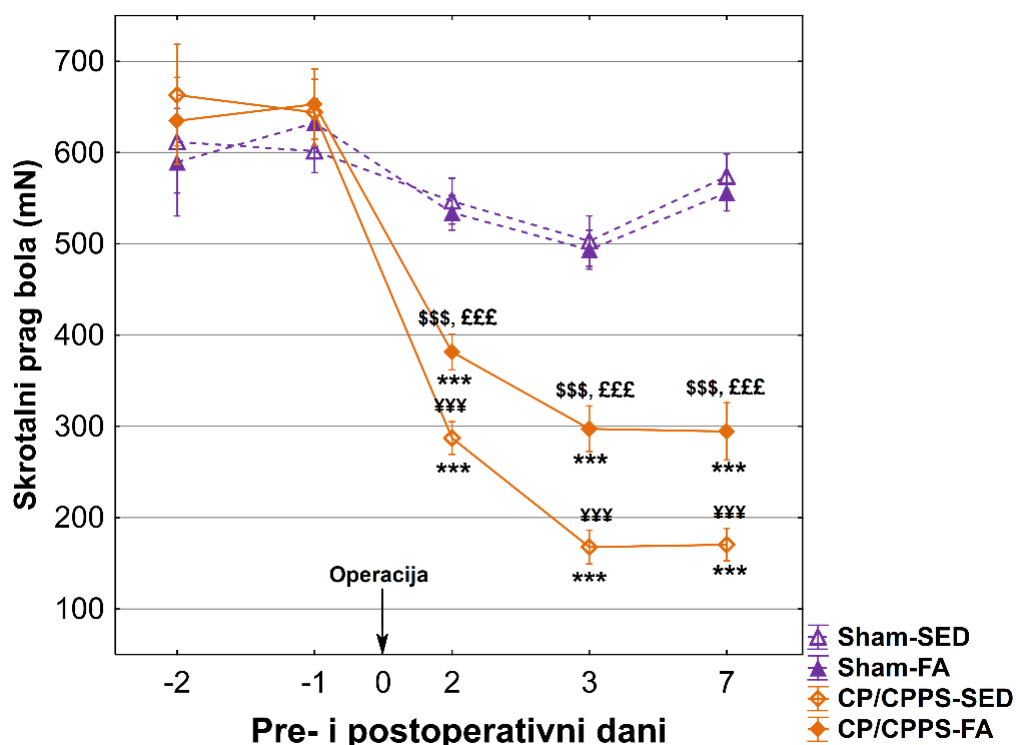
Efekat hronične aerobne fizičke aktivnosti na razvoj CP/CPPS je ispitan podvrgavanjem pacova preoperativnom tridesetodnevnom treningu na tredmilu. Nakon indukcije eksperimentalnog CP/CPPS, životinjama je meren skrotalni prag bola evF esteziometrom, u testovima L/D, EPM i OF je ispitivano ponašanje povezano sa anksioznošću, a upotrebom FST je ispitano ponašanje povezano sa depresijom. Histološko ispitivanje prostata koje su procesuirane H/E tehnikom je izvršeno nakon žrtvovanja životinja.

4.10.1. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na skrotalni prag bola na mehaničku draž

Svim životinjama iz grupa Sham-SED, Sham-FA, CP/CPPS-SED i CP/CPPS-FA izmeren je skrotalni prag bola na mehaničku draž u preoperativnom periodu (bazalni uslovi, 2 i 1 dan pre operacije), kao i u postoperativnom periodu (2., 3. i 7. dana nakon operacije).

Preoperativno nije postojala razlika u skrotalnom pragu bola između ispitivanih grupa (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p>0,05$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p>0,05$ Slika 4.10.1.). Kod Sham-SED i Sham-FA životinja, intraprostatična injekcija sterilnog 0,9% NaCl nije značajno promijenila postoperativni skrotalni prag bola, u poređenju sa bazalnim vrednostima ($p>0,05$, Slika 4.10.1.).

Intraprostatična injekcija 3% λ -karagenina je kod CP/CPPS-SED i CP/CPPS-FA životinja dovela do razvoja eksperimentalnog CP/CPPS i značajnog postoperativnog smanjenja skrotalnog praga bola na mehaničku draž (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p<0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p<0,001$; Slika 4.10.1.) u 2., 3. i 7. danu nakon operacije. Takođe, kod ovih životinja je opservirano značajno smanjenje praga bola na mehaničku draž u 2., 3. i 7. postoperativnom danu u poređenju sa preoperativnim vrednostima ($p<0,001$, Slika 4.10.1.). Hronična aerobna fizička aktivnost je kod životinja sa prostatitisom dovela do statistički značajnog povećanja skrotalnog praga bola u odnosu na preoperativno sedentarne životinje sa prostatitisom (CP/CPPS-FA vs. CP/CPPS-SED, $p<0,001$, Slika 4.10.1.).



Slika 4.10.1. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na skrotalni prag bola kod životinja sa CP/CPPS

Životinje su testirane evF esteziometrom 2 i 1 dan pre, kao i 2., 3. i 7. postoperativnog dana. U zavisnosti od preoperativnog tretmana u trajanju od 30 uzastopnih dana, životinje su podeljene u dve grupe: sedentarne (SED, 30 uzastopnih dana, 30 min/dn, brzina trake: 0 m/min) i fizički aktivne životinje (FA, 30 uzastopnih dana, 30 min/dn, brzina trake: 20 m/min). Nakon preoperativnog tretmana u tredmilu, zavisno od intraprostatične injekcije tokom operacije, formirane su četiri grupe životinja: Sham-SED (intraprostatična injekcija 0,9% NaCl i preoperativni sedentarni protokol na tredmilu); Sham-FA (intraprostatična injekcija 0,9% NaCl i preoperativni fizički aktivni protokol na tredmilu); CP/CPPS-SED (intraprostatična injekcija 3% λ -karagenina i preoperativni sedentarni protokol na tredmilu) i CP/CPPS-FA (intraprostatična injekcija 3% λ -karagenina i preoperativni fizički aktivni protokol na tredmilu). Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u skrotalnom pragu bola između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($¥¥¥p<0,001$ vs. Sham-SED; $£££p<0,001$ vs. Sham-FA; $$$$p<0,001$ vs. CP/CPPS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($***p<0,001$ vs. -1).

4.10.2. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ponašanje povezano sa anksioznošću

U cilju ispitivanja efekata hronične aerobne fizičke aktivnosti na ponašanje povezano sa anksioznošću, sve životinje iz grupa Sham-SED, Sham-FA, CP/CPPS-SED i CP/CPPS-FA su tokom 2., 3., i 7. postoperativnog dana podvrgnute standardnoj bateriji tri etološka testa: test svetlo/tama, test uzdignutog krstastog lavirinta i test otvorenog polja.

Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ponašanje pacova u testu svetlo/tama

Analiza ponašanja u ovom testu je pokazala da su životinje iz grupe Sham-FA koje su bile fizički aktivne provele statistički značajno više vremena u svetlom kompartmanu u 2. ($p < 0,05$), 3. ($p < 0,05$), i 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$), u poređenju sa životinjama iz grupe Sham-SED koje su bile sedentarne (Slika 4.10.2.1.).

Takođe, poređenjem životinja sa prostatitisom sa životinjama bez prostatitisa, zaključeno je da su životinje sa prostatitisom boravile statistički značajno kraće u svetlom kompartmanu u 3. (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$), u poređenju sa korespondentnim kontrolnim životinjama iz grupa Sham-SED i Sham-FA (Slika 4.10.2.1.).

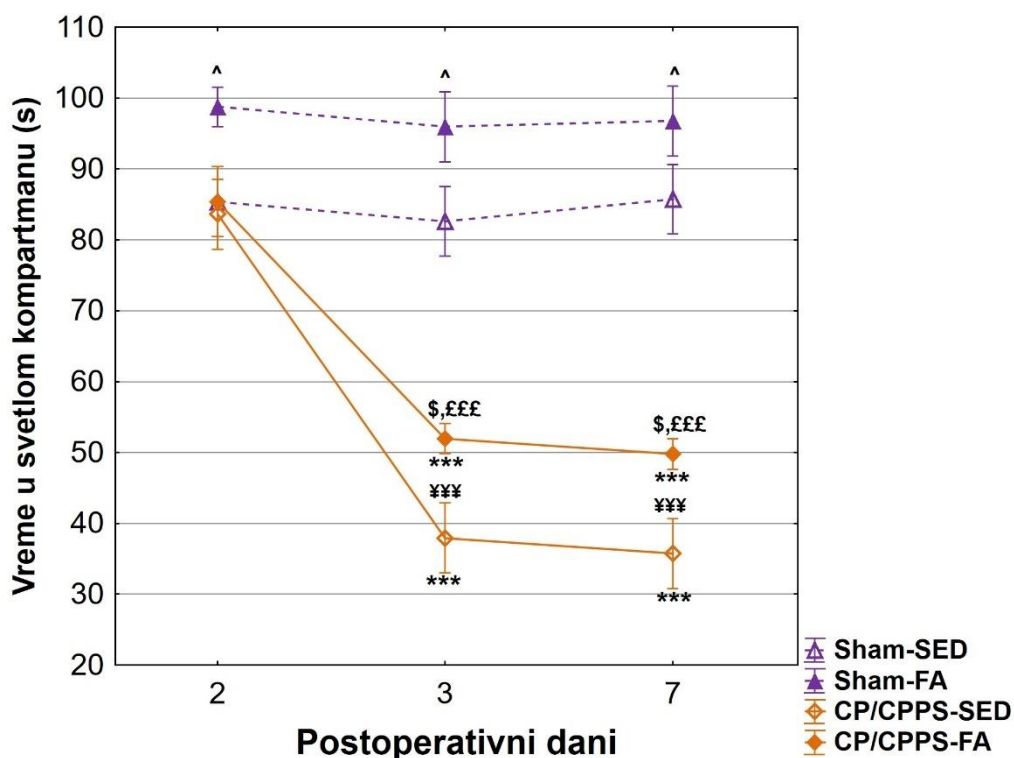
Ova razlika između pomenutih grupa nije opservirana u 2. postoperativnom danu (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p > 0,05$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p > 0,05$, Slika 4.10.2.1.).

Treba istaći da je pokazano da je hronična aerobna fizička aktivnost, u odnosu na preoperativni sedentarni tretman, kod pacova sa prostatitisom dovela do statistički značajnog povećanja vremena provedenog u svetlom kompartmanu u 3. ($p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$), dok razlika u 2. postoperativnom danu nije bila statistički značajna (CP/CPPS-FA vs. CP/CPPS-SED, $p > 0,05$, Slika 4.10.2.1.).

Unutargrupno poređenje parametara ovog testa je pokazalo da su CP/CPPS-SED životinje provele statistički značajno manje vremena u svetlom kompartmanu u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.1.).

Slična opservacija važi i za CP/CPPS-FA životinje koje su provele statistički značajno manje vremena u svetlom kompartmanu u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.1.).

Unutargrupna razlika navedenog parametara testa kod životinja iz grupa Sham-SED i Sham-FA nije pokazivala statističku značajnost ($p > 0,05$; Slika 4.10.2.1.).



Slika 4.10.2.1. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na vreme provedeno u svetlom kompartmanu u testu svetlo/tama kod životinja sa CP/CPSS

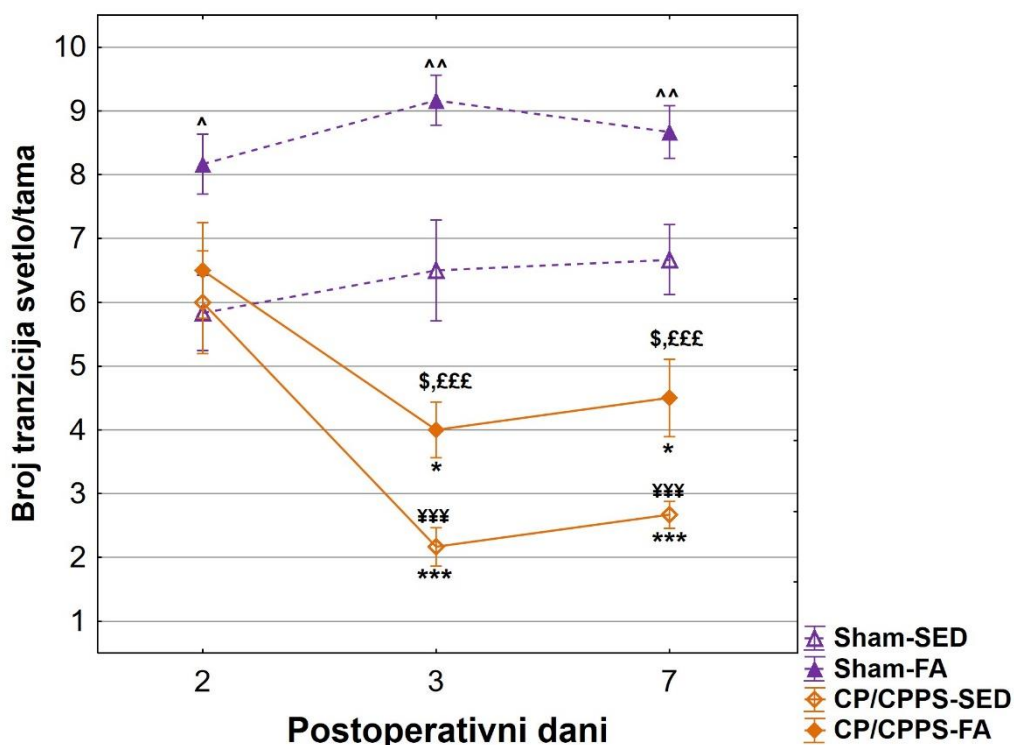
Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u vremenu provedenom u svetlom kompartmanu između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testom ($^{\wedge}p < 0,05$, vs. Sham-SED; $¥¥¥p < 0,001$ vs. Sham-SED; $£££p < 0,001$ vs. Sham-FA; $\$p < 0,05$ vs. CP/CPSS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($***p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

Broj tranzicija u ovom testu je bio statistički značajno veći kod fizički aktivnih Sham-FA životinja u 2. ($p < 0,05$), 3. ($p < 0,01$), i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$), u odnosu na sedentarne Sham-SED životinje (Slika 4.10.2.2.).

Takođe, statistički značajna razlika u ovom parametru, poređenjem preoperativno sedentarnih životinja sa prostatitisom iz grupa CP/CPSS-SED i preoperativno fizički aktivnih CP/CPSS-FA životinja sa korespondentnim Sham-SED i Sham-FA kontrolama, opservirana je u 3. (CP/CPSS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPSS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPSS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPSS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$). Razlika u 2. postoperativnom danu nije bila statistički značajna (CP/CPSS-SED vs. Sham-SED, $p > 0,05$; CP/CPSS-FA vs. Sham-FA, $p > 0,05$, Slika 4.10.2.2.).

Treba istaći da je analiza broja tranzicija iz svetlog u tamni kompartman pokazala da postoji statistički značajna razlika između sedentarnih i fizički aktivnih životinja sa prostatitisom u 3. (CP/CPSS-FA vs. CP/CPSS-SED, $p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPSS-FA vs. CP/CPSS-SED, $p < 0,05$), dok razlika nije postojala 2. postoperativnog dana (CP/CPSS-FA vs. CP/CPSS-SED, $p > 0,05$, Slika 4.10.2.2.).

Unutargrupno poređenje parametara ovog testa je pokazalo da su CP/CPPS-SED životinje napravile statistički značajno manji broj tranzicija iz svetlog u tamni kompartman u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.2.). Slična opservacija važi i za CP/CPPS-FA životinje koje napravile statistički značajno manji broj tranzicija iz svetlog u tamni kompartman u 3. ($p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.2.). Unutargrupna razlika broja tranzicija kod Sham-SED i Sham-FA životinja nije pokazivala statističku značajnost ($p > 0,05$; Slika 4.10.2.2.).



Slika 4.10.2.2. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na broj tranzicija iz svetlog u tamni kompartman u testu svetlo/tama kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u broju tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($^{\wedge}p < 0,05$, $^{\wedge\wedge}p < 0,01$ vs. Sham-SED; $^{\text{¥¥¥}}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $^{\text{£££}}p < 0,001$ vs. Sham-FA; $^{\text{\$}}p < 0,05$ vs. CP/CPPS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($^*p < 0,05$, $^{\text{***}}p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

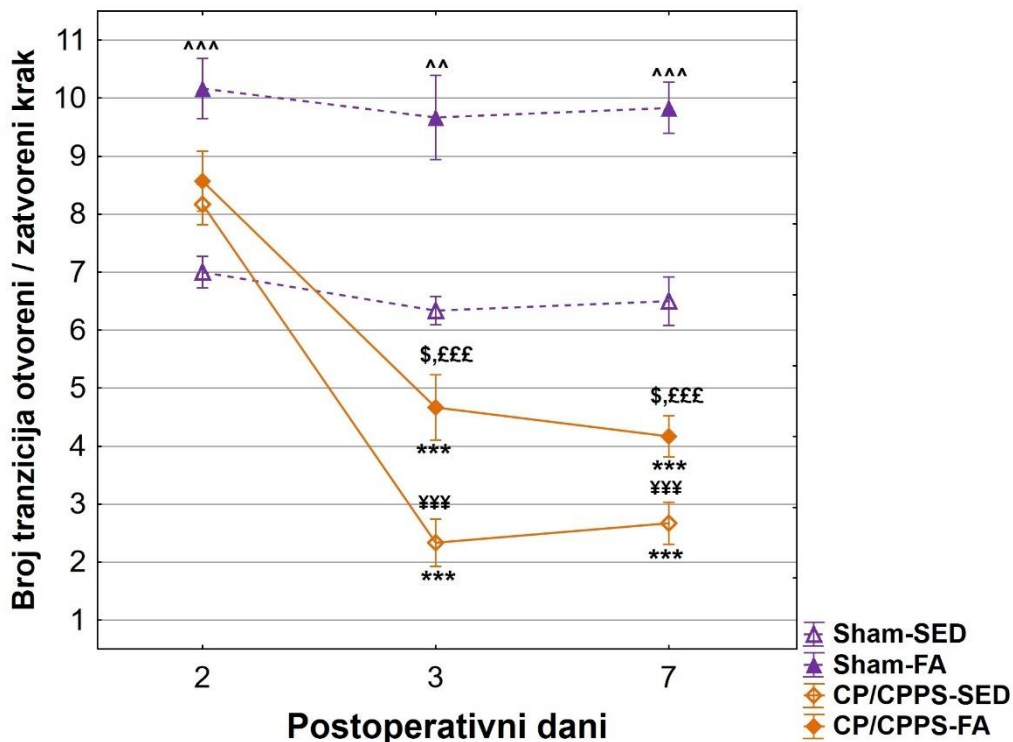
Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ponašanje pacova u testu uzdignutog krstastog lavirinta

Sham-FA životinje koje su bile preoperativno fizički aktivne su napravile statistički značajno veći broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta u 2. ($p < 0,001$), 3. ($p < 0,01$), i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u poređenju sa Sham-SED životinjama (Slika 4.10.2.3.).

Životinje iz grupa CP/CPPS-SED i CP/CPPS-FA koje su razvile prostatitis su napravile statistički značajno manji broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta u 3. (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$), u poređenju sa životinjama iz grupa Sham-SED i Sham-FA koje nisu razvile prostatitis (Slika 4.10.2.3.).

Međusobnim poređenjem životinja sa prostatitisom iz grupa CP/CPSS-SED i CP/CPSS-FA pokazan je uticaj preoperativnog tretmana hroničnom aerobnom fizičkom aktivnošću, u odnosu na sedentarni protokol. Hronična aerobna fizička aktivnost u periodu od 30 preoperativnih dana je kod pacova sa prostatitisom (grupa CP/CPSS-FA) dovela do statistički značajnog povećanja broja tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta u 3. ($p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$), dok razlika nije bila statistički značajna u 2. postoperativnom danu (CP/CPSS-FA vs. CP/CPSS-SED, $p > 0,05$; Slika 4.10.2.3.).

Distribucija parametara ovog testa unutar grupa je pokazala da su CP/CPSS-SED životinje napravile statistički značajno manji broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.3.). Slična opservacija važila je i za CP/CPSS-FA životinje, čiji je broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta bio statistički značajno manji u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.3.). Unutargrupna razlika ovog parametara testa nije bila statistički značajna kod životinja iz grupa Sham-SED i Sham-FA ($p > 0,05$; Slika 4.10.2.3.).

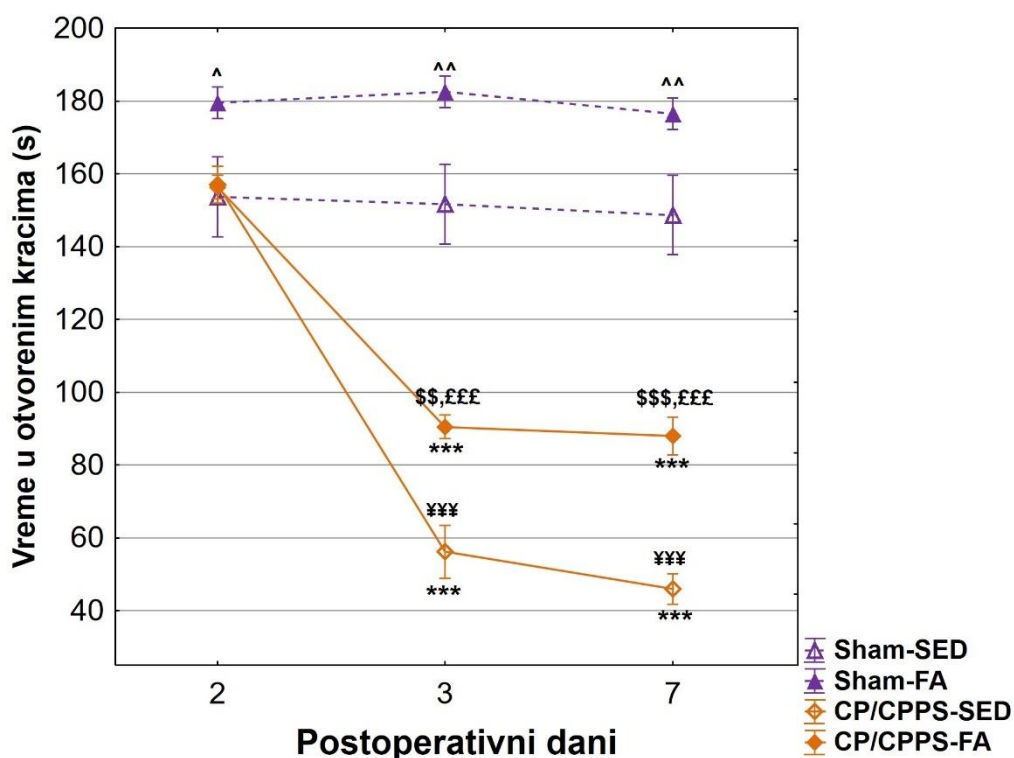


Slika 4.10.2.3. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova u testu uzdignutog krstastog lavirinta kod životinja sa CP/CPSS

Statistička značajnost razlike u broju tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta među grupama je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($^{\wedge\wedge}p < 0,01$, $^{\wedge\wedge\wedge}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $^{\text{¥¥¥}}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $^{\text{£££}}p < 0,001$ vs. Sham-FA; $^{\text{\$}}p < 0,05$ vs. CP/CPSS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($^{***}p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

Statistička razlika između grupa životinja CP/CPPS-SED i CP/CPPS-FA koje su razvile prostatitis i korespondentnih Sham-SED i Sham-FA kontrolnih životinja bez prostatitisa je zapažena i u pogledu vremena koje su životinje provodile u otvorenim kracima lavirinta u 3. (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$), i 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$, Slika 4.10.2.4.).

U 2. postoperativnom danu nije postojala statistički značajna međugrupna razlika prilikom poređenja pomenutih grupa (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p > 0,05$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p > 0,05$, Slika 4.10.2.4.). Vreme provedeno u otvorenim kracima lavirinta (Slika 4.10.2.4.) je pokazivalo statistički značajnu međugrupnu razliku prilikom poređenja CP/CPPS-SED i CP/CPPS-FA životinja u 3. ($p < 0,01$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), dok ona nije postojala u 2. postoperativnom danu (CP/CPPS-FA vs. CP/CPPS-SED, $p > 0,05$, Slika 4.10.2.4.). Distribucija vremena provedenog u otvorenim kracima lavirinta unutar grupa je pokazala da je ono kod CP/CPPS-SED životinja bilo statistički značajno manje u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.4.). Životinje iz grupe CP/CPPS-FA su pokazivale statistički značajno kraće vreme provedeno u otvorenim kracima lavirinta u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u odnosu na 2. postoperativni dan. Statistički značajna unutargrupna razlika ovog parametara testa nije opservirana kod životinja iz grupa Sham-SED i Sham-FA ($p > 0,05$; Slika 4.10.2.4.).



Slika 4.10.2.4. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na vreme provedeno u otvorenim kracima uzdignutog krstastog lavirinta kod životinja sa CP/CPPS

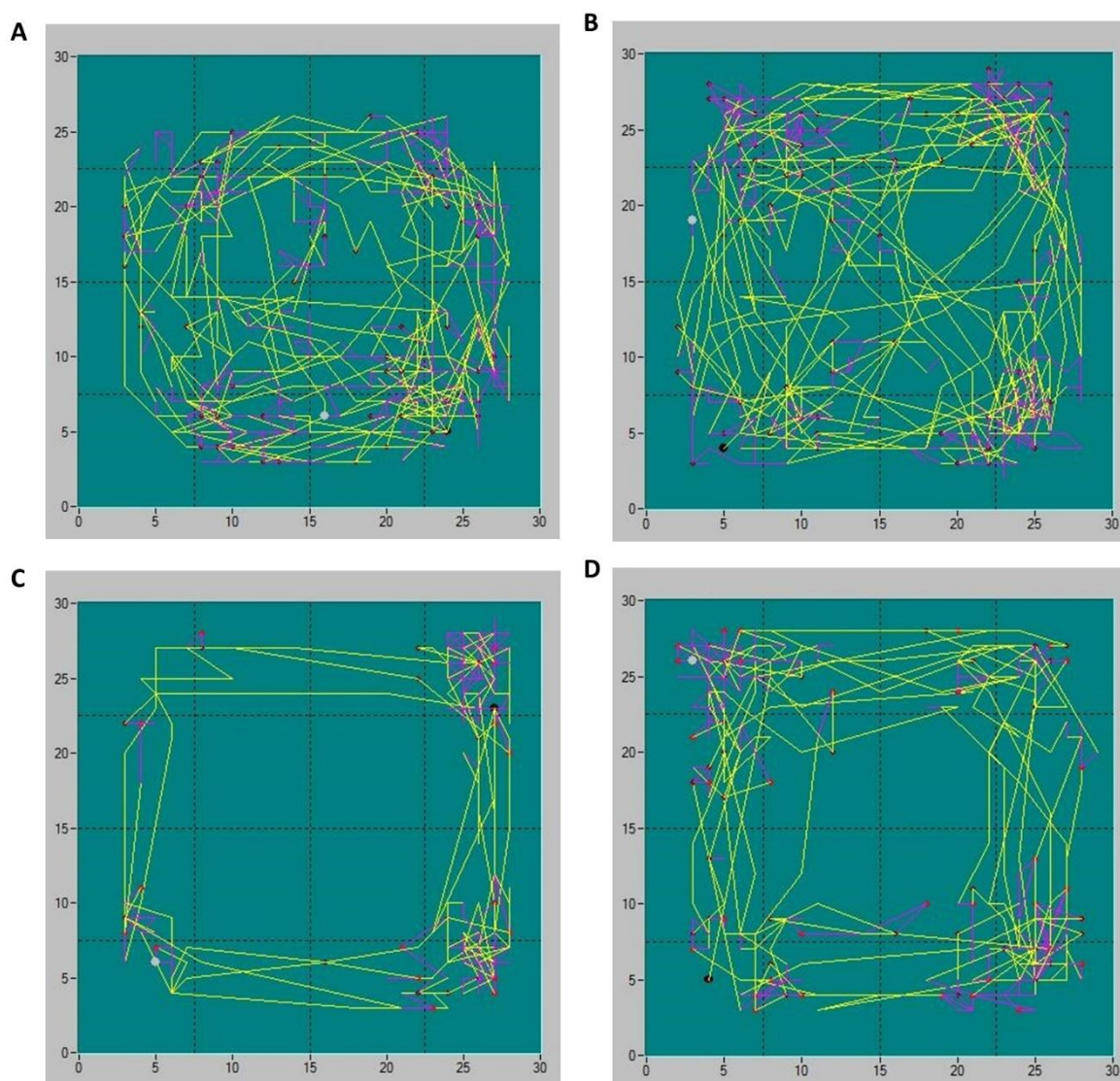
Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u vremenu provedenom u otvorenim kracima lavirinta između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($^{\wedge}p < 0,01$, $^{\wedge\wedge}p < 0,01$ vs. Sham-SED; $^{\text{¥¥¥}}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $^{\text{£££}}p < 0,001$ vs. Sham-FA; $^{\text{\$ \$}}p < 0,01$, $^{\text{\$ \$ \$}}p < 0,001$ vs. CP/CPPS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($^{***}p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ponašanje pacova u testu otvorenog polja

Da bi se ispitala spontana lokomotorna aktivnost i utvrdilo postojanje ponašanja povezanog sa anksioznošću, sve životinje iz grupa Sham-SED, Sham-FA, CP/CPSS-SED i CP/CPSS-FA su pojedinačno testirane u testu otvorenog polja u 2., 3. i 7. postoperativnom danu.

Reprezentativni snimci trajektorije kretanja životinja su prikazani na Slici 4.10.2.5.A-D. Vizuelna inspekcija registrovane lokomotorne aktivnosti je pokazala različite obrasce ponašanja kontrolnih i eksperimentalnih životinja u testu otvorenog polja.

Analiza parametara horizontalne lokomotorne aktivnosti je pokazala uticaj hroničnog aerobnog treninga, kako na životinje bez prostatitisa, tako i na životinje sa prostatitisom.

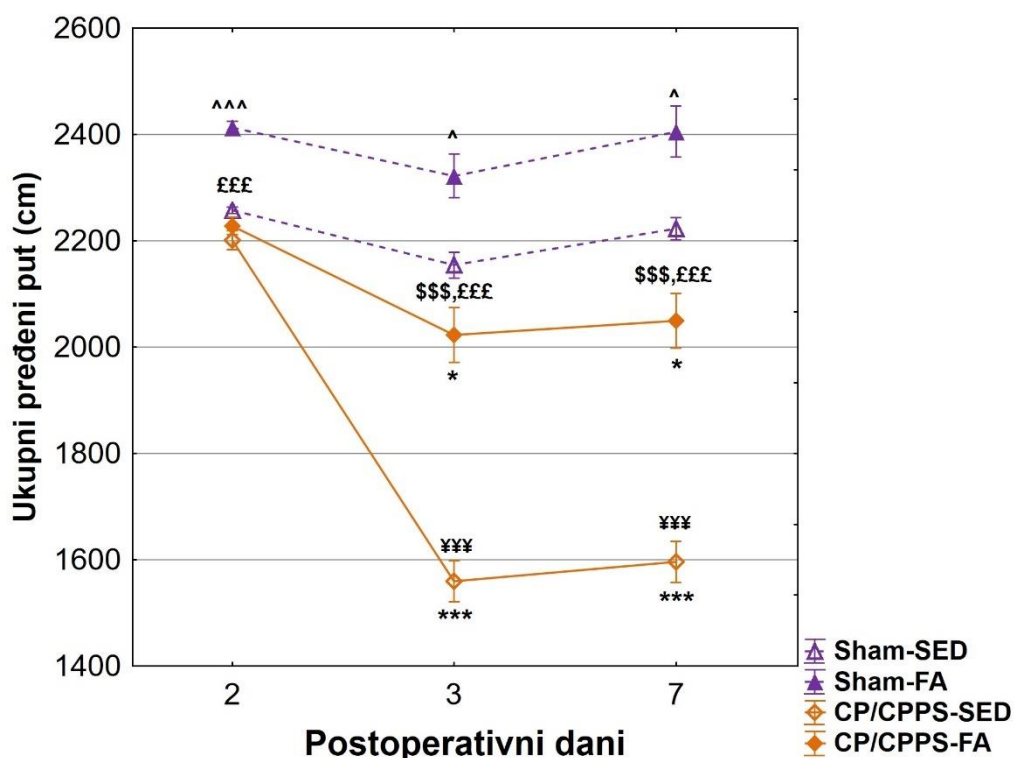


Slika 4.10.2.5. Reprezentativni obrazac horizontalne i vertikalne lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja kod Sham-SED (A), Sham-FA (B), CP/CPSS-SED (C) i CP/CPSS-FA (D) životinja

Testiranje u otvorenom polju je trajalo 15 minuta za svaku životinju ponaosob. Automatsko registrovanje spontane lokomotorne aktivnosti je izvršeno pomoću sistema infracrvenih senzora, a potom je analizirano upotrebom pratećeg programskog paketa (Conducta 1.0).

Sham-FA životinje su prešle statistički značajno veći ukupni put u 2. ($p < 0,001$), 3. ($p < 0,05$), i 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$), u poređenju sa Sham-SED životinjama (Slika 4.10.2.6.). Životinje iz grupe CP/CPPS-FA su imale statistički značajno veći ukupni pređeni put u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u odnosu na životinje grupe CP/CPPS-SED koje su u preoperativnom periodu bile sedentarne (Slika 4.10.2.6.).

CP/CPPS-FA životinje su imale statistički značajno kraći ukupni pređeni put u 3. ($p < 0,05$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.6.). Slična opservacija važi i za CP/CPPS-SED životinje koje su imale statistički značajno manji ukupni pređeni put u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.6.). Unutargrupna razlika ovog parametara testa nije opservirana kod životinja iz grupa Sham-SED i Sham-FA ($p > 0,05$, Slika 4.10.2.6.).



Slika 4.10.2.6. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ukupni pređeni put u testu otvorenog polja kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u ukupnom pređenom putu između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ([^] $p < 0,05$, ^{^^^} $p < 0,001$ vs. Sham-SED; ^{¥¥¥} $p < 0,001$ vs. Sham-SED; ^{£££} $p < 0,001$ vs. Sham-FA; ^{\$\$\$} $p < 0,001$ vs. CP/CPPS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom (^{*} $p < 0,05$, ^{***} $p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

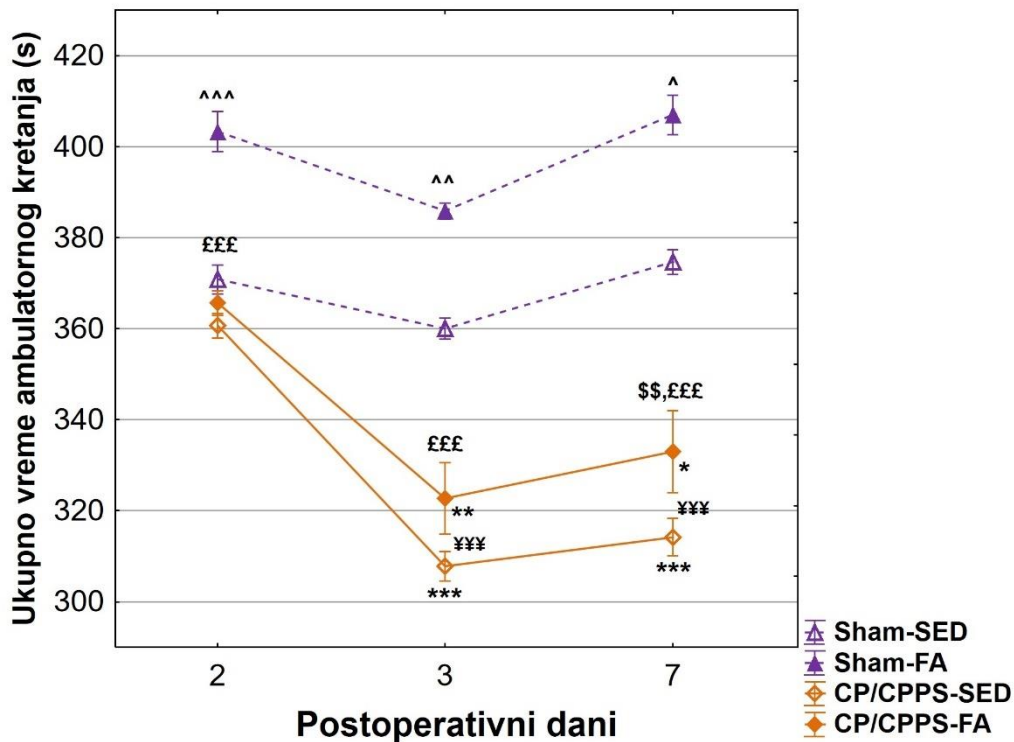
Preoperativno fizički aktivne Sham-FA životinje su imale statistički značajno veće ukupno vreme ambulatornog kretanja u 2. ($p < 0,001$), 3. ($p < 0,01$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$), u poređenju sa preoperativno sedentarnim Sham-SED životinjama (Slika 4.10.2.7.).

U pogledu ukupnog vremena ambulatornog kretanja CPPS-FA životinje su imale statistički značajno manju vrednost ovog parametra u 2. ($p < 0,001$), 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u poređenju sa korespondentnim Sham-FA životinjama. (Slika 4.10.2.7.).

Poređenjem sedentarnih životinja sa prostatitisom i kontrolnih sedentarnih životinja, zapaženo je da su CP/CPSS-SED imale statistički značajno manje ukupno vreme ambulatornog kretanja u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), dok razlika u 2. postoperativnom danu nije bila statistički značajna (CP/CPSS-SED vs. Sham-SED, $p > 0,05$, Slika 4.10.2.7.).

Eksperimentalne CP/CPSS-FA životinje su, u odnosu na CP/CPSS-SED životinje imale i statistički značajno veće ukupno vreme ambulatornog kretanja u 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$), dok ova razlika nije opažena u 2. ($p > 0,05$) i 3. postoperativnom danu ($p > 0,05$, Slika 4.10.2.7.).

Unutargrupna distribucija je pokazala da su CP/CPSS-FA životinje imale statistički značajno manje ukupno vreme ambulatornog kretanja u 3. ($p < 0,01$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom. Slično, CP/CPSS-SED životinje su pokazale statistički značajno manje ukupno vreme ambulatornog kretanja u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$) u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.7.). Unutargrupna razlika ovog parametara testa nije opservirana u grupama Sham-SED i Sham-FA ($p > 0,05$, Slika 4.10.2.7.).



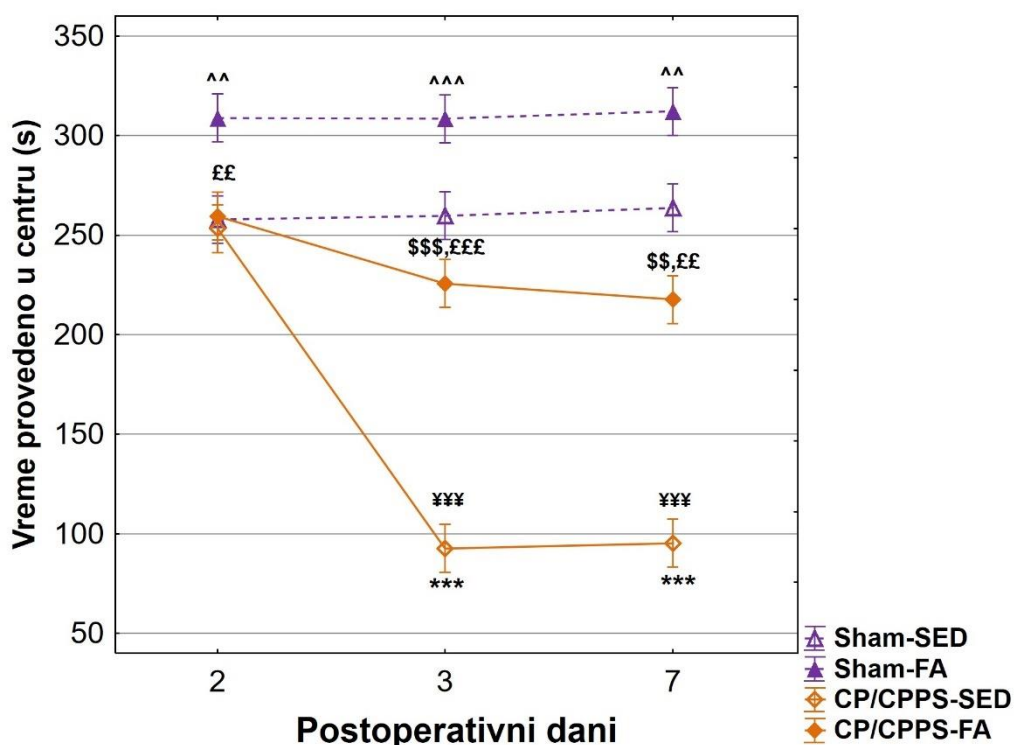
Slika 4.10.2.7. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ukupno vreme ambulatornog kretanja u testu otvorenog polja kod kontrolnih kod životinja sa CP/CPSS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u ukupnom vremenu ambulatornog kretanja između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($^{\wedge}p < 0,05$, $^{\wedge\wedge}p < 0,01$, $^{\wedge\wedge\wedge}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $¥¥¥p < 0,001$ vs. Sham-SED; $£££p < 0,001$ vs. Sham-FA; $$$p < 0,01$ vs. CP/CPSS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

Sham-FA životinje su provele statistički značajno više vremena u centru otvorenog polja u 2. ($p < 0,01$), 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$), u poređenju sa Sham-SED životinjama (Slika 4.10.2.8.). CP/CPSS-FA životinje su provele statistički značajno manje vremena u centru otvorenog polja u 2. ($p < 0,01$), 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu

($p < 0,01$), u poređenju sa Sham-FA životinjama (Slika 4.10.2.8.). Isti trend postojao je i među kontrolnim i eksperimentalnim sedentarnim životinjama u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,001$). Preoperativni trening je kod CP/CPPS-FA doveo do statistički značajnog povećanja ovog parametra u 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$), u odnosu na CP/CPPS-SED životinje, dok razlika u 2. postoperativnom danu nije bila statistički značajna ($p > 0,05$; Slika 4.10.2.8.).

Unutargrupna distribucija ovog parametra kod CP/CPPS-SED životinja je pokazala statistički značajno manje vrednosti u 3. ($p < 0,001$) i 7. ($p < 0,001$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom. Unutargrupna razlika nije opservirana kod CP/CPPS-FA, Sham-SED i Sham-FA životinja ($p > 0,05$, Slika 4.10.2.8.).



Slika 4.10.2.8. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na vreme provedeno u centru otvorenog polja kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u vremenu provedenom u centru otvorenog polja između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($^{\wedge\wedge}p < 0,01$, $^{\wedge\wedge\wedge}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $^{\text{¥¥¥}}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $^{\text{££}}p < 0,01$, $^{\text{£££}}p < 0,001$ vs. Sham-FA; $^{\text{\$}}p < 0,01$, $^{\text{\$\$\$}}p < 0,001$ vs. CP/CPPS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($^{\text{***}}p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

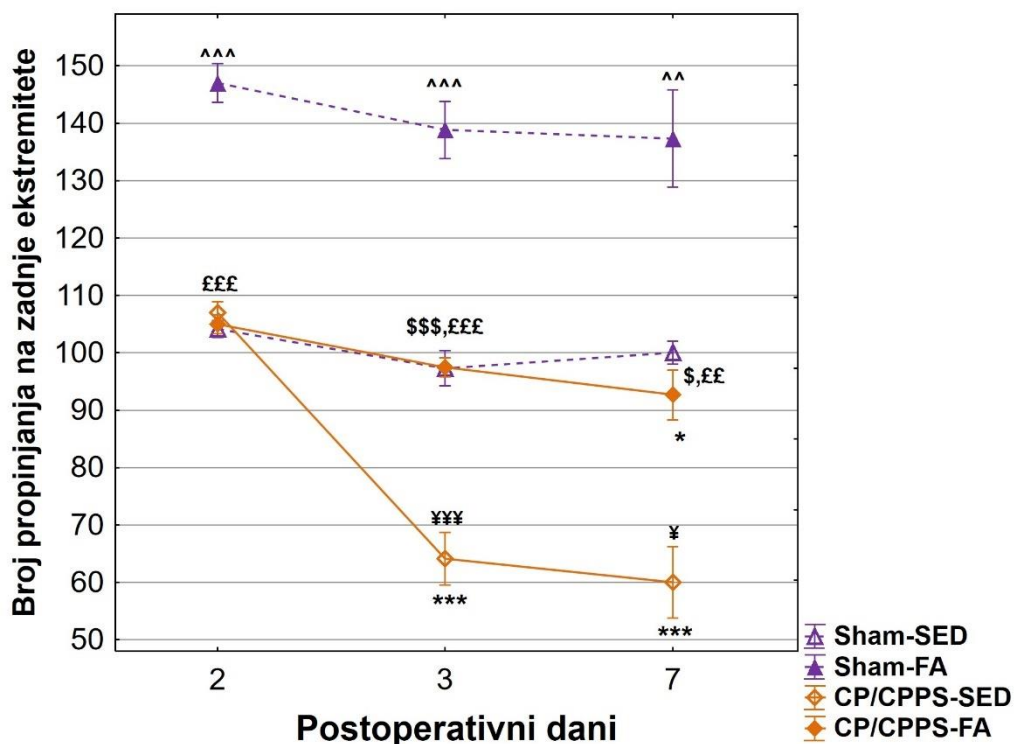
Uticaj hroničnog aerobnog treninga se ogleda kroz broj propinjanja na zadnje ekstremitete, kao parametar vertikalne lokomotorne aktivnosti, koji je bio statistički značajno veći kod fizički aktivnih Sham-FA životinja, u odnosu na sedentarne Sham-SED životinje. Razlika je postojala u 2. ($p < 0,001$), 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$; Slika 4.10.2.9.).

Eksperimentalne CP/CPPS-FA životinje su, u odnosu na kontrolne Sham-FA životinje, napravile statistički značajno manji broj propinjanja na zadnje ekstremitete u 2. ($p < 0,001$), 3. ($p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p < 0,01$, Slika 4.10.2.9)

Sedentarne životinje sa prostatitisom su napravile statistički značajno manji broj propinjanja na zadnje ekstremitete u 3. ($p<0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p<0,05$), u poređenju sa kontrolnim sedentarnim životinjama (Sham-SED vs. CP/CPSS-SED; Slika 4.10.2.9)

Posmatranjem distribucije i poređenjem ovog parametara kod fizički aktivnih i sedentarnih životinja sa prostatitisom, pokazan je uticaj hroničnog aerobnog preoperativnog treninga na razvoj ponašanja povezanog sa anksioznošću. CP/CPSS-FA životinje su, u odnosu na CP/CPSS-SED životinja, imale statistički značajnog veći broj propinjanja na zadnje ekstremitete u 3. ($p<0,001$) i 7. postoperativnom danu ($p<0,05$, Slika 4.10.2.9)

Unutargrupno poređenje je pokazalo da CP/CPSS-SED životinje imale statistički značajno manji broj propinjanja na zadnje ekstremitete u 3. ($p<0,001$) i 7. ($p<0,001$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.9). Razlika u ovom parametru kod CP/CPSS-FA životinja je postojala samo poređenjem 7. ($p<0,05$) sa 2. postoperativnim danom. Unutargrupna razlika kod životinja iz grupa Sham-SED i Sham-FA nije bila statistički značajna ($p>0,05$, Slika 4.10.2.9).



Slika 4.10.2.9. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na broj propinjanja na zadnje ekstremitete u testu otvorenog polja kod životinja sa CP/CPSS

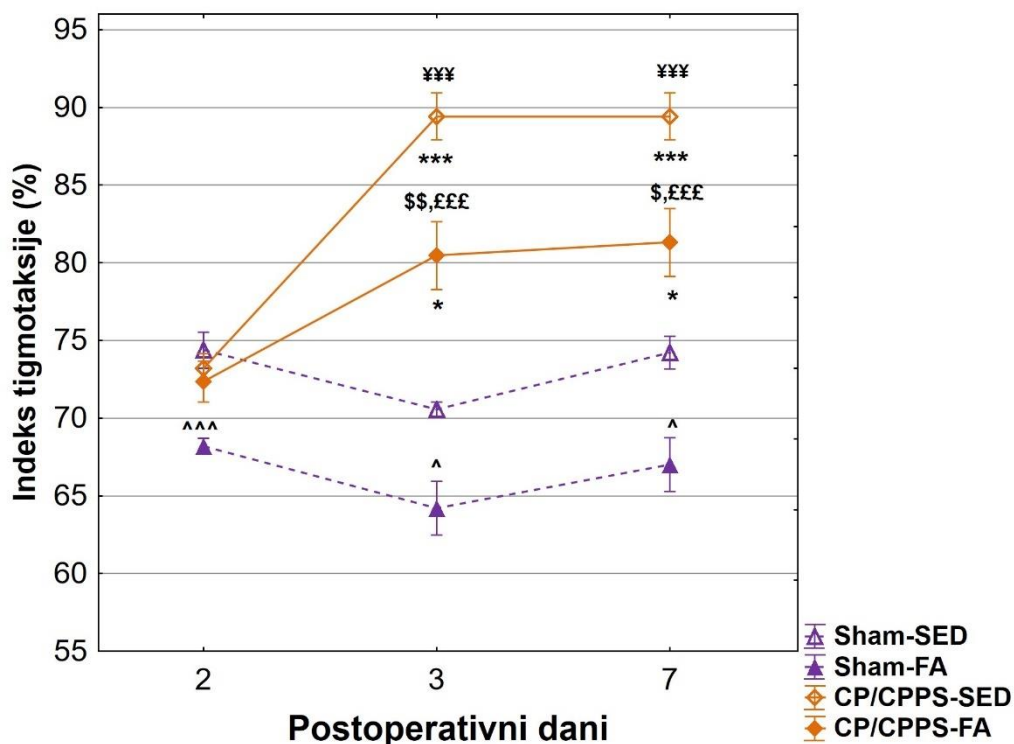
Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost međugrupne razlike u broju propinjanja na zadnje ekstremitete je utvrđena jednosmernim ANOVA testom sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($^{\wedge\wedge}p<0,01$, $^{\wedge\wedge\wedge}p<0,001$ vs. Sham-SED; $¥p<0,05$, $¥¥¥p<0,001$ vs. Sham-SED; $£p<0,01$, $££p<0,001$ vs. Sham-FA; $\$p<0,05$, $\$\$\$p<0,001$ vs. CP/CPSS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($*p<0,05$, $***p<0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

Fizički aktivne Sham-FA životinje su pokazivale statistički značajno niži indeks tigmotaksije u 2. ($p<0,001$), 3. ($p<0,05$) i 7. postoperativnom danu ($p<0,05$), u poređenju sa sedentarnim Sham-SED životinjama (Slika 4.10.2.10).

Životinje sa prostatitisom su imale statistički značajno veći indeks tigmataksije u 3. (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$) i 7. postoperativnom danu (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$), u poređenju sa kontrolama (Slika 4.10.2.10.). Indeks tigmataksije se među pomenutim grupama u 2. postoperativnom danu nije statistički značajno razlikovao (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p > 0,05$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p > 0,05$; Slika 4.10.2.10.).

Međusobno poređenje fizički aktivnih i sedentarnih životinja sa prostatitisom je pokazalo da je indeks tigmataksije kod CP/CPPS-FA životinja, u odnosu na CP/CPPS-SED životinje, bio statistički značajno manji u 3. ($p < 0,01$) i u 7. postoperativnom danu ($p < 0,05$). Ova razlika u 2. postoperativnom danu nije bila statistički značajna ($p > 0,05$; Slika 4.10.2.10.).

Unutargrupna distribucija ovog parametara kod CP/CPPS-SED životinja je pokazala da su imale statistički značajno veći indeks tigmataksije u 3. ($p < 0,001$) i 7. ($p < 0,001$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.10). Slično je bilo kod CP/CPPS-FA životinja u 3. ($p < 0,05$) i 7. ($p < 0,05$), u poređenju sa 2. postoperativnim danom (Slika 4.10.2.10). Nije bilo statistički značajne unutargrupne razlike ovog parametara kod Sham-SED i Sham-FA životinja ($p > 0,05$, Slika 4.10.2.10).



Slika 4.10.2.10. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na indeks tigmataksije u testu otvorenog polja kod životinja sa CP/CPPS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost razlike u indeksu tigmataksije između grupa je utvrđena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer LSD post hoc testiranjem ($^{\wedge}p < 0,05$, $^{\wedge\wedge\wedge}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $^{\forall\forall\forall}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $^{\text{£££}}p < 0,001$ vs. Sham-FA; $^{\text{\$}}p < 0,05$, $^{\text{\$\$}}p < 0,01$ vs. CP/CPPS-SED). Statistička značajnost razlika unutar svake od grupa je procenjena istim testom ($^*p < 0,05$, $^{***}p < 0,001$ vs. 2). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

4.10.3. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ponašanje povezano sa depresijom

U cilju utvrđivanja efekata hronične aerobne fizičke aktivnosti na ponašanje povezano sa depresijom, sve Sham-SED i Sham-FA životinje, kao i sve CP/CPPS-SED i CP/CPPS-FA životinje su 7. postoperativnog dana podvrgnute testu forsiranog plivanja.

Analiza zastupljenosti navedena tri tipa ponašanja tokom ovog testa je pokazala da su fizički aktivne Sham-FA životinje, u odnosu na sedentarne Sham-SED životinje, provele statistički značajno više vremena u borbi ($p < 0,001$), dok su istovremeno provele statistički značajno manje vremena u plivanju ($p < 0,001$) i flotiranju ($p < 0,01$, Slika 4.10.3.).

Intraprostatična injekcija 3% λ -karagenina je kod sedentarnih (CP/CPPS-SED) i fizički aktivnih (CP/CPPS-FA) životinja sa prostatitisom dovela do visoko statistički značajnog skraćenja vremena provedenog u borbi (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$) i plivanju (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$) i produženja vremena u flotiranju (CP/CPPS-SED vs. Sham-SED, $p < 0,001$; CP/CPPS-FA vs. Sham-FA, $p < 0,001$; Slika 4.10.3.), u odnosu na korespondentne kontrolne Sham-SED i Sham-FA životinje.

Poređenje obrazaca ponašanja tokom ovog testa je takođe pokazalo da je preoperativni tretman fizičkom aktivnošću kod pacova sa prostatitisom doveo do statistički značajnog produženja vremena u borbi ($p < 0,001$) i plivanju ($p < 0,01$) i skraćenja vremena u flotiranju (CP/CPPS-SED vs. CP/CPPS-FA, $p < 0,001$, Slika 4.10.3.) u odnosu na životinje sa prostatitisom koje su u preoperativnom periodu bile sedentarne.

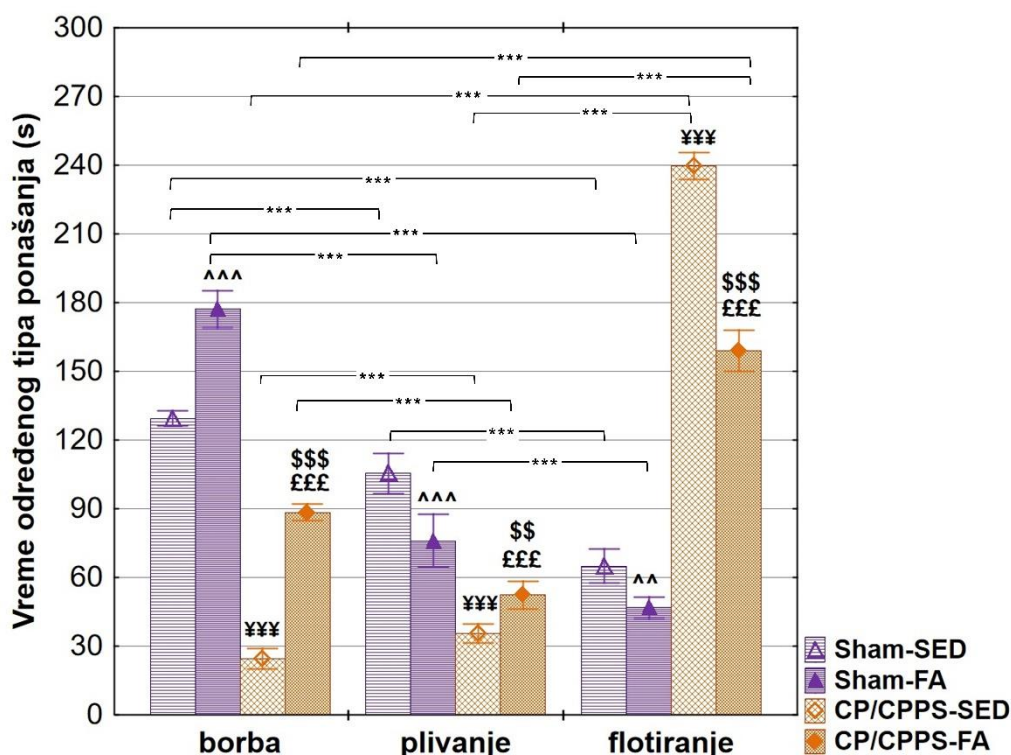
Unutargrupna distribucija parametara ovog testa je pokazala da su Sham-SED i Sham-FA životinje provele statistički značajno duže vremena u borbi, u odnosu na vreme provedeno u plivanju ($p < 0,001$) i flotiranju ($p < 0,001$), a takođe su i provele statistički značajno više vremena u plivanju u odnosu na vreme provedeno u flotiranju ($p < 0,001$, Slika 4.10.3.).

Dominantno ponašanje ovih životinja tokom testa forsiranog plivanja je bilo borba.

Eksperimentalne CP/CPPS-SED i CP/CPPS-FA životinje su provele statistički značajno više vremena u flotiranju u odnosu na vreme provedeno u plivanju ($p < 0,001$) i u borbi ($p < 0,001$, Slika 4.10.3.).

Takođe, CP/CPPS-SED životinje su provele statistički značajno više vremena u plivanju u odnosu na vreme provedeno u borbi ($p < 0,001$), dok su CP/CPPS-FA životinje provele statistički značajno više vremena u borbi, u odnosu na vreme provedeno u plivanju ($p < 0,001$, Slika 4.10.3.).

Dominantno ponašanje ovih životinja tokom testa forsiranog plivanja je bilo flotiranje.



Slika 4.10.3. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na distribuciju i trajanje borbe, plivanja i flotiranja tokom testa forsiranog plivanja kod životinja sa CP/CPSS

Vrednosti su izražene kao prosečna vrednost \pm standardna devijacija. Unutargrupna razlika u distribuciji borbe, plivanja i flotiranja je procenjena upotrebom jednosmernog ANOVA testa sa Tukey-Kramer post hoc testom ($***p < 0,001$). Statistička značajnost razlika u distribuciji borbe, plivanja i flotiranja između grupa je utvrđena istim testom ($^{\wedge\wedge}p < 0,01$, $^{\wedge\wedge\wedge}p < 0,001$ vs. Sham-SED; $¥¥¥p < 0,001$ vs. Sham-SED; $£££p < 0,001$ vs. Sham-FA; $$$p < 0,01$, $$$$$p < 0,001$ vs. CP/CPSS-SED) Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

4.10.4. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na bihevioralne i EEG karakteristike konvulzivnog ponašanja

Kako bi se ispitaio uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na ekscitabilnost CNS, korišćena je posebna kohorta životinja, koja nije bila uključena u bateriju bihevioralnih testova. Korišćenjem subkonvulzivne doze lindana, koja je životinjama administrirana 7. postoperativnog dana, ispitano je konvulzivno ponašanje i iktalna EEG aktivnost.

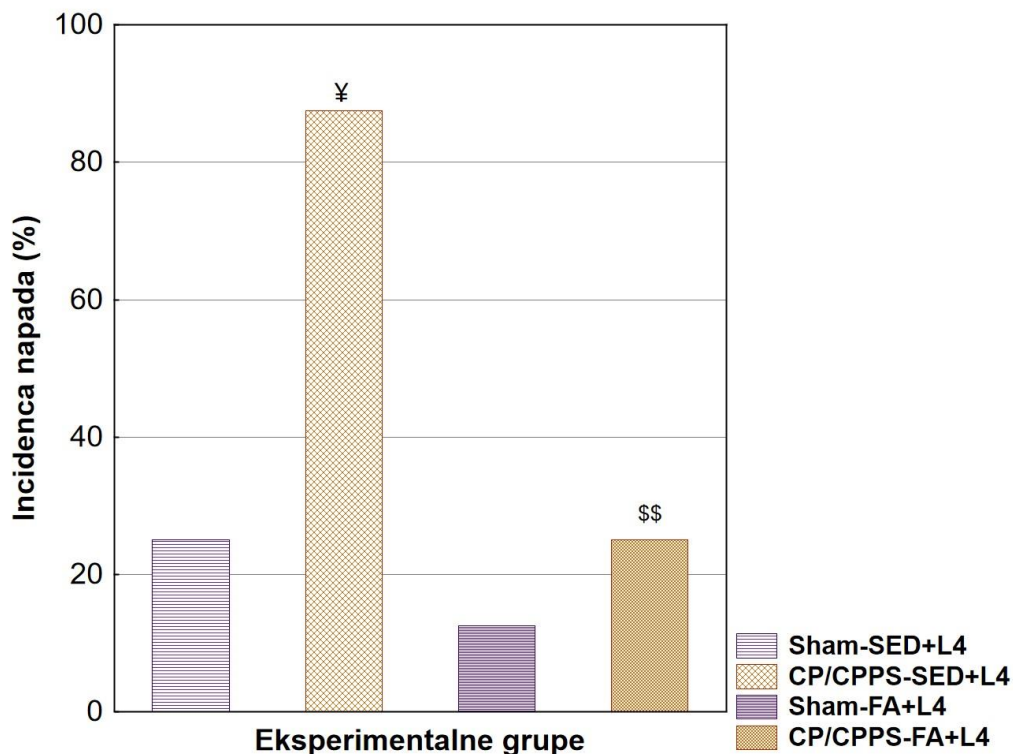
Administracijom lindana (4 mg/kg, i.p.), formirane su sledeće eksperimentalne grupe: Sham-SED+L4 (n=8), Sham-FA+L4 (n=8), CP/CPSS-SED+L4 (n=8) i CP/CPSS-FA+L4 (n=8).

Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na bihevioralne karakteristike konvulzivnog ponašanja

Incidenca konvulzivnih napada izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana je bila najniža u Sham-FA+L4 grupi životinja koje su preoperativno bile fizički aktivne i iznosila je 12,5% (Slika 4.10.4.1.).

Procenat životinja koje su konvulzirale u sedentarnoj Sham-SED+L4 kontrolnoj grupi je bio veći i iznosio 25%, ali razlika u odnosu na Sham-FA+L4 grupu nije bila statistički značajna (Sham-SED+L4 vs. Sham-FA+L4, $p > 0,05$; Slika 4.10.4.1.).

Procena efekata hronične aerobne fizičke aktivnosti na konvulzivne napade kod životinja sa prostatitisom ogleđa se poređenjem incidence konvulzija sedentarnih i fizički aktivnih životinja sa prostatitisom. Pokazano je da je incidenca napada kod CP/CPPS-FA+L4 životinja bila statistički značajno niža u odnosu na CP/CPPS-SED+L4 životinje (CP/CPPS-FA+L4 vs. CP/CPPS-SED+L4, $p < 0,01$, Slika 4.10.4.1.).

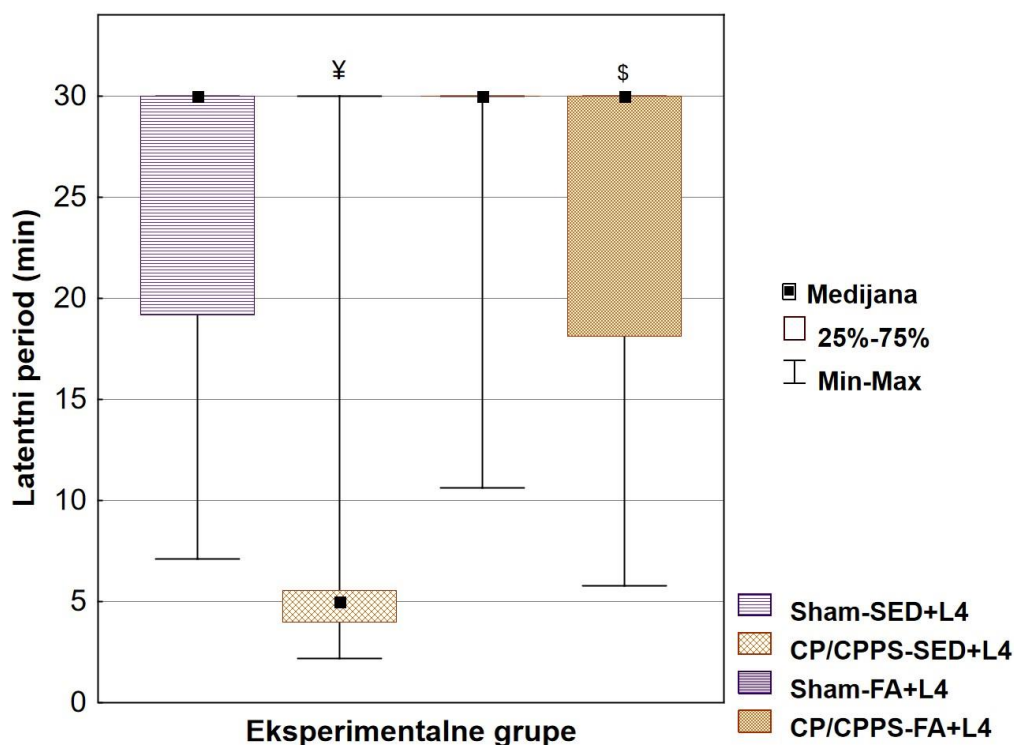


Slika 4.10.4.1. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na incidencu konvulzija izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPPS

Sedmog dana nakon operacije, pacovima je intraperitonealno administriran lindan u subkonvulzivnoj dozi (L4; 4 mg/kg), te su formirane grupe: Sham-SED+L4, Sham-FA+L4, CP/CPPS-SED+L4 i CP/CPPS-FA+L4 ($n=8$ životinja, po grupi). Incidenca napada je izražena u procentualnoj skali, a predstavlja odnos broja životinja koje su imale konvulzivni napad u odnosu na broj životinja koje nisu konvulzirale. Statistička značajnost međugrupne razlike u incidenci napada je utvrđena je upotrebom Fišerovog testa tačne verovatnoće (¥ $p < 0,05$ vs. Sham-SED+L4; \$\$ $p < 0,01$ vs. CP/CPPS-SED+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

Analiza latentnog vremena do pojave prvog konvulzivnog napada je pokazala da se ono u fizički aktivnoj Sham-FA+L4 grupi nije se statistički značajno razlikovalo u odnosu na sedentarnu Sham-SED+L4 grupu ($p > 0,05$, Slika 4.10.4.2.).

Poređenje sedentarnih i fizički aktivnih životinja sa prostatitisom je pokazalo da je preoperativna hronična aerobna fizička aktivnost kod životinja sa prostatitisom indukovala statistički značajni produžetak latentnog perioda (CP/CPPS-FA+L4 vs. CP/CPPS-SED+L4, $p < 0,05$; Slika 4.10.4.2.).

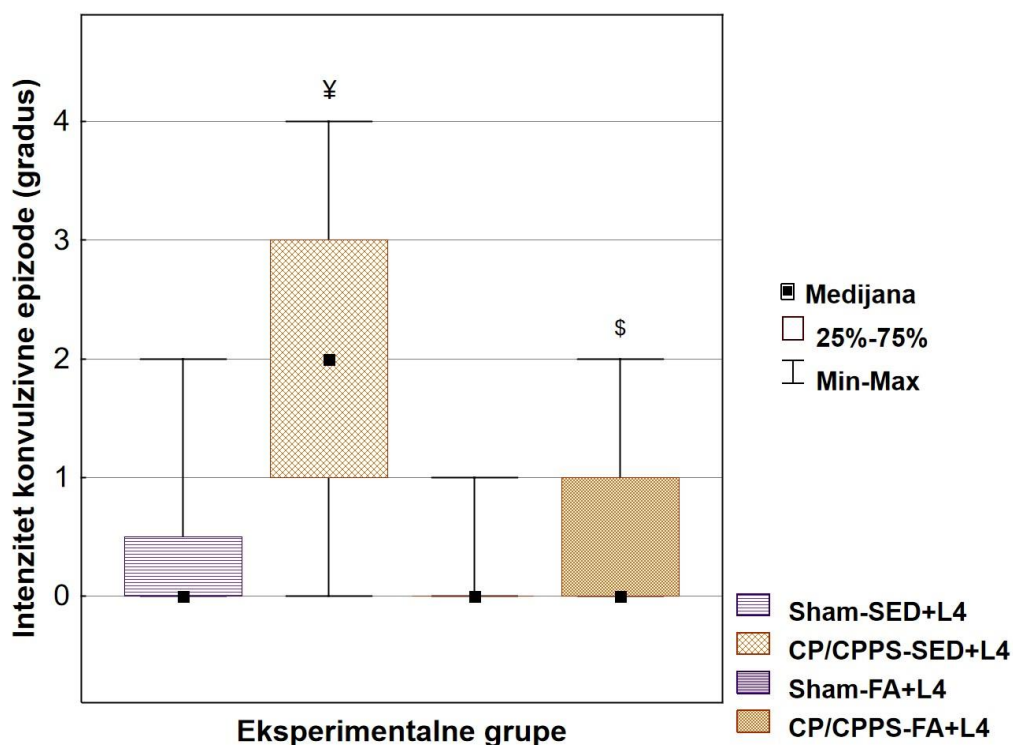


Slika 4.10.4.2. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na latentni period konvulzija izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPPS

Latentni period, meren u minutima, definisan je kao vreme koje protekne od administracije lindana do pojave prvog uočljivog znaka konvulzije. Za životinje bez konvulzivnih napada je uzeta vrednost od 30 minuta. Statistička značajnost razlike u latentnom periodu utvrđena upotrebom Kruskal-Wallis testa sa Mann-Whitney post hoc testom (¥ $p < 0,05$ vs. Sham-SED+L4; \$ $p < 0,05$ vs. CP/CPPS-SED+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.4.1

Intenzitet konvulzija izazvanih lindanom kod sedentarnih Sham-SED+L4 životinja nije se statistički značajno razlikovao u odnosu na fizički aktivne Sham-FA+L4 životinje (Sham-SED+L4 vs. Sham-FA+L4, $p > 0,05$, Slika 4.10.4.3.).

Hronična fizička aktivnost je kod životinja sa prostatitisom dovela do statistički značajnog smanjenja intenziteta napada u poređenju sa korespondentnim sedentarnim životinjama sa prostatitisom (CP/CPPS-FA+L4 vs. CP/CPPS-SED+L4, $p < 0,05$, Slika 4.10.4.3.).



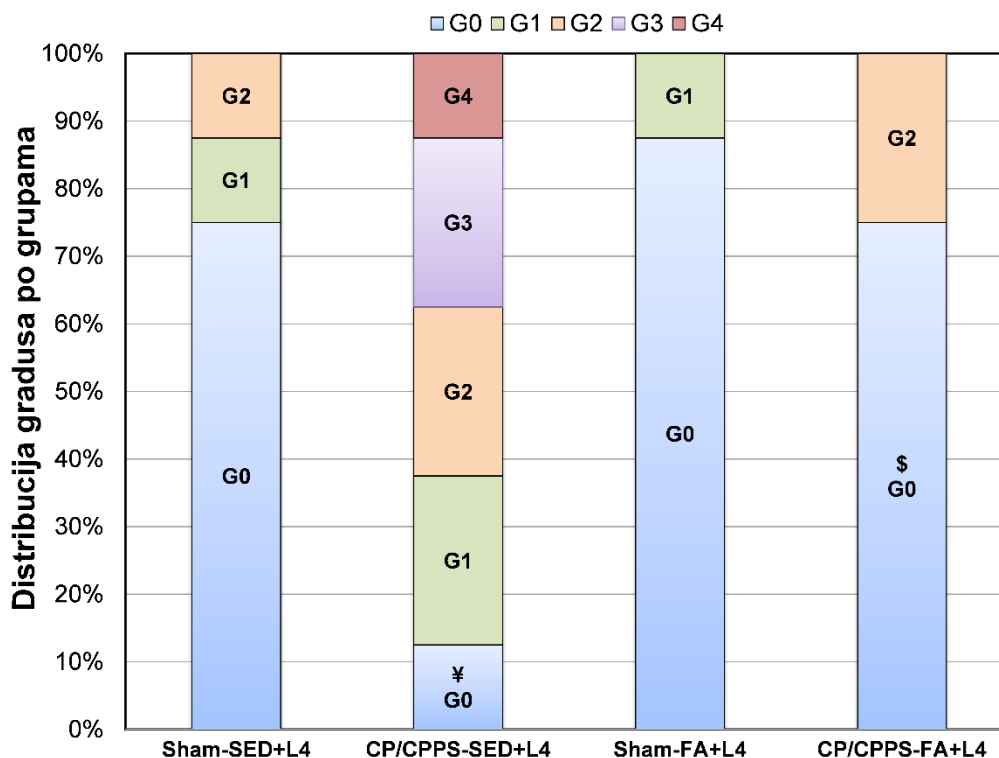
Slika 4.10.4.3. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na intenzitet konvulzija izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPPS

Intenzitet napada procenivan je na osnovu deskriptivne skale sa gradusima od 0 do 4: 0 - bez konvulzivnog odgovora; 1 - klamanje glavom i grčeviti trzaji donje vilice, 2 - mioklonički trzaji celog tela (reakcija vruće ploče), klonus prednjih i propinjanje na zadnje ekstremitete (pozicija kengura); 3 - progresija u generalizovane kloničke konvulzije praćene toničkom ekstenzijom prednjih i zadnjih ekstremiteta i repa; 4 - status epilepticus. Statistička značajnost razlika u intenzitetu napada između životinja iz različitih grupa je utvrđena upotrebom Kruskal-Wallis testa sa Mann-Whitney U post hoc testom (¥ $p < 0,05$ vs. Sham-SED+L4; \$ $p < 0,05$ vs. CP/CPPS-SED+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.4.1.

Analiza distribucije gradusa intenziteta napada unutar svake grupe pojedinačno je omogućila detaljnu analizu intenziteta napada (Slika 4.10.4.4.).

U grupi Sham-SED+L4 najveći procenat životinja (75%) je imao napade gradusa 0. U grupi CP/CPPS-SED+L4, napadi gradusa 1, 2 i 3 su bili zastupljeni u podjednakom procentu (12,5%), dok su najlakši napadi gradusa 0 i najteži napadi gradusa 4 bili opservirani u podjednakim procentima od 25% životinja. Napadi gradusa 0 su opservirani kod 87,5% životinja iz grupe Sham-FA+L4. U CP/CPPS-FA+L4, napadi gradusa 0 su bili najzastupljeniji (75%).

Treba istaći da je hronična aerobna fizička aktivnost kod životinja sa prostatitisom dovela do statistički značajnog povećanja zastupljenosti gradusa 0 u odnosu na preoperativno sedentarne životinje sa prostatitisom (CP/CPPS-FA+L4 vs. CP/CPPS-SED+L4, $p < 0,05$, Slika 4.10.4.4.).



Slika 4.10.4.4. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na distribuciju gradusa konvulzija izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPSS

Zastupljenost određenog gradusa konvulzija u svakoj grupi životinja je izražen u procentima. Statistička značajnost razlika u distribuciji različitih gradusa napada procenjena upotrebom Fišerovog testa tačne verovatnoće ($\neq p < 0,05$ vs. Sham-SED+L4; $\$ p < 0,05$ vs. CP/CPSS-FA+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.4.1.

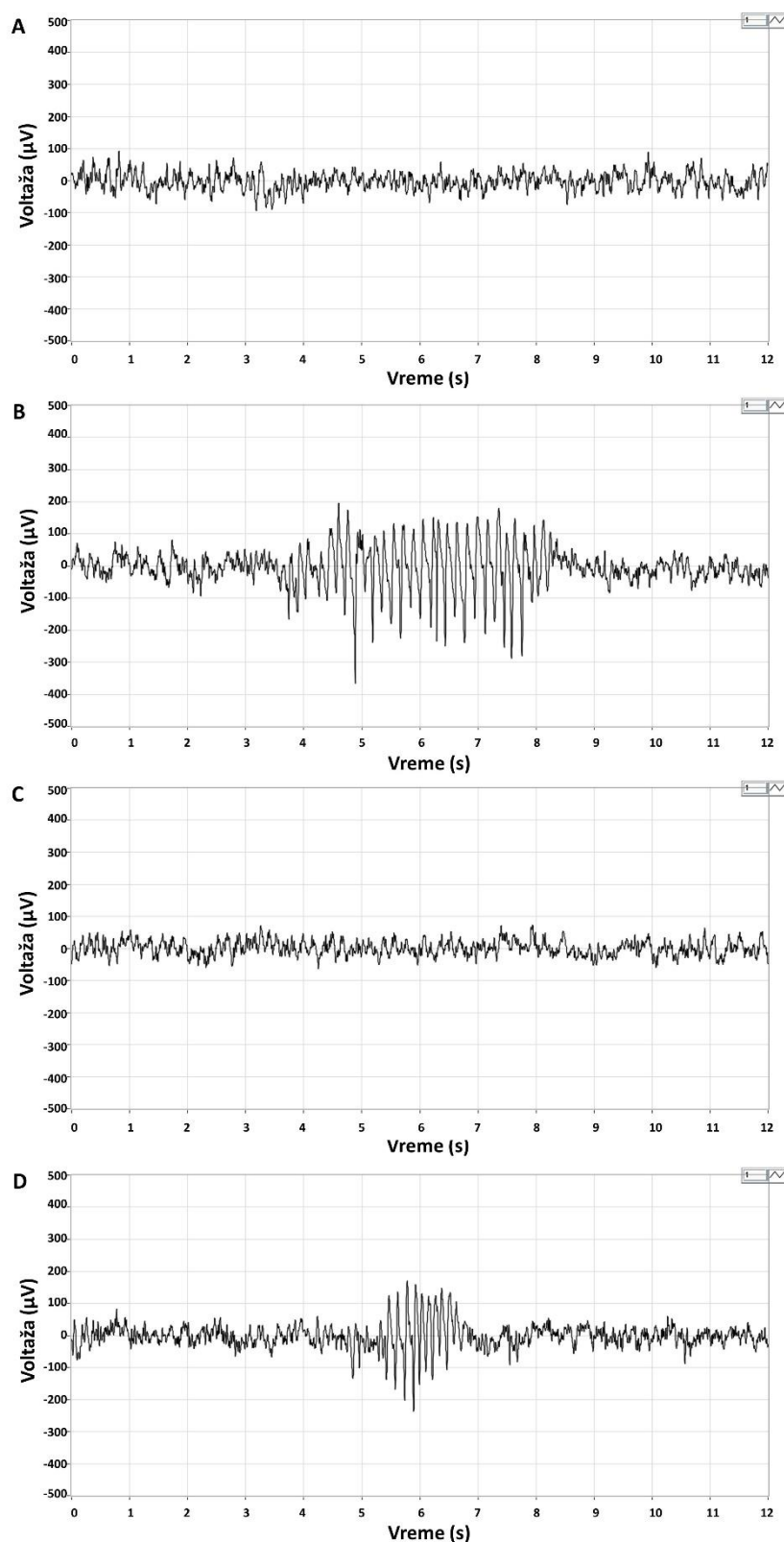
Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na elektroencefalografske (EEG) karakteristike iktalne aktivnosti izazvane lindanom

Životinjama iz grupa Sham-SED, Sham-FA, CP/CPSS-SED, CP/CPSS-FA sa prethodno implantiranim registrujućim EEG elektrodama, je intraperitonealno aplikovan lindan u dozi 4 mg/kg, a potom je učinjena akvizicija EEG signala u trajanju od 30 minuta, koji je vizuelno, a potom i programskim paketom analiziran.

Kod životinja iz Sham-SED+L4 grupe vizuelna analiza EEG zapisa pokazala je bazalnu EEG aktivnost bez znakova EEG iktalne aktivnosti (Slika 4.10.4.5.A.). Bazalna EEG aktivnost bez prisustva EEG iktalne aktivnosti registrovana je i kod Sham-FA+L4 životinja (Slika 4.10.4.5.C.).

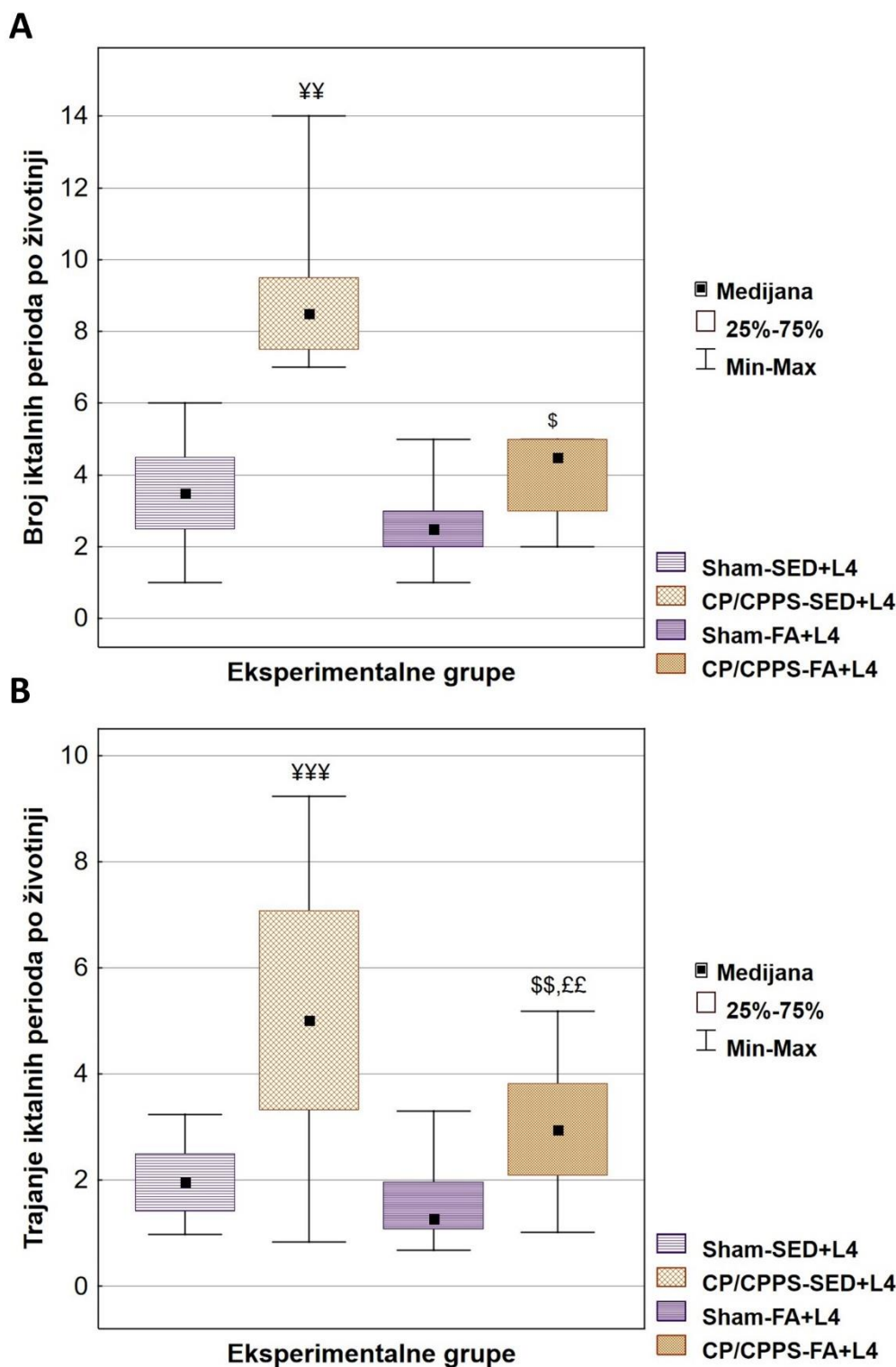
Kod CP/CPSS-SED+L4 i CP/CPSS-FA+L4 životinja je postojala EEG iktalna aktivnost, te su prikazani reprezentativni EEG iktalni periodi u vidu serije šiljaka visoke amplitude i dužeg trajanja kod CP/CPSS-SED+L4 životinja (Slika 4.10.4.5.B.) i nešto niže amplitude, frekvencije i trajanja kod životinja iz grupe CP/CPSS-FA+L4 (Slika 4.10.4.5.D.).

Broj EEG iktalnih perioda po životinji je bio statistički značajno manji kod fizički aktivnih CP/CPSS-FA+L4 životinja sa prostatitisom, u odnosu na sedentarne CP/CPSS-SED+L4 životinje sa prostatitisom ($p < 0,05$, Slika 4.10.4.6.A.). Preoperativna hronična aerobna fizička aktivnost je dovela do statistički značajnog smanjenja trajanja EEG iktalnih perioda kod životinja sa prostatitisom (CP/CPSS-FA+L4 vs. CP/CPSS-SED+L4, $p < 0,05$, Slika 4.10.4.6.B.).



Slika 4.10.4.5. Reprezentativni EEG zapis moždane aktivnosti Sham-SED+L4 (A), Sham-FA+L4 (C) životinja i EEG iktalni periodi CP/CPPS-SED+L4 (B) i CP/CPPS-FA+L4 (D) životinja

Pacovima je intraperitonealno aplikovana subkonvulzivna doza lindana (4 mg/kg, i.p.) sedmog postoperativnog dana i EEG aktivnost je registrovana tokom 30 min. Iktalni period karakteriše serija šiljaka visoke amplitude, preko 200-300 µV, sa dominantnom frekvencom od 7-8 Hz u alfa opsegu. Odvod: desni frontalni- levi parijetalni. Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.4.1.



Slika 4.10.4.6. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na broj (A) i trajanje (B) EEG iktalnih perioda po životinji izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana kod životinja sa CP/CPPS.

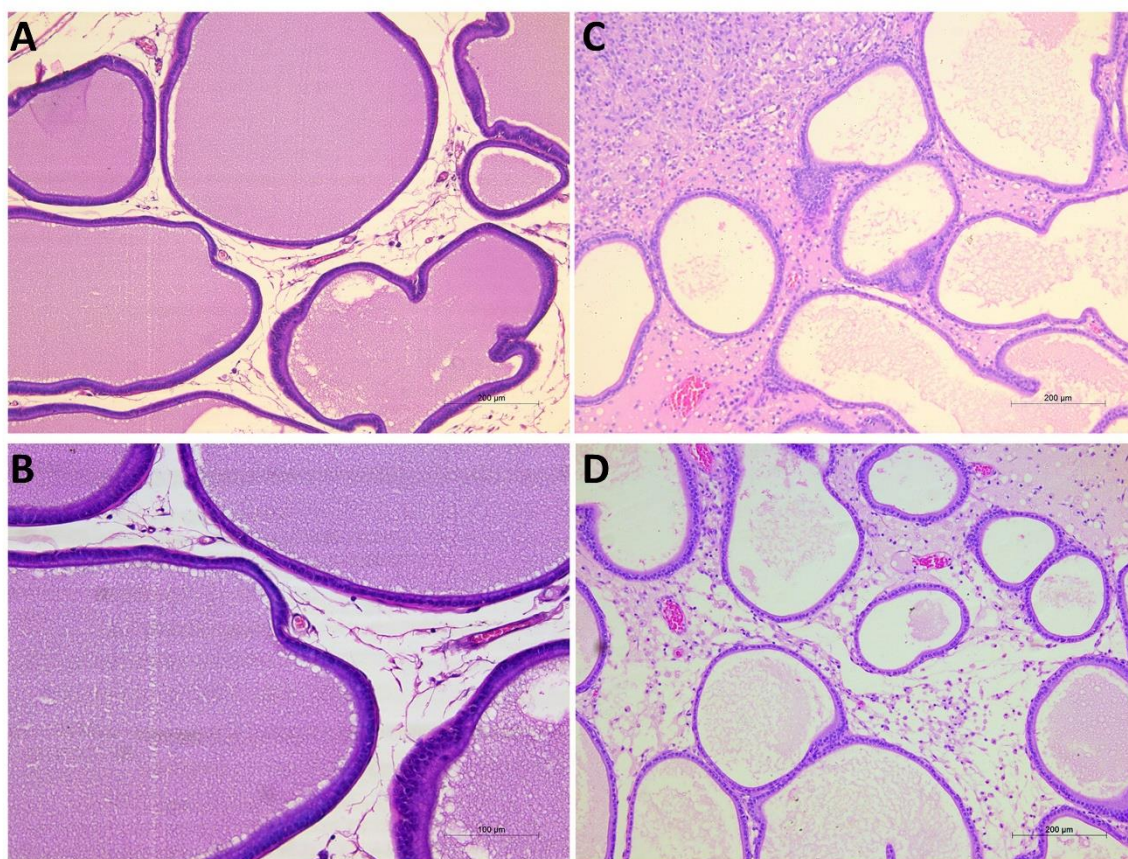
Broj i trajanje EEG iktalnih perioda po životinji je ustanovljen u svim grupama životinja. Statistička značajnost razlika u broju i trajanju EEG iktalnih perioda po životinji između životinja iz različitih grupa je utvrđena upotrebom Kruskal-Wallis testa sa Mann-Whitney U post hoc testom ($¥¥p < 0,01$, $¥¥¥p < 0,001$ vs. Sham-SED+L4; $££p < 0,01$ vs. Sham-FA+L4; $$p < 0,05$, $$$p < 0,01$ vs. CP/CPPS-SED+L4). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.4.1.

4.10.5. Uticaj hronične aerobne fizičke aktivnosti na histološke karakteristike tkiva prostate

Sedmog dana nakon operacije, po završetku bihevioralnih ispitivanja, svi pacovi iz grupa Sham-SED, Sham-FA, CP/CPPS-SED i CP/CPPS-FA su žrtvovani, a prostate su obrađene H/E tehnikom i analizirane pod mikroskopom.

Intraprostatična injekcija sterilnog 0,9% NaCl kod Sham-SED i Sham-FA pacova nije dovela do inflamacije i tkivne destrukcije (Slika 4.10.5.A.,B.).

Sa druge strane, kod CP/CPPS-SED pacova se uočavaju promene usled aplikacije 3% λ -karagenina u tkivu prostate u vidu zapaljenskih promena: proliferacija u intersticijumu izraženog stepena, infiltracija mononuklearnim zapaljenskim ćelijama, hijalinizaciju, izražena nekroza i kongestiju krvnih sudova (Slika 4.10.5.C.). Posmatranjem prostata CP/CPPS-FA pacova se konstatuje da je pretretman hroničnom aerobnom fizičkom aktivnošću doveo do smanjenja inflamacije, te su intersticijalna proliferacija, zapaljenski infiltrat i hijalinizacija bili prisutni u manjoj meri, a nekroza u intersticijumu potpuno odsutna (Slika 4.10.5.D.).



Slika 4.10.5. Reprezentativne fotomikrografije tkiva prostate životinja iz Sham-SED (A), Sham-FA (B), CP/CPPS-SED (C) i CP/CPPS-FA (D) grupa

U kontrolnim grupama životinja jasno se uočava da tkivo prostate ne pokazuje znake inflamacije ili drugih patoloških promena (A, B). U tkivu prostate CP/CPPS-SED životinja se zapaža proliferacija u intersticijumu izraženog stepena, infiltracija mononuklearnim zapaljenskim ćelijama, hijalinizacija, izražena nekroza i kongestiju krvnih sudova (C). Hronični aerobni trening je kod CP/CPPS-FA pacova redukovao stepen patoloških i inflamatornih promena: intersticijalna proliferacija, zapaljenski infiltrat i hijalinizacija su prisutni u manjoj meri, a nekroza u intersticijumu je odsutna (D). Za detalje videti opis uz Sliku 4.10.1.

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji CP/CPPS je izazvan intraprostatičnom injekcijom λ -karagenina odraslim, polno zrelim, mužjacima *Wistar albino* pacova. Ovaj model je primenjen i u drugim studijama koje su ispitivale različite aspekte hroničnog pelvičnog bola u populaciji muškaraca ili hronične neinfektivne inflamacije prostate koju ne prati nepovratno oštećenje tkiva (Radhakrishnan i sar. 2003, Radhakrishnan i Nallu 2009, Zeng i sar. 2014, Öztekin i sar. 2015, Zhang i sar. 2017). Primena λ -karagenina omogućila je u ovoj studiji razvoj sterilne i hronične inflamacije prostate, a bez upotrebe medikamenata, hormonskih preparata, kao i bez dejstva stresnih stimulusa na životinje i bez ekstenzivnih oštećenja tkiva prostate koja se zapažaju pri upotrebi iritanasa i mehaničkih metoda indukcije CP/CPPS.

Razvoj CP/CPPS u ovoj studiji je praćen funkcionalnim testovima za evaluaciju glavnih simptoma ovog sindroma i dokazan je histološkom verifikacijom patološkog nalaza u tkivu prostate.

Histološka evaluacija tkiva prostate kod životinja iz grupe CP/CPPS je pokazala tipične patohistološke znake zapaljenja prostate koji se manifestuju intersticijalnom leukocitnom infiltracijom, proliferacijom, deskavamacijom 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.

Funkcionalna ispitivanja praga bola, biohemijaska analiza proinflatornih citokina u prostati, zajedno sa histološkom evaluacijom tkiva prostate pružaju validnost ovom eksperimentalnom modelu i daju jaku potvrdu o razvoju morfoloških promena koje prate ovaj sindrom, kao i funkcionalnih alteracija u smislu alodinije i smanjenog praga bola.

Kao što je ranije istaknuto, osnovni simptom kod obolelih od CP/CPPS predstavlja hronični pelvični bol (Krieger i sar. 1999). Razvoj hroničnog bola na mehaničku draž u regiji kože skrotuma (mehanička alodinija) je jasno pokazana i funkcionalno postoperativnim merenjem praga bola. Naime, u ovoj studiji, životinje koje su dobile intraprostatičnu injekciju 3% λ -karagenina su pokazivale statistički značajnu redukciju skrotalnog praga bola na mehanički stimulus u 3. i 7. postoperativnom danu, u odnosu na životinje tretirane intraprostatičnom injekcijom fiziološkog rastvora, a slične rezultate su dobili i drugi istraživači (Radhakrishnan i Nallu 2009, Chen i sar. 2013, Zeng i sar. 2014). Na taj način je potvrđen razvoj mehaničke alodinije kod životinja sa CP/CPPS. Iako proinflatorni citokini, sintetisani u tkivu prostate, mogu izazvati inflamatorni bol, ovaj bol dobija karakteristike neuropatskog zbog centralne i periferne senzitivizacije (Cohen i Mao 2014). Naime, periferna senzitivizacija posredovana IL-1 β se odigrava njegovim direktnim, ali i indirektnim efektima. Direktni mehanizmi uključuju aktivaciju signalnog puta posredovanog p38 klasom mitogenima-aktivirane proteinske (eng. mitogen-activated protein, MAP) kinaze sa posledičnom aktivacijom dva tipa natrijumskih struja otpornih na tetradotoksin na nociceptivnim nervnim završecima (Binshtok i sar. 2008). Indirektni mehanizmi podrazumevaju indukciju sinteze NGF i prostaglandina E2 (PGE2) (Maier i sar. 1990), koji potom aktiviraju proteinsku kinazu A, što vodi ka fosforilaciji i aktivaciji natrijumskih voltažno-zavisnih kanala (Baker 2005). Sa druge strane, mehanizam nastanka mehaničke alodinije se može objasniti i centralnom senzitivizacijom koja je posledica mikroglijalne i astrocitne aktivacije u CNS koja se dešava prodorom interleukina lokalno sintetisanih u prostati kroz narušenu KMB (Vallejo i sar. 2010). Usled aktivacije ovih ćelija, u CNS se dešava rezidentna sinteza nove količine proinflatornih citokina (IL-1 β i IL-6) što za posledicu ima aktivaciju protein kinaze C i A u neuronima koja vodi ka hiperaktivnosti neurona i facilitaciji u prenosu nociceptivnih stimulusa (Barkhudaryan i Dunn 1999, Cohen i Mao 2014).

U dorzalnim rogovima sive mase kičmene moždine je utvrđena hiperekscitabilnost sekundarnih nociceptivnih neurona kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS (Deng i sar.

2019). Uloga citokina na modulaciju nocicepcije na supraspinalnom nivou je manje istražena, ali povišena ekspresija IL- β i IL-6 u talamusu i frontalnom korteksu kod životinja sa CP/CPPS, koja je dokazana u našoj studiji, može doprineti nastanku mehaničke alodinije. Talamus predstavlja značajnu subkortikalnu relejnu stanicu u transmisiji bola, dok je moždana kora esencijalna za percepciju bolnih stimulusa, usmeravanje pažnje ka bolu, emocionalnom odgovoru na bol, ispoljavanju bihevioralnih alteracija usled bolnih senzacija i stvaranju memorije vezane za bol (Cohen i Mao 2014). Animalne studije su pokazale da ekscesivne količine kortizola dovode do remodelovanja u ključnim strukturama CNS koje su zadužene za percepciju stresnih stimulusa kao što je bol. Kortizol dovodi do jačanja sinapsi i formiranja aberantnih veza u strukturama CNS što dovodi do centralne senzitivacije i facilitira percepciju bolnih stimulusa, a ujedno zbog promena u amigdali menja doživljaj bolnih stimulusa i indukuje razvoj psihijatrijskih komorbiditeta (Mora i sar. 2012). Nakon inicijalne faze porasta nivoa kortizola, dolazi do iscrpljena HPA osovine, te se razvija hroničnim stresom indukovani hipokortizizam koji dovodi do somatizacije bola koja je dokazano prisutna kod obolelih od CP/CPPS (Hannibal i Bishop 2014). Bitan faktor u razvoju prostatitisa jesu i polni hormoni, a postulat je da testosteron ima protektivni efekat, dok estrogen pospešuje razvoj inflamacije prostate (Pontari i Ruggieri 2004). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je kod pacova sa CP/CPPS koncentracija testosterona bila niža, u odnosu na kontrolne Sham životinje, te je i ova hormonska alteracija jedan od mogućih promovišućih faktora za nastanak zapaljenja u tkivu prostate CP/CPPS životinja, koje smo takođe opservirali histološkom analizom.

Eksperimentalni podaci su pokazali da je jedan od osnovnih pokazatelja opšteg zdravstvenog stanja nagonsko konzumatorno ponašanje koje se odnosi na unos hrane, a u tesnoj vezi je sa dnevnim prirastom u telesnoj masi (Rhudy 2009). Hronični bol, *per se*, koji smo jasno dokazali u ovoj studiji i posledično hronično stresno stanje usled njegovih brojnih patofizioloških posledica snažno utiče na nutritivno ponašanje kod životinja (Abbott i sar. 2006, Ellacott i sar. 2010). Dnevni unos hrane, a posledično i dnevni prirast u telesnoj masi mogu biti narušeni od strane mnogobrojnih faktora: stres, hronični bol, hormonski disbalans, poremećaj sekrecije interleukina i adipokina (Ulrich-Lai i sar. 2015, Chaskiel i sar. 2019, Tsang i sar. 2020). Međutim, dinamika promena dnevnog unosa hrane i dnevnog prirasta u telesnoj masi kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS ranije nije ispitivana. U ovoj studiji je analiziran uticaj eksperimentalnog CP/CPPS na dnevni unos hrane i dnevni prirast u telesnoj masi. Naši rezultati su pokazali da kod životinja sa prostatitisom postoji statistički značajno manji dnevni unos hrane u svim postoperativnim danima u odnosu na životinje bez prostatitisa, dok je analiza dnevnog prirasta u telesnoj masi pokazala da kod eksperimentalnih životinja postoji smanjen dnevni prirast u telesnoj masi u prvim postoperativnim danima, dok se taj trend ne održava u kasnijim postoperativnim danima.

Nervni putevi i moždani regioni (talamus, hipokampus, amigdale, prefrontalni i insularni korteks) koji su zaduženi za transmisiju i obradu bolnih senzacija pokazuju visok stepen preklapanja sa regionima zaduženim za emotivno, nagonsko i konzumatorno ponašanje. Stoga, jasno je da hronični bol dovodi do funkcionalnih i biohemijskih alteracija u ovim regionima koje se manifestuju promenama ponašanja (Meerwijk i sar. 2013). Animalne studije na različitim modelima hroničnog bola su pokazale da postoji snižena sekrecija dopamina i smanjena ekspresija D2 dopaminergičkog receptora u hipotalamusu životinja koje pate od hroničnog bola, a da je stepen ovih alteracija proporcionalan intenzitetu bola (Sagheddu i sar. 2015). Ista opservacija postoji i u kliničkim studijama koje su metodama radiološke vizuelizacije pokazale smanjenu dopaminergičku neurotransmisiju u mozgu kod pacijenata koji pate od hroničnog bola (Loggia i sar. 2014). S obzirom da dopamin učestvuje u motivacionom ponašanju, uključujući i konzumatorno ponašanje, disfunkcija dopaminergičke neurotransmisije u hipotalamusu se povezuje sa gubitkom osećaja nagrade nakon konzumacije hrane, te je to direktni uzrok smanjenog konzumatornog ponašanja (Frank i sar. 2016). Naši rezultati su

konzistentni sa rezultatima sličnih eksperimentalnih studija na modelima hroničnog bola. Studija na eksperimentalnom modelu hroničnog artritisa je pokazala da kod pacova sa hroničnim bolom postoji značajno i perzistentno smanjenje dnevnog unosa hrane uz izraženu hipodipsiju (Millan i sar. 1987), a kao glavni anoreksigeni faktor se navodi hroničnim stresom-indukovana povećana sinteza CRH. Usled perzistirajućeg bola koji predstavlja hronično stresno stanje, intenzivno se regrutuje HPA osovina, što je kod životinja praćeno povišenim vrednostima kortikosterona u serumu, koje smo i mi u našoj studiji dokazali kod životinja sa CP/CPPS. Kliničke studije obolelih od CP/CPPS su pokazale sličnu opservaciju sa povećanom serumskom koncentracijom glukokortikoida, ACTH i CRH kod ovih pacijenata (Dimitrakov i sar. 2008a). Dodatno, povećanje koncentracije CRH može biti potencijalni uzrok smanjenja dnevnog unosa hrane i prirasta u telesnoj masi koji su opservirani u ovom eksperimentu. Indirektni uticaj CRH se ogleda kroz njegovo delovanje na smanjeno oslobađanje 5-hidroksitriptamina (5-HT), što za posledicu ima smanjen unos hrane (Zhang i sar. 2020c), a pored toga CRH je prepoznat i kao direktni anoreksigeni faktor (Bovetto i sar. 1996) usled vezivanja za sopstvene CRH receptore u hipotalamusu (Weninger i sar. 1999).

Dodatni potencijalni faktori smanjenja telesne mase mogu biti promene citokinskog miljea. Kao glavni faktori povećane lipolize kod miševa izloženih hroničnom stresu (Mishra i sar. 2019) se navode brojni adipokini, IL-6 i IL-1 β . S obzirom da smo pokazali da eksperimentalno izazvani CP/CPPS dovodi do neuroinflamacije praćene povećanom sintezom IL-6 i IL-1 β u talamusu i korteksu životinja, jasno je da ova izmena citokinskog profila može biti uzrok promena dnevnog prirasta u telesnoj masi. Najnovija istraživanja su prepoznala IL-1 β i IL-6 kao medijatore gubitka mase usled supresije dnevnog unosa hrane, a pretpostavljeni mehanizam je interakcija ovih citokina i sa receptorima za leptin na nivou CNS (Mishra i sar. 2019). Leptin je davno prepoznati anoreksigeni faktor koji aktivacijom svojih receptora u CNS suprimira dnevni unos hrane (Klok i sar. 2007), a IL-6 suprimira fosforilaciju sekundarnih glasnika u signalnom putu zaduženom za transmisiju signala na nivou leptinskog receptora i time pojačava njegove signalne efekte u indukciji osećaja sitosti (Foll i sar. 2015).

U ovoj studiji je pokazano da 7. postoperativnog dana od intraprostatične injekcije karagenina u tkivu prostate postoje povišene vrednosti IL-1 β , glavnog proinflamatornog citokina koji se povezuju sa patogeneozom simptoma CP/CPPS. Ovakav nalaz u skladu je sa mišljenjem da u osnovi mehaničke alodinije leži inflamacija prostate. Povećana sinteza IL-1 β u tkivu prostate je takođe dokazana i kod obolelih muškaraca u kliničkim ispitivanjima (Desireddi i sar. 2008, Quick i sar. 2012), ali i kod životinja u ostalim eksperimentalnim modelima CP/CPPS (Asakawa i sar. 2001, Chen i sar. 2013, 2014, Hu i sar. 2016). Sa druge strane, naša studija je pokazala smanjenu ekspresiju IL-6 u tkivu prostate, što je u suprotnosti sa nekim eksperimentalnim studijama koje su pokazale njegove veće nivoe (Asakawa i sar. 2001, Yoon i sar. 2013). Ova diskrepanca se objašnjava različitim metodama indukcije inflamacije prostate u različitim eksperimentalnim modelima, kao i različitim trajanjem bolesti, odnosno različitim vremenom žrtvovanja životinja. Pokazano je da postoji dinamička fluktuacija nivoa IL-6 u prostati koja korelira sa intenzitetom simptoma i znaka zapaljenja, te se povišene vrednosti ovog citokina očekuju u akutnoj fazi inflamacije, dok razvoj hroniciteta prati njegova manja ekspresija u tkivu prostate (John i sar. 2001, Boehm i sar. 2012). Kako je IL-6 jedan od citokina sintetisanih tokom Th1 proinflamatornog odgovora, naši nalazi ukazuju da je upravo taj tip inflamatornog odgovora jedan od mehanizama razvoja eksperimentalnog CP/CPPS. U nekim drugim studijama fokus je bio na Th17 ćelijskom odgovoru. Naime, pokazano da kod miševa sa eksperimentalnim CP/CPPS postoji povećana ekspresija IL-17 u inflamiranom tkivu prostate (Murphy i sar. 2015). S obzirom da su i Th1 i Th17 odgovori važni u pokretanju odgovora na inflamaciju, očekivano je da oni deluju sinergistički i da se oba aktiviraju kod prostatitisa, naročito izazvanog uropatogenom bakterijom *E.Coli* gde je pokazana infiltracija tkiva prostate Th1 i Th17 limfocitima (Quick i sar. 2013).

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, u odnosu na kontrolne životinje bez prostatitisa.

Model generalizovanih epileptičnih napada izazvanih lindanom je zahvalan animalni model hemijskim-supstancama indukovanih epileptičnih napada jer pruža mogućnost analize bihevioralnih i EEG manifestacija napada na brz, pouzdan i reproducibilan način (Blaszczak i Turski 1998, Mladenović i sar. 2007, Hrnčić i sar. 2011, Stanojlović i sar. 2013). Iako je tradicionalno stanovište da prokonvulzivni efekat lindana primarno potiče od blokade GABA_A receptora (Vale i sar. 2003), postoje i drugi mehanizmi koji mogu biti posrednici ovog njegovog efekta, a najčešće se navode mobilizacija jona kalcijuma, fenomeni posredovani ekscitatornim aminokiselinama, kao i NO-posredovana neurotransmisija (Hrnčić i sar. 2011). Parametri konvulzivnog ponašanja i EEG manifestacije podvrgavanja Sham+L4 životinja subkonvulzivnoj dozi lindana su bili očekujući i u skladu sa prethodnim istraživanjima (Hrnčić i sar. 2011, Stanojlović i sar. 2013). Imajući u vidu eksperimentalne manipulacije životinjama tokom indukcije CP/CPPS, u našoj studiji smo se opredelili za ovaj model generalizovanih epileptičnih napada, obzirom da on ne zahteva ekstenzivne procedure na životinjama i dugoročni tretman.

Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja je demonstrirala hiperekscitabilnost CNS i povećanu podložnost za razvoj epileptičnih napada u eksperimentalnom modelu CP/CPPS. Mehanizmi koji leže u osnovi hiperekscitabilnosti su dosta raznovrsni, ali jedan od mogućih jeste hroničnim bolom uzrokovana neuroinflamacija sa stvaranjem proinflamatorne mikrookoline u cerebralnom korteksu i talamusu.

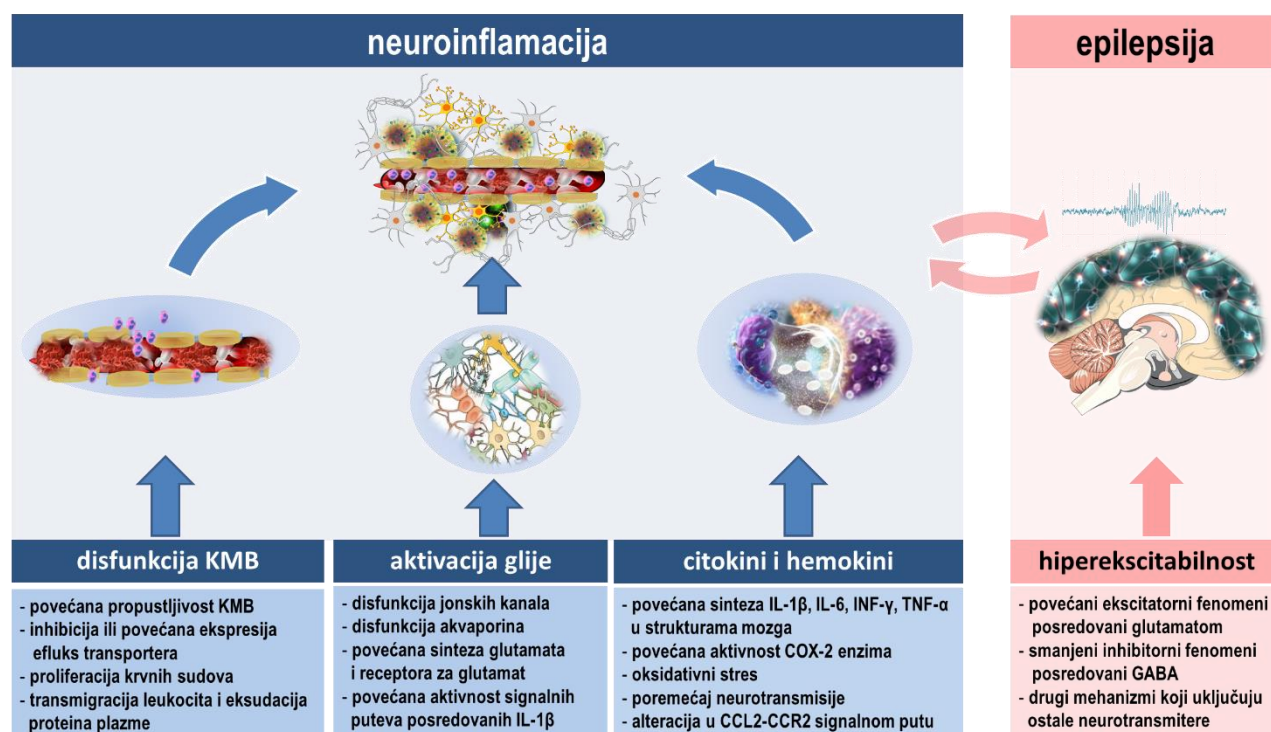
Rezultati naše studije su pokazali da je u EEG iktalnim periodima dominirala bioelektrična aktivnost niže frekvencije, ali je udeo aktivnosti koji pripada alfa ritmu (7-15 Hz) takođe bio visok. Dakle, u našem istraživanju su tokom EEG iktalne aktivnosti najzastupljeniji ritmovi opsega alfa i teta. FFT analiza je pokazala da su u ovom istraživanju najveću PSD posedovali teta i beta frekvencijski opsezi, dok je najmanju PSD pokazivao opseg beta. Nalaz velike PSD teta opsega se objašnjava se činjenicama iz kliničkih ispitivanja koja su pokazala da teta talasi dominiraju tokom buđenja i stvaranja memorije (Greenberg i sar. 2015, Chaskiel i sar. 2019).

Homeostaza CNS je uslovljena balansom dva međusobno suprotstavljena procesa, ekscitacije i inhibicije, te i najmanje narušavanje ovog balansa (povećanje ekscitacije i/ili smanjenje inhibicije) vodi u hiperekscitabilnost koja se ispoljava epileptičnom aktivnošću (Heise i sar. 2016). Mehanizmi epileptogeneze, procesa tokom koga dolazi do razvoja epilepsije u do tada zdravom mozgu (McNamara i sar. 2006), su još uvek enigma, pa je teško i sprečiti pojavu napada u drugim oboljenjima u kojima postoje predisponirajući faktori. O implikacijama epilepsije na socijalnu, ekonomsku i emocionalnu sferu života, kao i troškove lečenja, najbolje govori podatak da približno 70 miliona odraslih i 35 miliona dece u svetu boluje od epilepsije, dok su 2 od 25 osoba imale bar jedan konvulzivni napad u toku života, pri čemu je više od 65% pacijenata prvi napad doživelo u detinjstvu (Beghi 2020). Oko 6 miliona ljudi boluje od epilepsije u Evropi, a 50 000 u Srbiji (Milovanović i sar. 2014). Zapanjujuća je činjenica da je oko 40% pacijenata rezistentno na postojeću antiepileptičnu terapiju (Krauss i Sperling 2011).

Epilepsija, kao nozološki entitet se odlikuje spontanim i rekurentnim konvulzivnim napadima koji su izazvani nekim patogenim procesom koji remeti strukturu i/ili funkciju neurona i glija ćelija. Faktori koji dovode do epilepsije i izolovanih konvulzivnih napada su brojni i vrlo raznovrsni, a mogu biti prisutni u mnogobrojnim bolestima. U najčešće razloge se ubrajaju: povišena telesna temperatura kod dece, intoksikacija lekovima i zavisnost od istih, infekcije CNS (meningitis, encefalitis, moždani udar, apsces mozga i dr.), povrede glave,

alkoholizam, intoksikacija polutanima iz životne sredine (Mladenović i sar. 2007, Hrnčić i sar. 2011), metabolički poremećaji (hipo/hiperglikemija, hipokalcijemija) (Shneker i Fountain 2003), poremećaji spavanja (Šusić i Markovic 1993, Hrnčić i sar. 2016), hiperhomocistinemija (Hrnčić i sar. 2014), vizuelni stimuli (Zifkin i Inoue 2004), stres (Moon i sar. 2016), menstrualni ciklus (Herzog i sar. 2015), određeni režimi ishrane (Gordon i Dooley 2015), vaskularne nenormalnosti, sekvele moždanih udara i subarahnoidalna hemoragija (Annegers i sar. 1996). Dakle, neki od pobrojanih faktora za razvoj epileptogeneze i izolovanih napada su prisutni i u sklopu CP/CPPS, te je u kontekstu opservirane hiperekscitabilnosti CNS potrebno razmotriti i njihove mehanicističke efekte.

Neuroinflamacija, sa međusobnim isprepletanim odnosom između glija ćelija, disfunkcije KMB i citokina, predstavlja osnovni etiopatogenetski supstrat brojnih neuropatoloških stanja, ali i epileptogeneze (Slika 5.1.) Još uvek je nerazjašnjeno pitanje da li neuroinflamacija dovodi do epileptogeneze ili nastaje kao posledica epileptičnih pražnjenja u stanjima hiperekscitabilnosti CNS, ali jasno je dokazan njihov odnos pozitivne povratne sprege (Barker-Haliski i sar. 2017).



Slika 5.1. Uloga neuroinflamacije u procesu epileptogeneze

Neuroinflamacija je kompleksni proces koji uključuje disfunkciju KMB, aktivaciju glija ćelija i povećanu produkciju citokina i hemokina. Neuroinflamacija je patološki supstrat u procesu epileptogeneze, ali postoji pozitivna povratna sprega između ova dva na izgled odvojena procesa. Modifikovano prema: Šutulović i sar. 2018 i rezultatima naših istraživanja.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali povišene vrednosti IL-1 β i IL-6 u korteksu i talamusu životinja sa CP/CPPS. Citokini, kao solubilni molekuli sa plejotropnim fiziološkim i patološkim ulogama koje su detaljnije razmotrene u Uvodu, mogu ispoljavati prokonvulzivne i antikvulzivne efekte (Vezzani i sar. 1999). Ova opservacija demonstrira multifaktorijalnu prirodu citokina i kompleksni odnos između imunskog sistema i epileptogeneze. Uloga alteracija imunskog odgovora i inflamatornih citokina u epileptogenezi i nastanku izolovanih epileptičnih napada je do sada ekstenzivno ispitivana (Ravizza i Vezzani 2006, Ravizza i sar. 2008, Galic i sar. 2012). Uloga ovih studija je esencijalna u razumevanju mehanizama

epileptogeneze i hiperekscitabilnosti CNS koja je posredovana inflamacijom, a sa druge strane ove studije omogućavaju razvoj imunoterapije u lečenju epilepsije. Kliničke studije sugerisu da u nastanku hiperekscitabilnosti CNS ulogu ima izmena imunološkog profila organizma (Rosa i sar. 2016), dok su mehanicistički odgovor u ovoj povezanosti dale animalne studije koje sugerisu da u hiperekscitabilnosti usled inflamacije leži poremećaj sinaptičke plastičnosti i reorganizacija neuronskih mreža unutar CNS (Di Filippo i sar. 2013).

Prokonvulzivni efekti IL-1 β , koji je u ovoj studiji bio povećan u grupi životinja sa razvijenim prostatitisom, su prvi prepoznati od strane Vezzani i sar. (1999) u istraživanju na limbičkom modelu epilepsija izazvanim bikukulinom, kainskom kiselinom i električnom stimulacijom kod miševa. U ovoj i narednim studijama (Vezzani i sar. 1999, 2002) pokazana je povišena produkcija ovog citokina od strane glija ćelija i neurona u hipokampusu životinja. Ove navode potvrđuje činjenica da administracija antagonistice receptora za IL-1 (IL-1Ra) dovodi do redukcije intenziteta napada izazvanih bikukulinom (Vezzani i sar. 2002). Mehanizmi prokonvulzivnih efekata IL-1 β su raznovrsni i još uvek nisu u potpunosti ustanovljeni. Neki od pretpostavljenih mehanizama uključuju: intracelularne Ca²⁺ jonske struje, modifikaciju voltažno-zavisnih jonskih kanala sa redukcijom praga depolarizacije neurona (Xu i sar. 2013), kao i stimulaciju endogene produkcije NO u CNS od strane iNOS enzima (Meini i sar. 2000). Zapravo, modifikacija nivoa endogenog NO rezultuje promenom u epileptičnoj aktivnosti, jer je sa jedne strane pokazano da NO ima prokonvulzivno dejstvo u lindanom-izazvanim konvulzijama (Hrnčić i sar. 2011), dok je sa druge strane pokazan njegov antikonvulzivni efekat u napadima izazvanim homosictein-tiolaktonom (Hrnčić i sar. 2010).

Dodatno, IL-1 β indukuje dugotrajno oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera, aktivira NMDA receptore i time stvara hiperekscitabilne uslove u CNS. Pokazano je da IL-1 β pojačava fokalna električna pražnjenja neurona u eksperimentalnom modelu konvulzija izazvanih kainskom kiselinom, a kao glavni mehanizam ove opservacije se navodi pojačana glutaminička neurotransmisija (Zhu i sar. 2006). Dakle, obzirom na oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera posredstvom IL-1 β , zaključeno je da on poseduje i potencijalna ekscitotoksična svojstva (Leal i sar. 2018). Istovremeno, IL-1 β poseduje potencijal da negativno moduliše GABA_A receptore (Wang i sar. 2000), inhibira efluks K⁺ (Meini i sar. 2000), i smanji ponovno preuzimanje ekscitatornih neurotransmitera, a povećava recikliranje GABA_A receptora od strane glija ćelija (Hu i sar. 2000). Sve ove činjenice podržavaju hipotezu da povišena ekspresija IL-1 β koja je u našoj studiji dokazana u korteksu i talamusu životinja sa CP/CPPS može kontribuirati u smanjenju praga ekscitacije pri razvoju lindanom-indukovanih epileptičnih napada.

Osim povećanog nivoa IL-1 β , rezultati naše studije su pokazali povišene nivoe IL-6 u talamusu i korteksu kod životinja sa prostatitisom. Uloga IL-6 u nastanku epileptičnih napada je u literaturi manje opisana u odnosu na IL-1 β . Veliki broj kliničkih studija je pokazao brz i tranzitorni porast koncentracije IL-6 u serumu i cerebrospinalnoj tečnosti nakon epileptičnih napada, gde je primećeno da je maksimalna koncentracija bila 12h nakon napada i perzistirala do 24h (Lehtimäki i sar. 2004, 2007, Liimatainen i sar. 2009). Međutim, brojne studije su pokazale povećane serumske koncentracije ovog interleukina i u interiktalnom periodu (Lehtimäki i sar. 2004, 2007, Liimatainen i sar. 2009).

Eksperimentalne studije na različitim modelima epilepsije su pokazale povišenu sintezu IL-6 u različitim delovima mozga koja je ispoljavala vremensku zavisnost (Vezzani i sar. 2002, Rosell i sar. 2003, Li i sar. 2011). Egzozna aplikacija IL-6 dovodi do povećanja incidencije i intenziteta epileptičnih napada u brojnim eksperimentalnim modelima epilepsije (Kalueff i sar. 2004). Zanimljiva opservacija iz humanih studija je povišena serumska koncentracija IL-6 kod obolelih od epilepsije temporalnog režnja, ali ne i kod obolelih od drugih vidova epilepsije (Liimatainen i sar. 2009). Pretpostavlja se da su mnogobrojni faktori odlučujući po pitanju

nastanka elevacije IL-6 kod obolelih od epilepsije, a oni se prevashodno odnose na: tip i trajanje epileptičnih napada, tip epilepsije i učestalost nastanka epileptičnih napada (Alapirtti i sar. 2018).

U skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji, možemo pretpostaviti vezu između CP/CPPS, proinflammatoryh citokina kao neuroinflammatoryh medijatora i povišene sklonosti ka nastanku epileptičkih napada, uz potencijalno objašnjenje razloga nastanka hiperekscitabilnosti CNS. Hronični prostatitis je indukovao nastanak inflamatornog bola i mehaničke alodinije u regiji skrotalne kože, kao i izmenu citokinskog profila u prostati i strukturama mozga. Povišeni nivoi proinflammatoryh citokina IL-1 β i IL-6 u pojedinim strukturama mozga i povišena ekspresija IL-1 β u prostati mogu biti direktni medijatori hiperekscitabilnosti CNS tako što deluju promovišuće na prokonvulzivne efekte lindana. Sa druge strane, potencijalno indirektno dejstvo ovih citokina na nastanak epileptičkih napada se može posmatrati i kroz njihov potencijal da indukuju neuroinflamaciju. U literaturi su definisana dva načina kojim proinflammatory medijatori dospevaju u CNS iz udaljenog, perifernog područja zapaljenja. Prvi, humoralni put je posredovan cirkumventrikularnim organima, dok je drugi, nervni put, posredovan aferentnim signalima koji nastaju aktivacijom receptora za citokine na periferiji (Sharma i sar. 2019).

Povišeni nivoi IL-1 β i IL-6 su dokazani u korteksu, što je visoko indikativno za nastanak epileptičkih pražnjenja, ali i u talamusu, što u patofiziološkim uslovima putem talamo-kortikalnih neuronskih krugova može biti inicirajući faktor u propagaciji epileptiformnih fenomena unutar CNS (Meeren i sar. 2002). Dodatno, neadekvatne adaptacione promene u neuronalnim mrežama za obradu nociceptivnih stimulusa, pogotovu one koje obuhvataju i talamus, mogu biti uzrok opservirane hiperekscitabilnosti u našem istraživanju. Naime, bol, bez obzira na njegovo poreklo, uvek teži ka centralizaciji putem neadekvatnih i nesvrshodnih narušenih mehanizama adaptacije, koji duboko oštećuju strukturu i funkciju CNS, a posledično i ponašanje (Borsook 2012).

Ipak, navedena interpretacija rezultata ima limitirajuće faktore. Postoje i ostali mehanizmi koji kod životinja sa CP/CPPS mogu biti uključeni u razvoj hiperekscitabilnosti, a koji nisu u potpunosti ispitani u ovoj studiji. Spektroskopska analiza primenom nuklearne magnetne rezonancija je pokazala da postoji povećana holinergička i smanjena GABAergička transmisija u prednjem cingulatnom korteksu kod žena obolelih od sličnog entiteta, intersticijskog cistitisa, koji se manifestuje sličnom kliničkom slikom kao CP/CPPS (Harper i sar. 2018). Dodatno, neuropatski i inflamatorni bol su udruženi sa narušenom descendnom modulacijom nociceptivnih signala koja je posredovana adrenergičkim i serotonergičkim putevima (Wei i sar. 2010, Cohen i Mao 2014). Ova činjenica implikuje da alteracije u sintezi neurotransmitera takođe kontribuiraju u nastanku hiperekscitabilnosti. Skorašnja studija Temp i sar. (2017) je pokazala da postoji povećana ekspresija COX-2 enzima i njenih derivata u mozgu nakon konvulzivnih napada, kao i postojanje antikonvulzivnih osobina COX-2 inhibitora. Prostaglandini, kao derivati enzima COX-2, takođe su uključeni u proces remodelovanja neuronskih mreža putem mobilizacije intracelularnih zaliha Ca²⁺ i povećane produkcije cikličnog adenzin-monofosfata (cAMP) (Chen i sar. 2012).

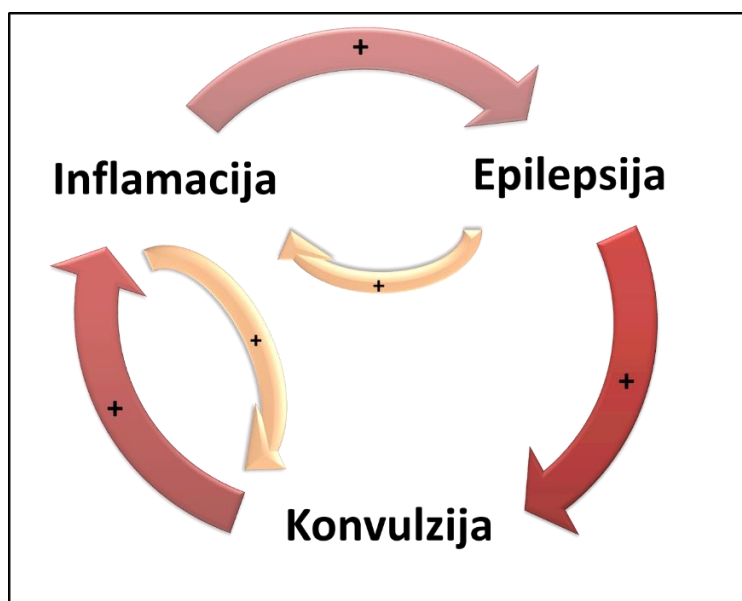
Hemokini, kao specifična porodica signalnih proteina sekretovanih od strane ćelija u cilju hemoatrakcije su potentni faktori hemotakse inflamatornih ćelija do mesta inflamacije (Mélis-Parsadaniantz i Rostène 2008). Klinička istraživanja koja su uključivala obolele sa epilepsijom temporalnog režnja su pokazala povećanu ekspresiju CCL2 (eng. chemokine C-C motif ligand 2) hemokina i njegovog receptora (CCR2) u serumu obolelih. Funkcionalni značaj i molekularni mehanizmi koji leže u osnovi CCL2-CCR2 signalnog puta tokom procesa epileptogeneze su još uvek nerazjašnjeni u potpunosti. Povećana ekspresija CCL2 je dokazana i u eksperimentalnim studijama, gde je dokazano da je maksimalna ekspresija u hipokampusu miševa prisutna 24h

nakon kainskom kiselinom-indukovanih napada. Takođe, pokazano je da povećana aktivacija CCR2 vodi ka povećanoj produkciji IL-1 β koja u krajnjem ishodištu izaziva *status epilepticus* i smrt neuronske ćelijske populacije (Tian i sar. 2017).

U našoj studiji smo se fokusirali na najčešće ispitivane interleukine (IL-1 β i IL-6) u kontekstu epileptogeneze i regulacije ekscitabilnosti neurona, iako to nisu jedini citokini koji su uključeni u regulaciju ovih procesa. Veliki benefit u rasvetljavanju njihove uloge u nastanku hiperekscitabilnosti CNS će imati buduće eksperimentalne studije sa administracijom antagonista IL-1 β i IL-6 ili upotrebom modulatora ekspresije gena za ove citokine.

Takođe, s obzirom da je sinteza i oslobađanje citokina prvi korak u nastanku epileptogeneze koja je posredovana neuroinflamacijom, merenje koncentracije citokina kao markera za ranu detekciju oštećenja neurona, imalo bi veliku kliničku korist u predikciji epileptičnih napada, u planiranju ranih interventnih procedura i u prevenciji nastanka dodatnih neuroloških komplikacija (Youn i sar. 2013).

Klinička i eksperimentalna istraživanja pokazuju da upravo periferna inflamacija narušava balans između ekscitacije i inhibicije u CNS-u i indukuje epileptogenezu, te je veza između konvulzivnih napada, inflamacije i epilepsije uzajamna (Majores i sar. 2004, Ravizza i sar. 2008, Godukhin i sar. 2009, Aronica i Crino 2011, Janigro i sar. 2013). Ova tri činioca generišu začarani krug (pozitivnu povratnu spregu, *circulus vitiosus*), gde jedan proces sledi iz prethodnog (Slika 5.2.), što objašnjava činjenicu da ljudi koji boluju od epilepsije istovremeno češće razvijaju i zapaljenske bolesti (Tellez-Zenteno i sar. 2005).



Slika 5.2. Međusobni odnos inflamacije, epilepsije i konvulzivnih napada

Neuroinflamacija i periferna inflamacija bi mogli biti etiopatogenetski supstrati u procesu epileptogeneze i nastanku epilepsije kao hroničnog neurološkog poremećaja koji se manifestuje ponovljenim konvulzivnim napadima. Sa druge strane, postojanje inflamacije može narušiti ekscitacijsko/inhibicijski balans u CNS i biti provocirajući faktor izolovanih konvulzija. Izolovani konvulzivni napadi mogu biti okidač za otpočinjanje neuroinflamatornog procesa u CNS. Dakle ovi na izgled nezavisni procesi su međusobno povezani i to po principu pozitivne povratne sprege. Modifikovano prema: Hrcic i sar. 2018 i rezultatima našeg istraživanja.

Brojna patološka stanja CNS se odlikuju neuroinflamacijom u svojoj osnovi, ili je ona posledica tog patološkog procesa. Sa druge strane, sam epileptički fenomen izaziva inflamatorni odgovor unutar CNS (Vezzani i Granata 2005).

CNS nije imunoprivilegovano područje, te se proces epileptogeneze ne posmatra samo kroz poremećaj neuronske mreže. Naime, patogeneza epilepsija podrazumeva poremećaj i ne-neuronskih struktura, kao što su glija ćelije, endotelne ćelije i narušavanje KMB (Xu i sar. 2013). Imunski odgovor inicira i propagira epilepsije (Vezzani i Granata 2005, Vezzani i Baram 2007, Choi i sar. 2009), te neuroinflamacija povećava ekscitabilnost neurona jer menja permeabilnost jonskih kanala na neuronima, moduliše egzocitozu i ponovno preuzimanje neurotransmitera i propustljivost KMB. Sve to snižava prag za nastanak epileptičnog pražnjenja (Viviani i sar. 2007, Wetherill i sar. 2007, Friedman 2010). Periferna inflamacija je povezana sa groznicom koja nastaje usled centralnih mehanizama, redukovanom lokomotornom aktivnošću, kao i poremećajem ravnoteže u CNS (Simard i Rivest 2005). Konvulzivni napadi, ali i drugi neurološki i psihijatrijski poremećaji, mogu biti pogoršani perifernom inflamacijom (Riazi i sar. 2010, Vezzani i sar. 2013).

U eksperimentalnim modelima periferne inflamacije (Sayyah i sar. 2003, Yuhas i sar. 2005, Rao i sar. 2008) je pokazano da periferna inflamacija dovodi do smanjenja praga za nastanak epileptičnih pražnjenja. Iako dosadašnja istraživanja nisu rasvetlila tačan mehanizam kojim periferna inflamacija deluje na CNS, pretpostavlja se učesće različitih citokina (Rao i sar. 2008), endogenih opioda (Riazi i sar. 2004), prostaglandina (Sayyah i sar. 2003), kao i signalnih puteva posredovanih NO (Yuhas i sar. 2005). Prema našim prethodnim istraživanjima, gasotransmisija posredovana NO značajan je mehanizam u inicijaciji i propagaciji epileptogeneze (Hrnčić i sar. 2011).

Periferna inflamacija je praćena povećanom produkcijom proinflamatornih citokina koji aktiviraju glija ćelije i posledično indukuju neuroinflamaciju (Murta i sar. 2015). Takođe, u nastanku neuroinflamacije i oksidativnog stresa, koji redukuju prag depolarizacije i deluju prokonvulzivno se ističe uloga COX-2 (Wu i Wolfe 2012). Koncentracija ovog enzima u serumu se tokom konvulzivnih napada izrazito povećava (Rojas i sar. 2014), a posebno u hipokampusu (Takei i sar. 2012) koji je značajno ishodišno mesto pri generaciji konvulzivnog napada. Ho i sar. (2015) su pokazali da intracerebralna aplikacija COX-2 inhibitora dovodi do smanjenja broja epileptičkih napada u eksperimentalno izazvanoj perifernoj inflamaciji.

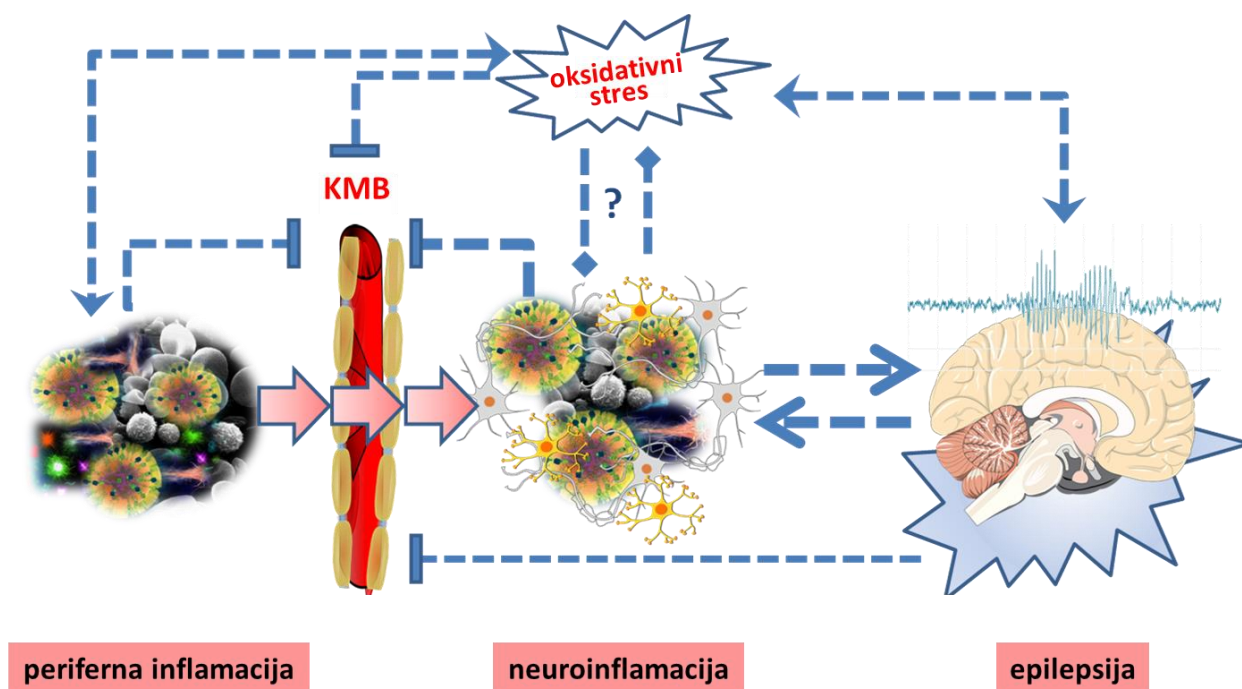
Rezultati ovog istraživanja su demonstrirali da kod životinja sa CP/CPSS postoji povećanje MDA kao parametra oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu, dok su enzimi antioksidativne zaštite (SOD i GPx), kao i koncentracija P-SH pokazivali snižene vrednosti u ovim strukturama.

Oksidativni stres ispoljava brojna štetna dejstva na sve organske sisteme, a posebno na CNS (Méndez-Armenta i sar. 2014, Puttachary i sar. 2015). Kliničke studije su dokazale da u krvi i hirurški uklonjenom tkivu mozga pacijenata sa epilepsijom postoji povišen nivo markera oksidativnog stresa (lipidna peroksidacija, aktivacija NADPH oksidaze), dok je nivo antioksidanata nizak (Sudha i sar. 2001, Pecorelli i sar. 2015). Smanjen kapacitet CNS za borbu protiv oksidativnog stresa dovodi do povećanja intenziteta eksperimentalnih pentilentetrazolom i kainskom kiselinom-izazvanih konvulzija (Warner i sar. 2015). Prethodna ispitivanja su pokazala da je lipidna peroksidacija uključena u etiopatogenezu nastanka eksperimentalnih lindanom-izazvanih konvulzija (Mladenović i sar. 2010). Međutim, tačan mehanizam dejstva oksidativnog stresa na podložnost nastanku konvulzija izazvanih lindanom u ovom modelu bolesti tek treba da bude istražen u perspektivi.

Tkivna oštećenja CNS koja nastaju kao posledica oksidativnog stresa koji je posledica epileptičkih pražnjenja, mogu biti suprimirana tretmanom antioksidantima, kao što su vitamin E (Ambrogini i sar. 2014) i vitamin C (Tomé i sar. 2010). Takođe, prethodno sprovedene studije su pokazale da pojačanje antioksidativnih mehanizama odbrane u organizmu nakon fizičke aktivnosti dovodi do smanjenja podložnosti životinja za nastanak epileptičnih napada izazvanih homocisteinom (Hrcic i sar. 2013).

Veliki je broj pretpostavljenih mehanizama kojima oksidativni stres može dovesti do neuroinflamacije i epileptogeneze, a najčešće se razmatraju: aktivacija ne-neuronske populacije ćelija (glija ćelije i endotel), stimulacija produkcije proinflamatornih citokina (IL-1 β i TNF- α) i prostaglandina, uz povećanu aktivnost enzima COX-2 (Vezzani i Granata 2005). IL-1 β i COX2-posredovani signalni putevi se odnose na povećanu aktivaciju NMDA receptora u krajnjem ishodištu (Liu i sar. 2013). Takođe, jedan od mehanizama prokonvulzivnog dejstva oksidativnog stresa može biti i indukcija oštećenja KMB (Riazi i sar. 2010, Xu i sar. 2013).

Može se zaključiti da su u patogenezi epilepsija uključeni i neuroinflamacija i oksidativni stres i da postoji određena povezanost ova dva faktora. Međutim, nejasno je da li neuroinflamacija isključivo putem oksidativnog stresa dovodi do generisanja epileptičnog pražnjenja u mozgu, kao i to da li je oksidativni stres posledica neuroinflamacije koja je nastala dejstvom nekog trećeg faktora, ili je oksidativni stres okidač nastanka neuroinflamatornog procesa u CNS (Slika 5.3.).



Slika 5.3. Međusobni odnos epilepsije, periferne inflamacije, neuroinflamacije i oksidativnog stresa

Periferni inflamatorni proces, nakon svoje generalizacije i ekstenzije u CNS kroz narušenu krvno-moždanu barijeru (KMB) dovodi do indukcije neuroinflamacije koja rezultuje nastankom epilepsije. Epilepsija, praćena ponavljanim konvulzijama, dodatno kompromituje KMB i pojačava neuroinflamaciju i oksidativni stres u strukturama CNS. Oksidativni stres i neuroinflamacija zajedno participiraju u epileptogenezi kao i u etiopatogenezi izolovanih konvulzija. Ipak, njihov međusobni odnos nije jasno definisan (označeno znakom pitanja (?)). Oksidativni stres, izazvan bilo kojim činiocem, rezultuje u nastanku neuroinflamacije, a neuroinflamatorni proces dodatno pojačava oksidativni stres unutar CNS. Strelice označavaju pozitivni efekat, dok linija (I) označava negativni efekat. Modifikovano prema: Hrcic i sar. 2018.

Dakle, jasno je da neuroinflamacija sa specifičnim odnosom prema oksidativnom stresu prati epileptogenezu kao posledicu ili uzrok ovog procesa. Oksidativni stres indukuje redukciju praga za sinhronizovanu ekscitabilnost neurona i remeti kompetentnost KMB, te je opravdano pretpostaviti da terapijski tretman oksidativnog stresa u CNS može imati pozitivna dejstva, smanjujući broj epileptičnih napada, što se nameće kao imperativ za buduća istraživanja novih terapijskih modaliteta (Borowicz-Reutt i Czuczwar 2020).

Fiziološko funkcionisanje glija ćelija obezbeđuje homeostazu CNS, te bilo kakav poremećaj u njihovom broju ili funkciji može biti direktan okidač za nastanak epileptogeneze i epileptičnih napada (Wetherington i sar. 2008). Glija ćelije participiraju u nastanku hiperekscitabilnosti neurona kroz inflamatorne i neinflamatorne procese (Devinsky i sar. 2013).

Astroцити su glavni činioci u neinflamatornom putu hiperekscitabilnosti posredovanoj glija ćelijama. Strukturne i biohemijske alteracija astrocita koje dovode do promene ekscitabilnosti su smanjena ekspresija jonskih kanala za K^+ na ćelijskoj membrani astrocita (Lee i sar. 2012) i smanjen broj intercelularnih tesnih veza (Haj-Yasein i sar. 2011). Posledično, dolazi do nastanka: niske ekstracelularne koncentracije K^+ ; disfunkcije akvaporinskih kanala koja dovodi do smanjenog transporta vode u ekstracelularni prostor (Pecorelli i sar. 2015); smanjenja ekspresije specifičnih transportera i porasta ekstracelularne koncentracije glutamata (David i sar. 2009); promene u aktivnosti adenozin kinaze (Boison 2012); kao i povećanja broja metabotropnih receptora za glutamat. Posledica je prevaga ekscitatorne neurotransmisije posredovane glutatom, D-serinom i ATP nad inhibitornom neurotransmisijom posredovanom GABA (Benedetti i sar. 2011, Eid i sar. 2012).

Inflamatorni mehanizmi hiperekscitabilnosti posredovane glija ćelijama na prvom mestu podrazumevaju povećano oslobađanje proinflamatornih citokina od strane glija ćelija i promociju aktivnosti signalnih puteva koji vode ka povećanoj transkripciji DNK za gene citokina (Vezzani i sar. 2011). Alteracija u koncentraciji citokina ima jasnu posledicu: smanjenje praga za nastanak konvulzija. Promena citokinske ekspresije posledično pojačava influks Ca^{2+} u astroците i smanjuje ponovno preuzimanje glutamata, te on ostaje dugotrajno povišen u ekstracelularnom prostoru (Hu i sar. 2000). Citokini su sposobni da promene stepen ekspresije transportnih proteina za lekove u endotelnim ćelijama i pericitima, te je to razlog smanjene koncentracije antiepileptičnih lekova u CNS koja je svakako uzrok loše medikamentozne kontrole epileptičnih napada (Aronica i sar. 2003, Löscher i Potschka 2005b).

Dakle, iako su jedino neuroni ekscitabilne ćelije koje mogu stvarati promene membranskog potencijala u vidu akcionih potencijala, sve veći broj podataka iz *in vivo* i *in vitro* istraživanja ukazuje na to da je ekscitabilnost neurona strogo kontrolisana od strane glija ćelija. Glija ćelije mogu biti uzrok inicijacije, razvoja i uspostavljanja procesa epileptogeneze u situacijama kada je narušena njihova funkcija. Iako je uloga glija ćelija u neuroinflamaciji i ekscitaciji tradicionalno posmatrana kroz nezavisne procese, noviji rezultati ukazuju na opsežno preklapanje ovih procesa jer neuroinflamacija može rezultovati ekscitacijom, ali i ekscitacija neurona može otpočeti neuroinflamaciju (Lanerolle i sar. 2010).

Zaključujemo da razumevanje uloge glija ćelija može pružiti brojne odgovore na nerazjašnjenih pitanja o epilepsiji, uključujući i ona koja se odnose na epileptogenezu i loš terapijski odgovor pacijenata sa refraktarnim napadima, pa sve do postavljanja neuroinflamacije u fokus epileptogeneze, a sve u cilju razvoja boljih terapijskih strategija koje će isplivati iz konvergencije činjenica o neuronima, glija ćelijama, ekscitaciji i inflamaciji (Devinsky i sar. 2013).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da kod pacova sa eksperimentalno izazvanim CP/CPPS u talamusu i moždanom korteksu postoji povećana ekspresija proteina ICAM-1, u odnosu na kontrolne životinje.

KMB predstavlja fizičku i metaboličku barijeru između krvi i nervnog tkiva koja omogućava selektivni prolaz supstanci u i iz CNS do krvi, ali čak i aktivnu eliminaciju lipofilnih potencijalnih neurotoksina posredstvom aktivnih transportnih mehanizama (KMB efluks transporteri) (Löscher i Potschka 2005a). Najznačajniji ćelijski modulatori permeabilnosti KMB su upravo astrociti (Obermeier i sar. 2013), te je neophodno razmotriti njihovu ulogu u regulaciji mikrovaskularnih struktura KMB. Stopalasti produžeci astrocita su najbitniji regulatori permeabilnosti endotelnih ćelija u kapilarima mozga usled sposobnosti da modulišu TJ posredstvom molekula koje sekretuju, a takođe su i glavni regulatori razmene vode i materija između krvne plazme i ekstracelularnog prostora u moždanom parenhimu (Ballabh i sar. 2004). Patohistološka analiza uklonjenog tkiva mozga kod operativno lečenih pacijenata sa refraktarnom epilepsijom temporalnog režnja je pokazala da postoji intenzivna proliferacija krvnih sudova i alteracija strukture stopalastih produžetaka astrocita koji pozitivno koreliraju sa frekvencijom i intenzitetom konvulzivnih napada (Rigau i sar. 2007). Takođe, u eksperimentalnim modelima epilepsija je pokazano da su astrociti izvor VEGF i ICAM-1 koji su činioca u nastanku disrupcije KMB i mikrovaskularne proliferacije (angiogeneze) (Lee i sar. 2000). Proinflamatorni citokini i hemokini mogu direktno putem svojih receptora na endotelu da primene permeabilnost KMB, ili indirektno da indukuju transmigraciju leukocita u perivaskularni prostor, te će u tom slučaju oni dalje orkestrirati ovim patološkim procesom (Fabene i sar. 2008). Ekstravazacija albumina u perivaskularni prostor dodatno narušava jonski sastav u tkivu te doprinosi nastanku hiperekscitabilnosti (Takata i sar. 2021).

Skorašnja studija Johnsona i saradnika (2018) jasno demonstrira ulogu KMB efluks transportera u prevenciji nastanka konvulzija, s obzirom da štite CNS od potencijalnih neurotoksina, ali regulišu i distribuciju i farmakokinetiku medikamenata (Löscher i Potschka 2005a). Pokazano je da inhibicija ovih transportera vodi ka disrupciji TJ, edemu mozga, i porastu ekspresije TNF- α , što stvara začarani krug epileptogenetskog procesa. Protektivna uloga ovih transportera se ogleda u njihovoj povećanoj ekspresiji na endotelnim ćelijama u slučaju povišenih koncentracija ekscitatornog i potencijalno ekscitotoksičnog neurotransmitera glutamata (Johnson i sar. 2018). U reseciranom moždanom tkivu hirurški lečenih osoba sa refraktarnom epilepsijom, kao znak odbrambenih adaptivnih procesa, nađena je povećana ekspresija efluks transportera. Njihova uloga u regulaciji distribucije lekova u CNS je dvojna, jer u slučaju visokih koncentracija lekova koji imaju neurotoksično dejstvo, ovi transporteri sprečavaju njihov prodor u CNS, dok sa druge strane u pojedinim slučajevima mogu da smanje centralnu distribuciju lekova i da budu uzrok farmakorezistencije konvulzivnih napada (Löscher 2005).

Na osnovu iznetih činjenica koje naglašavaju bitne patofiziološke interakcije između glija ćelija, mikrovaskulature mozga i ekscitabilnosti neurona, zaključuje se da bi razvoj strategija za stabilizaciju KMB bio vrlo potentan metod u tretmanu pacijenata sa epilepsijom.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da pacovi sa eksperimentalno indukovanim CP/CPPS ispoljavaju ponašanje povezano sa anksioznošću u većoj meri, u poređenju sa korespondentnim lažno operisanim kontrolama. Korelaciona analiza je pokazala da su ove promene ponašanja najviše bile povezane sa povećanjem markera oksidativnog stresa i smanjenim mehanizmima antioksidativne zaštite u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu, kao i povećanom koncentracijom kortikosterona u serumu i smanjenjem broja PV+ interneurona u hipokampusu.

Nakon indukcije eksperimentalnog CP/CPPS, ispitivali smo postojanje ponašanja povezanog sa anksioznošću tokom jedne nedelje (vremenske tačke: 2., 3. i 7. postoperativni dan) upotrebom standardne baterije 3 etološka testa (OF, EPM, L/D). Rezultati ovih bihevioralnih ispitivanja su kod pacova sa CP/CPPS pokazali postojanje ponašanja povezanog sa anksioznošću 3. i 7. postoperativnog dana nakon intraprostatične injekcije λ -karagenina, dok su obrasci ponašanja bili nepromenjeni drugog dana nakon operacije. Ponašanje povezano sa anksioznošću kod CP/CPPS pacova, u odnosu na Sham kontrole, upotrebom OF testa, je dokazano promenama sledećih varijabli: smanjena distanca ambulatornog kretanje 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. Ovi specifični bihevioralni obrasci predstavljeni navedenim varijablama, široko su prihvaćeni indikatori ponašanja povezanog sa anksioznošću kod eksperimentalnih životinja (Prut i Belzung 2003).

Takođe, preostala dva testa iz ove baterije su pokazala kongruentne rezultate. Naime, tokom EPM testa smo u 3. i 7. postoperativnom danu opservirali da su CP/CPPS životinje, u odnosu na Sham životinje, provele manje vremena u otvorenim kracima EPM, a takođe i napravile manji broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta. EMP test se takođe ekstenzivno koristi za utvrđivanje ponašanja povezanog sa anksioznošću (Albani i sar. 2015), a s obzirom da je baziran na odnosu ponašanja povezanog sa istraživanjem i izbegavanjem, visokog je translacionog potencijala na humanu populaciju (Biedermann i sar. 2017). Tokom L/D testa, manje vremena provedenog u svetlom kompartmanu i smanjen broj tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana su zabeleženi kod CP/CPPS životinja u istim vremenskim tačkama, kao i u preostala dva etološka testa. L/D test je široko korišćen i prihvaćen u literaturi u bezuslovnom ponašanju povezanom sa anksioznošću kod glodara, a takođe je baziran na konfliktu između eksploracije nove sredine i averzije prema svetlim i nezaštićenim područjima (Arrant i sar. 2013).

Naši rezultati u saglasnosti sa kliničkim studijama koje su ukazale na postojanje veze između CP/CPPS i anksioznosti u smislu veće prevalencije anksioznosti među muškarcima obolelim od CP/CPPS, u odnosu na zdrave kontrole (Pontari i sar. 2005, Clemens i sar. 2007). Dakle, mi smo u našoj studiji potvrdili hipotezu da je eksperimentalni CP/CPPS praćen ponašanjem povezanim sa anksioznošću, kao jednim od psihijatrijskih komorbiditeta i otvorili vrata ka ispitivanju potencijalnih mehanizama koji leže u njihovoj povezanosti u eksperimentalnim uslovima.

Među potencijalnim mehanizmima udruženosti anksioznosti sa osnovnim simptomima CP/CPPS se izdvaja disfunkcija HPA osovine usled hroničnog stresa kome su ovi pacijenti izloženi (Anderson i sar. 2009). Postojanje bolnih senzacija samo po sebi je dovoljan faktor za regrutovanje i aktivaciju HPA osovine, povišenu sintezu kortizola, što je takođe i dokazano u animalnim studijama (Rhudy 2009). Studije koje su pokazale da pacijenti sa paničnim poremećajem, koji ima sličnu osnovu kao anksiozni poremećaj i koji se vrlo često razvija udruženo sa anksioznošću, češće oboljevaju od intersticijskog cistitisa i sindroma bolne mokraćne bešike koji ima istu osnovu kao CP/CPPS, sugerišu da je razvoj anksioznosti možda posledica genetske predispozicije (Weissman i sar. 2004). Objašnjenje leži u anatomskoj predispoziciji za razvoj ovih poremećaja koji se ogleda u genetskoj podložnosti za razvoj promena u Baringtonovom jedru ponsa koji predstavlja supraspinalni centar mikcije i kontrole visceralnih simptoma, ali utiče i na mentalne aktivnosti prozencefalona (Blok 2002).

Da u procesu razvoja anksioznosti kod obolelih od CP/CPPS učestvuju strukturne i funkcionalne promene CNS usled dejstva brojnih citokina (Silva i sar. 2017), može se naslutiti na osnovu etiopatogeneze ovog sindroma koja podrazumeva neinfektivnu prirodu bolesti u kojoj štetna noksa izaziva zapaljenje prostate, ali se proces propagira putem povrede nerava

kroz procese neurogene inflamacije i periferne i centralne senzitivacije (Krieger i sar. 2003). Jasno je da ovi procesi remodelovanja unutar CNS zahvataju i strukture čija promena vodi ka nastanku anksioznosti (Schlereth i sar. 2015). Hipoteza o ulozi oksidativnog stresa u razvoju anksioznosti se može postaviti na osnovu činjenice da je inflamacija prostate praćena povećanom koncentracijom ROS u tkivu prostate (Roumeguère i sar. 2017), kao i izvan njega (Ihsan i sar. 2018), ali tačan mehanizam kojim ROS mogu dovesti do razvoja anksioznosti nije dovoljno ispitan u animalnim studijama (Pasqualotto i sar. 2000).

Rezultati naše studije su pokazali da su životinje sa eksperimentalnim CP/CPPS imale značajno povišene vrednosti MDA, indikatora lipidne peroksidacije, u svim ispitivanim moždanim strukturama (hipokampus, talamus i cerebralni korteks).

Ova činjenica je dokaz većeg oksidativnog oštećenja u mozgu pacova sa prostatitisom u odnosu na Sham pacove. Obim lipidne peroksidacije u ovim strukturama mozga je bio skoro uniforman, te je ova činjenica indikator povećanog oksidativnog stresa. Tkivo mozga je veoma podložno oštećenju prouzrokovanom oksidativnim stresom, s obzirom da zbog visokih metaboličkih potreba tkivo mozga stvara veću količinu slobodnih radikala po gramu tkiva nego bilo koji drugi organ, da sadrži visok nivo polinezasićenih masnih kiselina, poseduje visok stepen potrošnje kiseonika i nizak antioksidativni kapacitet (Hovatta i sar. 2010). Enzimi antioksidativne zaštite, SOD i GPx, kao i neenzimske antioksidativne materije, poput proteinskih tiol grupa (P-SH), spadaju u najsnažnije mehanizme zaštite mozga od velike pretnje koju po njega predstavlja oksidativni stres (Kohen i Nyska 2002). Sa druge strane, u našoj studiji smo pokazali da postoji značajno snižena aktivnost enzima SOD i koncentracija P-SH u svim ispitivanim strukturama mozga kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS, što sugerise gubitak mehanizama odbrane od ROS i definitivnu potvrdu postojanja visoke podložnosti za nastanak oksidativnog stresa u tkivu mozga. Ipak, CP/CPPS životinje su, u poređenju sa Sham kontrolama, imale povećanu aktivnost enzima GPx u talamusu i cerebralnom korteksu, ali ne i u hipokampusu. Moguće je da povećana produkcija ROS dovodi do pokretanja kompenzatornih antioksidativnih mehanizama ali da oni ipak nisu dovoljni da prevagnu.

Oksidativni stres učestvuje u inflamatornoj kaskadi razvoja hroničnog prostatitisa (Polackwich i Shoskes 2016, Ihsan i sar. 2018). U slučaju postojanja bilo kog patološkog stanja u maloj karlici koje je praćeno hroničnim bolom, velika količina stvorenih ROS se iz patološkog žarišta oslobađa u cirkulaciju (Dröge 2002, Wang i sar. 2004). Šta više, pokazano je da ekstenzivni inflamatorni proces u hroničnom prostatitisu dovodi do destrukcije stromalnih i epitelnih ćelija (De Marzo i sar. 2007), što je praćeno oslobađanjem ROS koji su potentni modifikatori strukture i funkcije proteina i mutageni jer oštećuju DNK (Olinski i sar. 2002). Produkti lipidne peroksidacije, kao što su MDA i nezasićeni aldehidi, oštećuju brojne celularne proteine.

Mehanizmi anksioznosti su vrlo kompleksni i demonstriraju uključenost različitih struktura mozga i neuronskih krugova u nastanku anksioznosti, a takođe i amigdalo-talamo-kortikalnu interakciju. Veruje se da su kortikalni regioni posebno uključeni u nastanku anksioznosti prema određenim modelima (Milad i Rauch 2007). Upravo oksidativni stres u moždanim strukturama poput cerebralnog korteksa može biti ključni faktor u vulnerabilnosti ka nastanku anksioznog poremećaja (Ercan i sar. 2017). U poslednjih nekoliko godina je više animalnih studija potvrdilo da oksidativnim stresom izazvano oštećenje lipida, proteina i DNK uz smanjene mehanizme antioksidativne zaštite može biti ključni faktor alteracija ponašanja koje smo opservirali i u našoj studiji (Fedoce i sar. 2018). Akumulacija oksidativnog stresa oštećuje integritet i funkciju neurona, te aktivno učestvuje u patogenezi anksioznosti (Smaga i sar. 2015). Takođe, u jednoj studiji je pokazana direktna korelacija između stepena sniženja aktivnosti SOD i izraženosti simptoma anksioznosti (Rammal i sar. 2008). Rezultati naših ispitivanja su pokazali da je stepen izraženosti ponašanja povezanog sa anksioznošću visoko korelirao sa povećanjem

lipidne peroksidacije u cerebralnom korteksu i hipokampusu pacova sa CP/CPPS. Ne tako davno, Bouayed i Soulimani (2019) su izneli direktne dokaze da H₂O₂ indukuje visok stepen ponašanja povezanog sa anksioznošću kod životinja. Dodatni mehanicistički aspekti povezanosti oksidativnog stresa i anksioznosti su široko istraženi i prodiskutovani u literaturi (Hassan i sar. 2014, Fedoce i sar. 2018). Dakle, rezultati naših istraživanja potvrđuju hipotezu da oksidativni stres u strukturama mozga može biti jedan od vodećih etiopatogenetskih činilaca u nastanku ponašanja povezanog sa anksioznošću koje smo demonstrirali našim rezultatima.

CP/CPPS je praćen hroničnim bolom kao glavnim simptomom koji smo u našoj studiji i opservirali kao smanjenje praga bola na mehaničku draž kod pacova sa CP/CPPS. Stres, kao posledica hroničnog bola, vrlo intenzivno pobuđuje mehanizme adaptacije u cilju održavanja homeostaze (Abdallah i Geha 2017). Sa druge strane, stres kao posledica hroničnog bola, ili kao primarni nezavisni faktor može sam po sebi biti dominantni uzročni faktor povezanosti CP/CPPS i anksioznosti (Chung i Lin 2013). Određene studije su pokazale da je visok nivo stresnih stimulusa uz manjak socijalne podrške često prisutan kod pacijenata sa postojanjem tegoba povezanih sa prostatitisom (Wallner i sar. 2009).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali povišene koncentracije kortikosterona u serumu kod pacova sa CP/CPPS, u odnosu na kontrolne Sham životinje, koje su korelirale sa stepenom ponašanja povezanog sa anksioznošću. Ovi rezultati govore u prilog poremećaju HPA osovine u ovom sindromu, koja je regrutovana u borbi protiv stresnih stimulusa ili inflamacije kod životinja sa prostatitisom. Kortikosteron prolazi KMB i narušava fiziološke funkcije neurona i glija ćelija izazivajući promene u određenim regionima mozga, kao što su prefrontalni korteks, amigdala, hipokampus, *nc. accumbens* i hipotalamus (McEwen 2010). Njegovo specifično dejstvo u CNS je regulacija automatskih komponenti osovine stresa, uz regrutovanje HPA osovine i dejstvo na centralno jedno amigdale (Greenwood-Van Meerveld i Johnson 2018).

Takođe, kada se kortikosteron veže direktno za neurone amigdaloidnih jedara, nastaje aktivacija stresne osovine i povećano oslobađanje CRH (Mitra i Sapolsky 2008). Dakle, limbički mozak i HPA osovina kreiraju jednu međusobno visoko povezanu petlju sa projekcijama iz hipokampusa, amigdale i prefrontalnog korteksa prema hipotalamusu koji je raskrsnica ova dva sistema i odgovoran je za glukokortikoidni odgovor na stres i modulaciju autonomnog nervnog sistema (Lupien i sar. 2009). Rezultat aktivacije ove petlje je nastanak dugotrajnog poremećaja po tipu ponašanja povezanog sa anksioznošću (Vyas i sar. 2002). Skorašnja studija Bergaminija i sar. (2014) je demonstrirala da hipersenzitivnost u postojanju perifernog bolnog procesa pojačava anksioznost putem povećanja koncentracije kortikosterona u serumu.

Šta više, smanjenje aktivnosti enzima SOD u analiziranim moždanim strukturama može čak biti posledica povišenih koncentracija kortikosterona u odgovoru na bol kao stresni stimulus (Zafir i Banu 2009.). Naime, jedna ranija studija je pokazala da *in vitro* inkubacija kortikalnih i hipokampalnih ćelija sa glukokortikoidima rezultuje u povećanoj akumulaciji ROS u ovim ćelijskim kulturama i posledičnom oksidativnom stresu (Behl i sar. 1997, Ejchel-Cohen i sar. 2006). U našem istraživanju smo pokazali pozitivnu korelaciju između koncentracije kortikosterona u serumu i koncentracije MDA u hipokampusu, talamusu i cerebralnom korteksu.

Smatra se da kortikosteron posredstvom Nrf2 signalnog puta povećava nivo raspoložive intracelularne glukoze, te promoviše spontanu generaciju ROS, a takođe i transkripciju prooksidativnih gena i smanjuje nivo antioksidativnih mehanizama odbrane (Ki i sar. 2005). Takođe, ekscesivna produkcija ROS vodi ka disregulaciji inflamatornog odgovora i degradaciji inhibitora NF-κB (Solleiro-Villavicencio i Rivas-Arancibia 2018). Stoga, naši rezultati potvrđuju hipotezu da aktivacija HPA osovine i povećana sinteza kortikosterona mogu biti još jedan medijator u opserviranoj povezanosti između CP/CPPS i ponašanja povezanog sa anksioznošću.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da kod pacova sa eksperimentalnim CP/CPPS, u odnosu na Sham kontrole, postoji smanjenje broja PV+ interneurona u CA1, CA2/3 regionima i 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 OF, EPM i L/D etološkim testovima. Imajući u vidu da su svi ovi testovi bazirani na konfliktu između straha od eksploracije potencijalno opasnog novog prostora i potencijalne nagrade (Bannerman i sar. 2014), sasvim je lako zaključiti da narušena interneuronska mreža sastavljena od hipokampalnih PV+ interneurona indukuje ponašanje povezano sa anksioznošću, što smo i dokazali korelacionom analizom u našem istraživanju.

Hipokampalni PV+ inhibitorni neuroni pripadaju predominantno klasi kotarastih interneurona (Czeh i sar. 2005) i zaduženi su za kontrolu kognitivnih funkcija, cirkadijalnog ritma i bihevioralnih obrazaca, uključujući i anksioznost, socijalnu interakciju i strah (Rankov Petrovic i sar. 2019). Ovi interneuroni obezbeđuju inhibitorne signale u cerebralnom korteksu i hipokampusu putem dejstva na neuronska kola koja su zadužena za stvaranje ili gašenje memorije povezane sa strahom (Çalışkan i sar. 2016). Najveći supresivni efekat hipokampalnih PV+ interneurona na neuronske krugove u CA1, CA2/3 regionima i DG hipokampusu se ostvaruje putem GABAergičke neurotransmisije (Zou i sar. 2016).

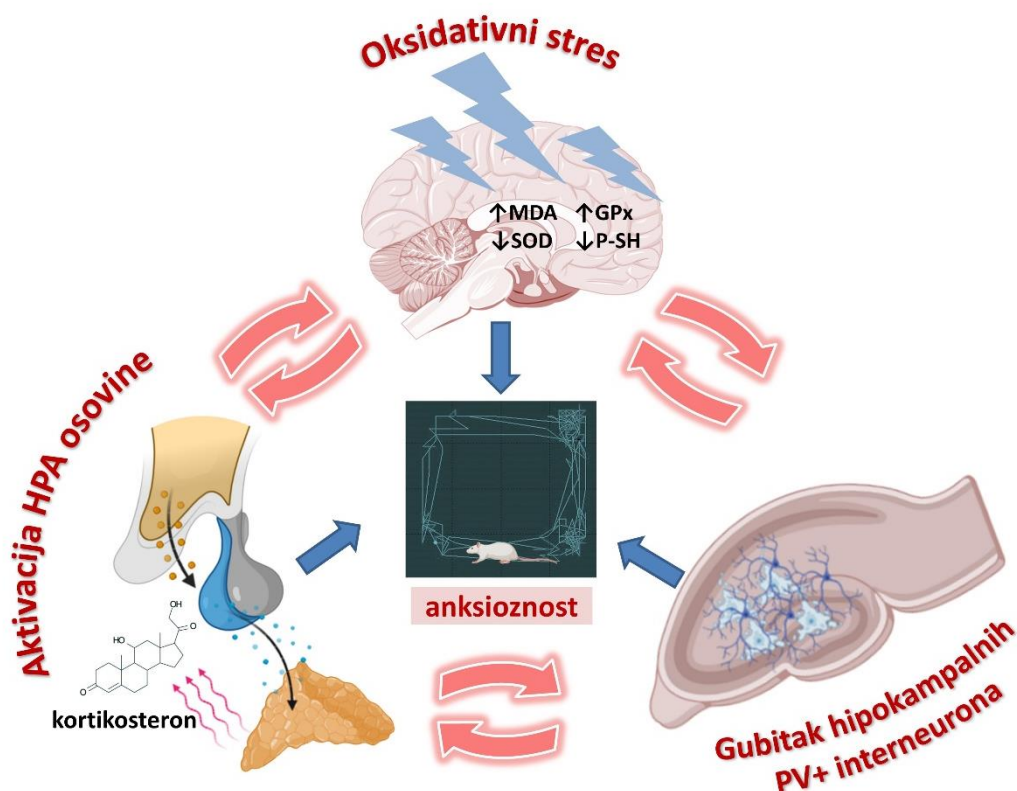
Veliki broj studija je sugerisao da hipokampus i poremećaji neuronskih krugova u njemu imaju značajan uticaj na inicijaciju i promociju nastanka ponašanja povezanog sa anksioznošću (Wang i sar. 2018c, Rankov Petrovic i sar. 2019, Rytova i sar. 2019). Naime, hipokampalni neuronski krugovi su glavni centar ovog komparativnog sistema (Bannerman i sar. 2014), a anatomski su organizovani po principu stereotipnog tri-sinaptičkog kruga (Stahnisch i Nitsch 2002). Ulazni signali koji potiču iz entorinalnog korteksa i donose kontekstualnu i spacijalnu informaciju, sinapsiraju u hipokampusu sa neuronima granularnog sloja DG i piramidalnim neuronima CA3, a zatim se ovi neuroni projektuju do piramidalnih neurona regiona CA2 i CA1, koji potom stvaraju neuronske projekcije izvan hipokampusu (Jimenez i sar. 2020). Međusobno dobro povezani recipročni neuronski krugovi, sastavljeni od projekcija izvan hipokampusu, amigdale, medijalnog prefrontalnog korteksa, hipotalamusa i jedra *stria terminalis* (Calhoon i Tye 2015), mogu da izazovu ponašanje povezano sa anksioznošću putem direktnih izlaznih projekcija ka periakveduktalnoj sivoj masi i parabrahijalnim jedrima (Duval i sar. 2015).

Veliki je broj potencijalnih mehanizama koji bi mogli objasniti uzrok nastanka alteracija u hipokampalnoj neuroplastičnosti kod CP/CPPS pacova. Narušen oksidativni status u mozgu je često povezivan sa brojnim imunohistohemijskim promenama u hipokampusu (Harkness i sar. 2019). Naime, disbalans oksidativne ravnoteže narušava glutaminičnu i dopaminičnu neurotransmisiju i imunske procese u mozgu, a dodatno, direktnim putem, ROS mogu da naruše različite puteve signalizacije (Steullet i sar. 2017). Takođe, promena u aktivnosti enzima NADPH oksigenaza 2 se često povezuje sa gubitkom PV+ interneurona (Rossetti i sar. 2018). Uz to, kortikosteron bi isto mogao biti potencijalni medijator u smanjenju ove interneuronske populacije, s obzirom na činjenicu da izlaganje hroničnom stresu i regrutovanje HPA osovine koje se manifestuje porastom koncentracije kortikosterona u serumu može dovesti do retrakcije dendritske mreže i bez smrti ćelija (Conrad 2008). Hipokampus pojačava negativnu povratnu spregu u osovini HPA, tako što potpomaže suprimiranje produkcije CRH u hipotalamusu (Bornstein i sar. 2008). Gubitak hipokampalne regulacije ove negativne povratne sprege doprinosi većem regrutovanju HPA osovine koje se manifestuje većim porastom koncentracije kortikosterona u serumu, koji za uzvrat narušava integritet PV+ interneurona.

Dakle, gubitak hipokampalnih PV+ interneurona može biti odgovoran za hiperaktivnost HPA osovine po principu pozitivne povratne sprege (Godavarthi i sar. 2012), čineći CP/CPPS životinje vulnerabilnijim u nastanku hroničnim stresom-indukovanog ponašanja povezanog sa

anksioznošću. Šta više, hronični bol, direktnim mehanizmima utiče na neprilagođene adaptivne promene hipokampusa u smislu smanjenja dendritskog stabla hipokampalnih neurona uz smanjenje broja PV+ interneurona (Tajerian i sar. 2018). Na taj način, rezultati naših ispitivanja su jasno pokazali da je smanjenje broja hipokampalnih PV+ interneurona kod CP/CPPS pacova povezano sa nastankom ponašanja povezanog sa anksioznošću (Slika 5.4.).

Anksioznost predstavlja patološki odgovor na stimulus koji signalizira postojanje potencijalne opasnosti (Gray i MacNaughton 2003), što je i osnova etoloških testova za utvrđivanje postojanja ponašanja povezanog sa anksioznošću kod laboratorijskih životinja. Naša studija je pokazala pozitivnu korelaciju među parametrima tri različita etološka testa, te je jasno dokazano postojanje ponašanja povezanog sa anksioznošću kod CP/CPPS pacova. Sa druge strane, ovakvo ponašanje je značajno koreliralo sa stepenom lipidne peroksidacije u korteksu i hipokampusu CP/CPPS pacova (povišen MDA u ovim strukturama). Dalje, porast koncentracije kortikosterona u serumu CP/CPPS pacova je takođe korelirao sa stepenom devijacije ponašanja u pravcu anksioznosti. Na posletku, postojala je i pozitivna korelacija između broja PV+ interneurona u CA2/3 regionu i DG hipokampusa CP/CPPS životinja sa parametrima ponašanja povezanog sa anksioznošću u sva tri testa.



Slika 5.4. Integrativni međusobni odnos oksidativnog stresa, kortikosterona i hipokampalnih PV+ interneurona u ponašanju povezanom sa anksioznošću kod CP/CPPS pacova

Međuzavisnost oksidativnog stresa u mozgu, hiperaktivnosti HPA osovine (povišen kortikosteron u serumu) i gubitka hipokampalnih PV+ interneurona u CP/CPPS-izazvanom ponašanju povezanom sa anksioznošću potencijalno uključuje mehanizme pozitivne povratne sprege.

Rezultati naše studije su takođe ukazali i na postojanje poremećaja raspoloženja kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS, u smislu povećanog ispoljavanja ponašanja povezanog sa depresijom. Testiranjem životinja u testu forsiranog plivanja, 7. postoperativnog dana, pokazali smo da je kod životinja sa CP/CPPS ponašanje povezano sa depresijom bilo više ispoljeno u odnosu na korespondentne Sham kontrole. Kliničke studije su u saglasnosti sa našom opservacijom i potvrđuju da pacijenti sa CP/CPPS neretko razvijaju mentalne poremećaje, od kojih se najčešće javljaju poremećaji raspoloženja, pa sve do razvoja kliničke depresije. Kohortna studija Clemens i saradnika, sprovedena 2008. u USA (Clemens i sar. 2008b), pokazala je da skoro 20% pacijenata obolelih od CP/CPPS koristi medikamente iz grupe antidepresiva zbog postojanja klinički razvijene depresije. Druge kliničke studije pak potvrđuju da razvoj depresije kod obolelih od CP/CPPS, u odnosu na druga oboljenja genitourinarnog sistema, smanjuje kvalitet života i narušava mentalno zdravlje u većoj meri nego koronarna bolest srca (Chung i sar. 2011).

Postoji nekoliko potencijalnih mehanizama koji bi mogli da objasne na koji način periferni inflamatorni proces, poput prostatitisa, može dovesti do ponašanja povezanog sa depresijom i kognitivne deterioracije. Najprihvaćenija teorija zasniva se na neuroinflamaciji, poremećajima neurotransmisije i disfunkciji HPA osovine (Du i sar. 2019).

Postoje studije koje su povezale povećan nivo kortizola sa nastankom depresije usled smanjenog odgovora homeostatskih mehanizama za bobu sa stresorom uz posledično iscrpljenje ovih mehanizama i razvoj patološkog odgovora na stres (Maripuu i sar. 2014). Ostala istraživanja su dokazala da se osim neadekvatnog odgovora HPA osovine javljaju poremećaji i ostalih hormona. Kod obolelih od CP/CPPS postoji snižena serumska koncentracija testosterona što implicuje gubitak njegovih neuroprotektivnih efekata (Lee i Lee 2016a). Deficit testosterona se često navodi kao jedan od etiopatogenetskih mehanizama u razvoju depresije (Khera 2013). Poznato je da svi dolazni signali u CNS podležu modulaciji koja obuhvata facilitaciju ili inhibiciju. Kod obolelih od CP/CPPS dolazi do remodelovanja nervnog tkiva, te se zbog centralne i periferne senzitivacije uz istovremeni gubitak inhibitorne interneuronske mreže očekuje amplifikacija signala koji se odnose na bolne ili stresne stimuluse što vodi ka augmentaciji stimulusa i nastanku katastrofizacije simptoma (Pontari i Ruggieri 2004). Ispitivanja koja su upotrebom funkcionalne magnetne rezonancije ispitivale aktivaciju određenih regiona CNS u percepciji bolnih stimulusa su pokazala da kod obolelih od CP/CPPS koji pokazuju znake depresije, u odnosu na pacijente bez simptoma depresije, postoji veća aktivacija moždanih struktura zbog reorganizacije neuronskih mreža i njene hiperaktivnosti (Farmer i sar. 2011). Smatra se da je amplifikacija signala osnov katastrofizacije bola i narušenog emocionalnog odgovora kod obolelih od CP/CPPS, a to se smatra glavnim mehanizmom nastanka depresije (Berna i sar. 2010). Istraživanja na animalnim modelima implicuju da se kao rezultat CP/CPPS očekuju i mikromorfološke promene u smislu smanjenja populacije neurona i povećanja populacije glijia ćelija u određenim regionima mozga (Deng i sar. 2019). Sa druge strane, poznato je da su procesi neurogeneze i gliogeneze narušeni kod obolelih od depresije (Eisch i Petrik 2012), ali uključenost ovih procesa u razvoj depresije kod obolelih od CP/CPPS još uvek nije ispitana. Na kraju, ne treba zaboraviti i genetsku osnovu za razvoj depresije kod obolelih od ovog sindroma usled činjenice da su određeni pacijenti evidentno podložniji da razviju depresivne simptome od drugih. Nekoliko istraživanja koja demonstriraju genetsku osnovu razvoja depresije kod obolelih od CP/CPPS je pokazalo da se određeni aleli gena koji kodira sintezu enzima katehol-O-metiltransferaza mogu istovremeno povezati sa bolnom hipersenzitivnošću, percepcijom bola na proširenom regionu tela i depresijom (Fijal i sar. 2010).

U našoj studiji smo pokazali da kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS, u odnosu na lažno operisane kontrole, postoji oštećenje kognitivnih funkcija. U cilju procene kognitivnih funkcija, 7. postoperativnog dana smo sproveli modifikovani test uzdignutog krstastog

lavirinta, gde je pokazano da kod životinja sa CP/CPPS postoji narušena spacijalna memorija i orijentacija. Pretragom literature, može se konstatovati da je mali broj kliničkih i eksperimentalnih studija procenjivao kognitivne funkcije kod pacijenata ili životinja sa CP/CPPS. Jedna animalna studija je upotrebom Morris vodenog lavirinta pokazala značajno narušavanje kognitivnih funkcija, prostornog učenja i pamćenja, kod miševa sa EAP (Du i sar. 2020). Naša studija je prva koja zajedno procenjuje združenost eksperimentalnog CP/CPPS sa ponašanjem povezanim sa depresijom i padom kognitivnih funkcija, uz objašnjenje potencijalnih patofizioloških mehanizama koje ova dva poremećaja kroz zajedničku patogenezu dele.

Ne postoje studije na ljudima koje su ispitivale uzrok kognitivnog deficita kod obolelih od ovog sindroma, ali se u animalnim studijama došlo do zaključka da postoje brojni mehanizmi koji bi mogli dovesti do morfoloških i funkcionalnih promena neurona i sinapsi unutar CNS koje se odražavaju na kognitivne performanse. Studija Hu i saradnika (2016) je pokazala da kognitivni deficit kod pacova sa eksperimentalnim prostatitisom koji se odnosi na narušenu spacijalnu memoriju i asocijativnu memoriju može biti posledica proinflatornih citokina poreklom iz prostate, ili neuroinflatornih promena u amigdali, hipokampusu, *nc. accumbes* i *nc. caudatus*. Osim inflamatornih promena, nervno remodelovanje dovodi do narušene strukturne organizacije neuronskih mreža i razvoja neuronske plastičnosti kao adaptivnog odgovora na hronični stres, bol i inflamaciju (Collo i sar. 2014). Takođe, animalna studija EAP kod miševa je pokazala da dolazi do širokog spektra promena u strukturama CNS, a naročito u hipokampusu, te se smanjenje gustine dendrita i dendritskih produžetaka, zajedno sa ultrastrukturnim promenama sinapsi u smislu povećanja dijametra sinaptičke pukotine i smanjenja gustine proteina na postsinaptičkoj membrani, uz mikroglijalnu aktivaciju i miroglijom-indukovano oštećenje sinapsi, mogu jasno dovesti u vezu sa oštećenjem vizuelne i spacijalne orijentacije i memorije (Du i sar. 2020). Sa otkrićem i potvrdom da postoji adultna neurogeneza u dentatnom girusu hipokampusa, koji ima najbitniju ulogu u kognitivnim funkcijama, učenju i pamćenju, pokazano je da njen smanjen obim dovodi do brojnih mentalnih poremećaja, uključujući i probleme sa kognicijom (Toda i sar. 2019). Takođe, ispitivanja uloge i ostalih glijalnih ćelija, kao što su astrociti, pokazala su da u slučaju aktivacije astrocita i posledičnog nastanka astrocitoze u hipokampusu pacova, dolazi do reorganizacije neuronskih krugova koji za posledicu imaju umanjenje kognitivnih funkcija (Wilhelmsson i sar. 2019). Međutim, uticaj adultne neurogeneze i astrocitoze u hipokampusu na pad kognitivnih funkcija nije utvrđen kod obolelih od CP/CPPS.

Naša studija je demonstrirala da u serumu životinja sa CP/CPPS postoji niža koncentracija testosterona, u odnosu na kontrolne životinje. Upravo je niža koncentracija testosterona utvrđena i kod pacijenata sa CP/CPPS, kao i povezanost sa mentalnim simptomima (Lee i Lee 2016b). Sem toga, pokazano je da egzogeno aplikovani androgeni ispoljavaju antiinflamatorni i antidepresivni efekat, kao i to da je hipogonadizam udružen sa povećanjem markera inflamatornog odgovora i razvoja depresije (Tsilidis i sar. 2013). Sa druge strane, u literaturi postoje i podaci koji upućuju na to da se kod CP/CPPS može razviti generalizacija inflamatornog odgovora sa centralizacijom inflamacije, praćenom neuropatskim bolom, a kao jedan od medijatora koji promovise ovaj proces, navodi se pad koncentracije testosterona u serumu (Lundh i sar. 2013).

Niže vrednosti koncentracije testosterona u serumu koje su potencijalni uzrok ponašanja povezanog sa depresijom i kognitivnog pada kod CP/CPPS životinja u našoj studiji su verovatno posredovani neuromodulatornim efektima testosterona koje on ostvaruje na određene strukture mozga. Naime, centralnu ulogu u nastanku depresije ima deficit serotonergičke neurotransmisije (Moncrieff i sar. 2022), a sa druge strane, eksperimentalne studije su pokazale da testosteron ostvaruje indirektni antidepresivni efekat upravo putem modulacije serotonergičke neurotransmisije (Hauger i sar. 2022). Testosteron, osim direktnog povećanja

serotonergičke neurotransmisije, isti efekat može imati i indirektno putem indukcije sinteze kispeptina u neuronima amigdale i hipokampusu (Oakley i sar. 2009), za koji je pokazano da takođe promovira serotonergičku neurotransmisiju (Orlando i sar. 2018). Brojne kliničke studije su pokazale proinflamatorne efekte estrogena i antiinflamatorne efekte testosterona kod obolelih od ovog sindroma (Condorelli i sar. 2016).

Eksperimentalne studije su u jednoj meri rasvetlile mehanizam uticaja polnih hormona i potvrdile opservacije iz humanih studija. Naime, u eksperimentalnim modelima prostatitisa je pokazano da sa starenjem kod pacova dolazi do pada nivoa testosterona i povećanja nivoa estrogena što vodi ka spontanom nastanku autoimunske inflamacije u tkivu prostate (Keith i sar. 2001). Smatra se da estrogen dovodi do povećane transkripcije gena za sintezu TNF- α , IL-1 β , IL-6 i iNOS što predstavlja osnovni citokinski milje za razvoj hronične inflamacije (Harris i sar. 2000), te je administracija testosterona dovela do atenuacije inflamacije u estrogen-zavisnoj inflamaciji prostate kod životinja (Yatkin i sar. 2009). Na osnovu ovih činjenica je opravdana upotreba finasterida kod obolelih od CP/CPPS, jer blokadom enzima 5 α -reduktaze, usled smanjene produkcije dihidrotestosterona (DHT) iz testosterona, se u tkivu prostate povećava koncentracija testosterona koji ispoljava antiinflamatorna dejstva (Nickel i sar. 2004). Protektivni efekti testosterona se ogledaju i u činjenici da se kod obolelih od CP/CPPS mogu naći mutacije na alelima gena na hromozomu X koji kodiraju receptore za androgene, te se posledično ispoljava neosetljivost na androgene i gubitak protektivnih efekata testosterona (Riley i Krieger 2002a). Osim lokalnih efekata na tkivo prostate, testosteron ispoljava i neuroprotektivno dejstvo koje se ogleda u blokadi NGF-posredovane centralne i periferne senzitivacije koja je jedan od glavnih neuroloških patogenetskih mehanizama u razvoju simptoma ovog sindroma (Meusburger i Keast 2001).

Poslednjih nekoliko godina je u kliničkim studijama pokazano da kod starijih muškaraca niska vrednost koncentracije testosterona u serumu korelira sa stepenom pada kognitivnih funkcija (Beauchet 2006). Takođe, pokazano je da tretman egzogenim testosteronom dovodi do poboljšanja mentalnih sposobnosti i umanjuje simptome kognitivnog deficita (Hua i sar. 2016). Animalne studije su pokušale da delimično rasvetle neuroprotektivne funkcije testosterona, pa je, osim antioksidativnog efekta koji ispoljava na hipokampus miševa sa eksperimentalno izazvanom Alchajmerovom bolešću, pokazan i njegov pozitivan uticaj na gustinu dendritskih spina CA1 hipokampalnih neurona, broj piramidalnih neurona u hipokampusu, kao i na sinaptičku gustinu koja je dokazana povećanom ekspresijom postsinaptičkog proteina PSD-95 (eng. postsynaptic density protein 95) (Yan i sar. 2019). Morfološke promene struktura CNS koje su posredovane smanjenjem koncentracije testosterona, mogu se objasniti promenom ekspresije BDNF (Rasika i sar. 1999). Pokazano je da se kod pacova nakon hirurške eksperimentalne kastracije može opservirati smanjena ekspresija BDNF u hipokampusu i neuronima kičmene moždine (Shin i sar. 2019). BDNF je esencijalan u preživljavanju neurona tokom procesa adultne neurogeneze u hipokampusu koji je ključni deo mozga za obavljanje kognitivnih procesa (Rasika i sar. 1999). Naše istraživanje je pokazano da postoje istovremeno i niska koncentracija testosterona i smanjen obim adultne neurogeneze. Dakle, uticaj niske koncentracije testosterona na smanjeni obim adultne neurogeneze, potencijalno bi mogao biti posredovan smanjenom sintezom BDNF, koja takođe može biti posledica niskih koncentracija testosterona.

U našem istraživanju smo pokazali da kod životinja sa prostatitisom postoji značajno povećanje nivoa ekspresije ICAM-1 u talamusu i cerebralnom korteksu. ICAM-1 predstavlja glikoprotein na površini ćelijskih membrana endotelih ćelija, a funkcioniše kao receptor za regrutovanje, adheziju i transmigraciju leukocita iz krvnih sudova unutar KMB na mesto zapaljenja u tkivu mozga (Bui i sar. 2020). Stoga, naši rezultati, osim što potvrđuju prisustvo neuroinflamacije u strukturama mozga, ujedno pokazuju i disfunkciju KMB i sugerišu veličinu uloge tog procesa u razvoju neuroinflamacije.

Pretpostavlja se da citokini iz inflamirane prostate mogu dovesti do funkcionalnog oštećenja KMB, što za dalju posledicu može imati aktivaciju glija ćelija i dalju produkciju citokina u mozgu (Riazi i sar. 2015). Takođe, u literaturi se navodi da sinaptičke promene u hipokampusu koje su izazvane proinflamatornim medijatorima porekla glija ćelija mogu ležati u osnovi bihejvioralnih promena koje se opserviraju u stanjima perifernih inflamatornih procesa (Riazi i sar. 2015). Neuropsihijatrijske manifestacije koje se javljaju u sklopu brojnih hroničnih bolnih sindroma su usko povezane sa hroničnom perifernom inflamacijom (Zhou i sar. 2021). Tako su istraživanja novijeg datuma potvrdila činjenicu da neuroinflamacija igra veoma važnu ulogu u nastanku velikog depresivnog poremećaja (Rahimian i sar. 2022).

Povezanost između povišenog nivoa proinflamatornih citokina i razvoja psihijatrijskih poremećaja poput depresije, prvi put je uočena kod pacijenata obolelih od hroničnog hepatitisa C koji su bili lečeni egzogeno aplikovanim IFN- γ (Zhang i An 2007). Sa druge strane, biohemijska analiza periferne krvi pacijenata sa klinički dijagnostikovanom i manifestnom depresijom, potvrdila je postojanje povišenih markera inflamacije u serumu (Miller i sar. 2009). Naša studija je pokazala da se kod pacova sa eksperimentalnim CP/CPPS detektuje značajno povećan nivo proinflamatornih citokina IL-6 i IL-1 β u tkivu prostate, kao i u talamusu i cerebralnom korteksu, ali ne i u serumu. Međutim, nepostojanje razlike u nivou citokina u serumu ne isključuje mogućnost generalizacije inflamatornog procesa (Jaffer i sar. 2010), a otvara vrata ka razmatranju drugih medijatora koji bi mogli doprineti generalizaciji ovog procesa i dokazanom razvoju neuroinflamacije u prisustvu izolovanog zapaljenja prostate. Slično našoj studiji, Du i sar. (2019) su pokazali da porast proinflamatornih citokina poput IL-1 β , IL-8, kao i TNF- α kod miševa sa EAP postoji u strukturama mozga i prostati.

Rezultati naše studije su pokazali povećanje aktivnosti glija ćelija u hipokampusu pacova sa CP/CPPS, na šta ukazuje povećana ekspresija GFAP, markera aktiviranih astrocita, u hipokampusu pacova sa CP/CPPS. U različitim kliničkim i eksperimentalnim studijama, pokušano je rasvetljenje uloge pojedinih činilaca neuroinflamacija, a neke od njih su u fokusu imale ulogu glija ćelija (Torres-Platas i sar. 2014, Jia i sar. 2021).

Povećana aktivnost astrocita, usled reaktivne astrocitoze, sledom patofizioloških događaja dovodi do astroglioze koja se manifestuje fagocitozom i destrukcijom sinapsi, što može ležati u osnovi kognitivne disfunkcije koju smo u našoj studiji opservirali kod CP/CPPS pacova. Posledične promene nakon gliogeneze koje se odnose na strukturne promene u sinaptičkoj plastičnosti i smanjenu arborizaciju dendritskih produžetaka hipokampalnih neurona prethodno su dokazane u EAP kod miševa (Du i sar. 2019). Hipokampus se tradicionalno smatra regionom mozga koji je uključen u proces učenja, pamćenja, orijentacije i socijalnog ponašanja (Sweatt 2004). Povećana aktivacija glija ćelija, kao i posledično povećan nivo proinflamatornih citokina koje ove ćelije oslobađaju, dovode do morfoloških promena hipokampusa koje doprinose u patogenezi depresije (Guan i sar. 2020). Lehmann i sar. (2019) su pokazali da postoji povezanost između depresivnog ponašanja i oksidativnog stresa u mozgu. Osim toga, smanjenje neuroinflamatornog odgovora i signifikantni antidepressivni efekat kod miševa postignut je upotrebom tetraciklina koji je potentni inhibitor aktiviranih glija ćelija. Takođe, Zhang i sar. (2019a) su pokazali da postoji povezanost ponašanja povezanog sa depresijom i promena aktivnosti astrocita i mikroglije u hipokampusu pacova u modelu eksperimentalno izazvanog prostatitisa kod glodara. U njihovoj studiji je dokazana povišena ekspresija markera aktivacije astrocita i mikroglije, GFAP i Iba1 (eng. ionized calcium-binding adapter molecule 1) u grupi životinja sa prostatitisom. Ova pretpostavka je potvrđena i opservacijom ultrastrukturnih promena na glija ćelijama upotrebom elektronske mikroskopije. Dodatni zaključci koji su proistekli iz ove studije se odnose na to da aktivirane mikroglijalne ćelije oslobađaju proinflamatorne citokine koji menjaju funkcionalni status astrocita koji za uzvrat menjaju obim ponovnog preuzimanja glutamata, smanjujući njegov nivo u neuronskim sinapsama hipokampusu, što doprinosi razvoju depresije (Du i sar. 2019). Eksperimentalne

studije na modelima cerebrovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti su takođe potvrdile vezu između mikroglijalne aktivacije i stepena neuroinflamacije sa kognitivnom deterioracijom. Kod cerebralne hipoperfuzije i Alchajmerove bolesti, pokazano je da aktivirana mikroglija oslobađa proinflamatorne faktore poput: IL-1 β , IL-6, TNF- α , uz povećanu aktivnost enzima COX-2 i iNOS, čime se podstiče egzacerbacija neuronske disfunkcije u hipokampusu (Leng i Edison 2021, Zhao i sar. 2021).

Rezultati naše studije su pokazali da kod CP/CPPS pacova postoji smanjena ekspresija Ki-67 markera proliferacije, kao i DCX markera mladih neurona u hipokampusu. Ovi rezultati sugerišu da je obim adultne neurogeneze u hipokampusu pacova sa CP/CPPS bio smanjen.

Protein Ki-67, osim što predstavlja imunohistohemijski marker proliferacije nezrelih neurona u procesu adultne neurogeneze, ima esencijalnu ulogu u formiranju perihromozomalnog omotača koji sprečava kondenzaciju hromozoma tokom ćelijske deobe (Sun i Kaufman 2018). Dablkortin (DCX) predstavlja važan protein koji izmenom citoskeleta stabilizuje mikrotubule i stimuliše njihovu polimerizaciju kako bi se olakšala migracija postmitotičkih neurona do sloja granularnih ćelija hipokampusa. Zbog toga je DCX široko u upotrebi kao imunohistohemijski marker proliferacije i migracije mladih neurona u procesu adultne neurogeneze u hipokampusu (Delprato i sar. 2022). Jedan od glavnih stimulatora ovog procesa jeste BDNF, a pokazano je da proinflamatorni citokini vrše inhibitoryni uticaj na njegovu sintezu aktivacijom p38 MAP kinaze i NF- $\kappa\beta$, što rezultuje smanjenjem obima adultne neurogeneze (Cortese i sar. 2011, Fidalgo i sar. 2011).

Prema podacima dostupnim iz literature (Micheli i sar. 2018), smatra se da je smanjen obim adultne neurogeneze čest pratilac promena u ponašanju po tipu depresije i kognitivne disfunkcije. Značaj ovog procesa u nastanku depresije sugerišu nalazi iz eksperimentalnih studija na animalnim modelima depresije gde je pokazano da u hipokampusu miševa dolazi do povećanja obima adultne neurogeneze, i povećane arborizacije dendrita nakon primene antidepresiva ili nakon tretmana fizičkom aktivnošću (Huang i sar. 2012). Pavlov i sar. (2019) su pokazali prisustvo ponašanja povezanog sa depresijom i anksioznošću u eksperimentalnom modelu emocionalnog stresa kod miševa i istovremeno su imunohistohemijskom analizom dokazali smanjenje ekspresije Ki-67+ i DCX+ neurona u hipokampusu, kao i povećanje ekspresije markera aktivacije glija ćelija (GFAP i Iba-1) u ovom modelu. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima naše studije. Njihovi rezultati su takođe ukazali i na povišenu ekspresiju IL-1 β i IL-6 u hipokampusu, sa posledičnim smanjenjem produkcije BDNF (Pavlov i sar. 2019).

Sa druge strane, broj DCX+ ćelija u hipokampusu je značajno bio smanjen u animalnom modelu anksioznosti i depresije izazvanom hroničnim stresom praćenim povišenim nivoom kortikosterona (Agasse i sar. 2020), te je hiperaktivnost HPA osovine, koju smo pokazali kroz povišene vrednosti koncentracije kortikosterona u serumu pacova sa CP/CPPS, jedan od mogućih faktora koji smanjuje obim adultne neurogeneze.

Mikroglijalne ćelije i astrociti svojim fiziološkim funkcionisanjem stvaraju mikrookolinu za nesmetanu maturaciju neurona tokom embriogeneze, postnatalnog razvoja, ali i tokom adultne neurogeneze. Inflamatorni citokini i ROS poreklom glije dokazano suprimiraju ćelijsku proliferaciju tokom adultne neurogeneze u hipokampusu (Fan i Pang 2017), ali takođe usled aktivacije astrocita dovode do astrocitoze hipokampusa koja narušava osnovne neurofiziološke osobine ovog dela mozga (Sofroniew 2015). Pored smanjene neurogeneze i povećane astrocitoze, neuroinflamacijom-indukovani gubitak GABAerگیčke inhibitorne mreže hipokampusa dovodi do definitivne disfunkcije hipokampusa sa drastičnim posledicama po pitanju sinaptičke transmisije i modulacije signala koji putuju ka subkortikalnim strukturama i cerebralnoj kori, te je to uzrok nastanka simptoma po tipu depresije i kognitivne disfunkcije

(Ruden i sar. 2021). Usled ograničenja uzorkovanja ljudskog moždanog tkiva, ne postoje studije koje su u kontekstu neuroinflamacije ispitivale ulogu ultrastrukturnih promene hipokampusa kod obolelih od CP/CPPS, dok je u animalnim studijama na životinjama sa CP/CPPS pokazana reaktivna astrocitoza hipokampusa (Du i sar. 2019) i L6-S1 segmenta kičmene moždine (Deng i sar. 2019)

Dakle, smanjen obim adultne neurogeneze koji smo opservirali kod CP/CPPS životinja u našoj studiji, može se objasniti uzajamnim dejstvom hroničnog stresa, hroničnog bola kao stresnog stimulusa, disfunkcije HPA osovine i neuroinflamatornih promena.

Modulatorni efekat povećanja endogenog CO na promene bioelektrične aktivnosti mozga, kao i ponašanje životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS je u našoj studiji ispitan tretmanom životinja u sedmodnevnom postoperativnom periodu pomoću i.p. administracije CORM-A1 molekula, sporo-oslobađajućeg donora CO. Kako bi se utvrdilo ponašanje povezano sa anksioznošću, pacovi su podvrgnuti testovima OF, EPM, L/D, dok je FST test sproveden u cilju utvrđivanja postojanja ponašanja povezanog sa depresijom. Merenje praga bola na mehaničku draž evF esteziometrom je sprovedeno da bi se verifikovao razvoj prostatitisa i bola, kao i u svrhu praćenja efekata CORM-A1 na nocicepciju. Ekscitabilnost CNS i uticaj CORM-A1 na bihejvioralne i EEG manifestacije epileptičnih napada su ispitani sedmog postoperativnog dana, upotrebom subkonvulzivne doze lindana od 4 mg/kg. Histološka analiza prostate je učinjena nakon žrtvovanja životinja kako bi se potvrdio razvoj inflamacije prostate u grupama CP/CPPS-PBS i CP/CPPS-CORM, a takođe da bi se utvrdilo da li postoji uticaj CORM-A1 na inflamaciju tkiva prostate.

Rezultati koji su dobijeni našim istraživanjem su pokazali da je sedmodnevni postoperativni tretman CORM-A1 doveo do ublažavanja razvoja mehaničke alodinije i manje devijacije skrotalnog praga bola kod pacova sa CP/CPPS, u odnosu na pacove koji su postoperativno tretirani PBS rastvaračem. Ponašanje povezano sa anksioznošću je bilo manje izraženo kod CORM-A1 tretiranih pacova sa CP/CPPS, u odnosu na pacove sa CP/CPPS koji su tretirani rastvaračem, s obzirom na duže vreme i distancu ambulatornog kretanja, više vremena provedenog u centru otvorenog polja, veći broj propinjanja na zadnje ekstremitete i manji indeks tigmotaksije u OF testu. Kongruentne rezultate su dali i komplementarni testovi za procenu anksioznosti, te je EPM test pokazao veći broj tranzicija između otvorenih i zatvorenih krakova lavirinta i više vremena provedenog u otvorenim kracima kod CP/CPPS-CORM životinja, u odnosu na CP/CPPS-PBS životinje, dok je u L/D testu kod pacova sa prostatitisom koji su tretirani donatorom CO zapažen veći broj tranzicija između svetlog i tamnog kompartmana, kao i duže vreme provedeno u svetom kompartmanu, u odnosu na životinje sa prostatitisom koje su tretirane rastvaračem PBS. Sem toga, ispitivanje ponašanja povezanog sa depresijom u našoj studiji je pokazalo da je postoperativni tretman donatorom CO kod životinja sa prostatitisom doveo do smanjenja vremena provedenog u flotiranju, što je indikativno za smanjen stepen depresije u ovoj grupi životinja. 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 bihejvioralnih i EEG manifestacija konvulzija izazvanih lindanom. Histološka analiza prostate je potvrdila razvoj prostatitisa kod pacova tretiranih intraprostatičnom injekcijom λ -karagenina, kako onih koji su postoperativno dobijali CORM-A1, a tako i kod onih koji su postoperativno tretirani injekcijama PBS. Međutim, inflamacija prostate je bila manje izražena kod pacova koji su postoperativno tretirani CORM-A1.

Ovakvi naši rezultati jasno ukazuju na modulatorni efekat postoperativne primene CORM-A1 kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS, u smislu smanjenja: ponašanja povezanog sa anksioznošću i depresijom, hiperekscitabilnosti CNS, inflamacije prostate i bolnih senzacija u pelvičnoj regiji.

Gasotransmiteri imaju plejotropne fiziološke funkcije, a posebno su interesantni nalazi o efikasnosti donora NO, CO i H₂S u pretkliničkim animalnim modelima autoimunskih, akutnih i hroničnih inflamatornih bolesti (Fagone i sar. 2018). Kliničke studije su pokazale korisne terapijske efekte CORMs nakon parenteralne primene u većem broju akutnih i hroničnih inflamatornih i bolnih stanja, poput akutnog infarkta miokarda, multiple skleroze i hroničnog neuropatskog bola (Yoon i sar. 2017).

Nekoliko novijih animalnih studija je demonstriralo antiinflamatorne, citoprotektivne i imunomodulatorne efekte malih doza endogeno sintetisanog CO (Yabluchanskiy i sar. 2012). Uz to, u ovim studijama je modulacija nivoa CO postignuta upravo primenom donora CO u vidu CORMs koje smo i mi koristili u ovom istraživanju u cilju modulacije nivoa CO (Wang i sar. 2018a). Rezultati pojedinih studija pokazali su anksiolitičke i antidepresivne efekte primene CORMs u različitim modelima hroničnih neuroinflamatornih stanja (Yabluchanskiy i sar. 2012), što je u saglasnosti sa rezultatima našeg istraživanja. Pretpostavlja se da je većina benefita nastalih aplikacijom CORM-A1 kod životinja sa CP/CPPS posredovana njegovim antiinflamatornim i neuroprotektivnim efektima (Qureshi i sar. 2016).

Antikonvulzivno dejstvo CORM-A1 koje smo kod CP/CPPS životinja demonstrirali u ovoj studiji je u korelaciji sa nalazima ostalih studija koje su proučavale patogenezu epilepsija. Animalna studija koja je proučavala febrilne konvulzije kod pacova je pokazala da inhibicija aktivnosti enzima HO upotrebom ZnPP vodi ka sniženoj koncentraciji endogenog CO, što je bilo povezano sa većom učestalošću napada i povećanim hipokampalnim oštećenjima (Yang i sar. 2005). Prema tome, CO ima protektivno dejstvo pri nastanku epileptičkih pražnjenja, te je povećana ekspresija HO-1 enzima u hipokampusu primer adaptivnog odgovora sa ciljem neuroprotekcije od rekurentnih napada (Wang i sar. 2007). Takođe, nalaz povećane ekspresije HO-1 u mikrogliji i astrocitima na mestu hemisekcije kičmene moždine se smatra adaptivnim odgovorom u cilju smanjenja inflamacije koja nastaje nakon povrede (Mauter i sar. 2000). Ispoljavanje antikonvulzivnog efekta CORM-A1 kod pacova sa prostatitisom bi se moglo objasniti i promenom citokinskog miljea u smislu smanjene koncentracije proinflamatornih citokina u mozgu koje smo demonstrirali da postoji kod pacova sa CP/CPPS. Naime, u animalnim studijama je pokazano da CO dovodi do redukcije mikroglijalne aktivnosti, kao i do snižene ekspresije proinflamatornih citokina poput IL-1 β i TNF- α u tkivu mozga (Wilson i sar. 2017). Kada je prisutan u svojim fiziološkim koncentracijama (od 100 do 500 ppm), CO inhibira sintezu proinflamatornih citokina TNF- α i IL-1 β , a sa druge strane stimuliše sekreciju IL-10 koji ima antiinflamatorna svojstva (Åberg i sar. 2008). IL-1 β dalje za uzvrat povećava sintezu CO i pojačava njegov antiinflamatorni efekat (Lee i Chau 2002). Smatra se da je antiinflamatorno dejstvo CO posredovano putem cGMP signalnog puta (Brouard i sar. 2000). Uz to, smanjen konvulzivni odgovor pacova sa prostatitisom koji su tretirani CORM-A1 se može objasniti i antioksidativnim efektima CO koji su uočeni u *in vitro* studijama (Almeida i sar. 2016).

Postoje dokazi iz eksperimentalnih studija koji pokazuju da CO poseduje anksiolitička i antidepresivna dejstva (Luo i sar. 2021), što je u skladu sa našim rezultatima u kojima smo uočili da je postoperativni tretman životinja sa CORM-A1 ostvario antidepresivni i anksiolitički efekat. Na nivou CNS, CO posreduje u modulaciji komunikacije neurona i mikroglije, kao rezidentnih imunokompetentnih ćelija CNS. U *in vitro* modelu, pokazano je da CO ispoljava neuroprotektivno dejstvo povećavanjem oslobađanje neurotrofičnih faktora iz mikroglije, uz istovremeno suzbijanje inflamatornih faktora kao što su TNF- α ili nitriti (Soares i sar. 2022). Takođe je uočeno da CO uspešno prevenira apoptozu neurona i stimuliše adultnu neurogenezu (Almeida i sar. 2016). Astrociti i mikroglijalne ćelije se odlikuju vrlo visokim nivoom ekspresije HO-1, a veruje se da CO sintetisan u ovim ćelijama ima neuroprotektivno dejstvo s obzirom na povećanu sintezu tokom razvoja mozga, ali i u slučaju traumatske povrede mozga i cerebrovaskularnih oštećenja gde se veruje da je uloga HO-1 enzima povećana razgradnja hema u hemoragičnim fokusima u cilju zaštite okolnog zdravog tkiva (Steimer i sar. 2021). Prema

tome, neuroprotektivno i antiapoptotsko dejstvo CO bi moglo da objasni njegove antidepresivne i anksiolitičke efekte koje smo u ovoj studiji opservirali.

Poremećaj noradrenergičke i serotonergičke transmisije u CNS je jedan od mogućih uzroka depresije kod obolelih od CP/CPSPS. Pokazano je da IL-1 β povećava aktivnost transportera za serotonin i povećava preuzimanje serotonina u presinaptički završetak (Ramamoorthy i sar. 1995), kao i da stimuliše aktivnost enzima koji smanjuju nivo serotonina (Raison i sar. 2009). S druge strane, pokazali smo znatan stepen neuroinflamacije i povećanu sintezu IL-1 β u regionima mozga pacova sa CP/CPSPS koji su povezani sa emocijama i ponašanjem. Interakcije gasotransmitera i serotonina, kao monoaminskog neurotransmitera, predstavljaju validan predmet istraživačkog interesovanja. Pokazano je da NO deluje kao transsinaptički i autokrini signalni molekul u serotonergičkim neuronima *nc. raphe*, sa izraženim i predominantno inhibitorynim efektima (Gartside i sar. 2020). Ipak, interakcije CO sa serotonergičkom transmisijom nisu za sada direktno ispitivane, ali se može pretpostaviti indirektno povećanje serotonergičke transmisije i antidepresivni efekat CO upravo putem smanjenja ekspresije IL-1 β (Koo i Duman 2009).

Kod depresivnih pacijenata je opisan disbalans aktivnosti HPA osovine usled povećane produkcije CRH, koji sam po sebi doprinosi negativnom raspoloženju, gubitku apetita i poremećajima spavanja. Medijatori inflamacije u mozgu, čija je sinteza u CP/CPSPS povećana, stimulišu sekreciju CRH i indukuju sekreciju ACTH i glukokortikoida (Dunn 2006), što potvrđuje tesnu vezu između neuroinflamacije, hiperaktivnosti HPA osovine i depresije. Na ovaj način dolazi do prevage negativnih nad pozitivnim efektima aktivacije HPA osovine (Miller i sar. 1999), što za posledicu ima razvoj ponašanja povezanog sa depresijom. Postoje eksperimentalni podaci da indukcija endogene produkcije CO dovodi do značajnog smanjenja koncentracije ACTH u sistemske cirkulaciji (El-Sayed i sar. 2012). Shodno tome, antidepresivni efekat CO u modelu CP/CPSPS, koji smo uočili u našem istraživanju, može biti posredovan upravo putem regulacije HPA osovine. Što se tiče uticaja CO na samu nadbubrežnu žlezdu, pokazano je da stimulacija ćelija nadburega ACTH iz hipofize dovodi do povećane ekspresije HO-1, koja povećava koncentraciju CO i bilirubina u ovim ćelijama, a krajnji ishod je inhibicija steroidogeneze (Pomeranec i sar. 2004).

Uloga CO kao retrogradnog signalnog molekula u procesima dugotrajne potencijacije u kojima povećava evocirane sinaptičke potencijale (Alkadhi i sar. 2001) implikuje njegovo povoljno dejstvo na kognitivne procese. Neizostavna uloga CO postoji i u kontroli cirkadijalnog ritma, s obzirom da je njegova sinteza u suprahijazmatskom jedru tesno povezana sa dejstvom holinergičkih neurotransmitera putem cGMP signalnog puta, ali i sa dejstvom transkripcionih faktora gena časovnika (Minegishi i sar. 2018). Fiziološko funkcionisanje cirkadijalnog sistema je esencijalno u sprečavanju nastanka anksioznosti (Boiko i sar. 2022), te bi anksiolitički efekat CORM-A1 kod životinja sa prostatitisom mogao biti posredovan upravo regulacijom cirkadijalnog sistema. Istraživanja sugerišu da egzogena aplikacija CO ima anksiolitički efekat kod eksperimentalnih životinja (Luo i sar. 2021), a mehanizam ovog dejstva još uvek nije utvrđen. Takođe, CO je prepoznat kao potencijalni terapijski agens u tretmanu neuroloških sekvela usled reperfuzije nakon povrede mozga koje se mogu objasniti promovišućim efektima CO na procese neurogeneze (Kotsch i sar. 2007), ali i antiinflamatornim efektom u slučaju postojanja neuroinflamacije koja je praćena oksidativnim stresom (Motterlini i sar. 2019).

Uloga CO u transmisiji bolnih stimulusa u istraživanjima neuropatskog i incizionog bola je kontroverzna, s obzirom da je pokazano da CO dejstvom na neurone u kičmenoj moždini pojačava alodiniju i hiperalgeziju (Li i Clark 2000), što je u suprotnosti sa našim rezultatima. Sa druge strane postoje i studije koje daju potpuno suprotne rezultate (Nascimento i Branco 2009) koji su u skladu sa našim. Postoji povećana lokalna produkcija CO u inflamiranom tkivu koja

dovodi do antinociceptivnog efekta (Li i sar. 2004). Ostvarujući svoje efekte u talamusu i moždanoj kori, CO ima antinociceptivni efekat (Nascimento i Branco 2009).

Rezultati koje smo dobili u našem istraživanju pokazali su da su životinje koje su prošle tridesetodnevni trening na tredmilu, odnosno tokom 30 dana bile izložene aerobnoj fizičkoj aktivnosti, u odnosu na životinje koje su bile sedentarne, pokazale manji stepen alodinije u skrotalnoj regiji. To ukazuje na antinociceptivni efekat regularne dozirane fizičke aktivnosti u modelu CP/CPPS. Takođe, analiza rezultata etoloških testova (OF, EPM, i L/D) je pokazala niži stepen ponašanja povezanog sa anksioznošću kod fizički aktivnih pacova sa prostatitisom, u odnosu na sedentarne. Isto tako, pacovi koji su hronično bili fizički aktivni pre indukcije prostatitisa, pokazali su manji stepen flotiranja u FST testu u odnosu na pacove koji su bili sedentarni, što ukazuje na manje ispoljavanje ponašanja povezanog sa depresijom kod fizički aktivnih pacova. Ispitivanje ekscitabilnosti CNS je pokazalo da su pacovi sa prostatitisom koji su trčali na tredmilu, u odnosu na sedentarne, bili manje podložni konvulzijama izazvanim lindanom, te je kod ovih pacova opservirana manja incidenca i duže latentno vreme do prvog napada, kao i niži intenzitet napada. Takođe, EEG analiza je pokazala manji broj i trajanje iktalnih perioda kod fizički aktivnih pacova sa prostatitisom. Na posletku, histološka analiza tkiva prostate je potvrdila razvoj prostatitisa i kod sedentarnih i fizički aktivnih pacova koji su dobili intraprostaticnu injekciju λ -karagenina, ali je stepen inflamacije kod sedentarnih životinja bio veći. Prema tome, ovi rezultati pokazuju modulatoreni efekat hronične fizičke aktivnosti kod životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS, u smislu smanjenja: ponašanja povezanog sa anksioznošću i depresijom, hiperekscitabilnosti CNS, inflamatornog odgovora u tkivu prostate i mehaničke alodinije.

Do danas je razvijen veliki broj potencijalnih, ali nedovoljno efikasnih terapijskih modaliteta u lečenju CP/CPPS, a većina njih je usmerena na pojedinačni etiopatogenetski faktor ili izolovani simptom. Giubilei i sar. (2007) su sprovedli randomizovanu prospektivnu studiju u cilju istraživanja efekata fizičke aktivnosti kod obolelih od CP/CPPS, a rezultati ove studije su pokazali da su učesnici podvrgnuti protokolu aerobnog treninga pokazivali redukovan intenzitet bola i manju podložnost ka ispoljavanju simptoma psihijatrijskih komorbiditeta, u odnosu na grupu učesnika koja je bila podvrgnuta vežbama istezanja. Ove činjenice su u skladu sa rezultatima našeg istraživanja.

Antinociceptivni efekat fizičke aktivnosti koji smo opservirali u našoj studiji na osnovu funkcionalnog testa upotrebom elektronskog evF, se objašnjava modulatorenim efektom fizičke aktivnosti na koncentraciju brojnih neurotransmitera i hormona u organizmu. Jedan od pretpostavljenih mehanizama bi se mogao odnositi na porast koncentracije endogenih kanabinoida u serumu, obzirom da je dokazano da je njihova koncentracija u serumu kod ljudi povišena nakon trčanja ili vožnje bicikla (Zhang i sar. 2015). Analgetski efekat endogeno sintetisanih kanabinoida je odavno poznat u literaturi (Vučković i sar. 2018). Zapravo, dominantniji mehanizam antinociceptivnog efekta fizičke aktivnosti jeste posredovan modulacijom neuroendokrinih i autonomnih nervnih funkcija, naročito u pravcu povećane sinteze endorfina i modifikovanja brojnih neurotransmiterskih sistema, uključujući dopaminergički, noradrenergički i serotonergički sistem (Heijnen i sar. 2016). Pokazano je da eksperimentalna spontana hronična fizička aktivnost smanjuje aktivaciju serotonergičkih neurona u *nc. raphe*, a kao ishod ovog adaptivnog fenomena se uočava prevencija nastanka ponašanja povezanog sa anksioznošću u prisustvu stresnog stimulusa kao što je bol (Dremencov i sar. 2017). Hronična spontana/voluntarna fizička aktivnost takođe dovodi i do smanjenog lučenja noradrenalina i povećanog lučenja galanina u CNS, te ove promene u neurotransmisiji mogu da objasne opservaciju da fizička aktivnost dovodi do bolje adaptacije na stresni stimulus i do manjeg rizika za razvoj patološkog odgovora na stres u smislu anksioznosti i depresije. Usled brojnih veza *locus coeruleus* sa strukturama HPA osovine, veruje se da je smanjenje aktivnosti HPA osovine jedan od glavnih mehanizama dejstva smanjene

noradrenergičke transmisije pri postojanju stresom indukovane ekscitacije CNS (Murray i sar. 2010). Analgetski efekti fizičke aktivnosti mogu biti posredovani i NO jer je pokazano da dolazi do povećanja koncentracije NO u plazmi nakon fizičke aktivnosti (Perez i sar. 2002), a poznato je da NO poseduje antinociceptivne efekte (Svensson i sar. 2015).

Poremećaj funkcije cirkadijalnog sistema često leži u osnovi poremećaja poput anksioznosti i depresije (Walker i sar. 2020). Spontani i dobrovoljni pokreti miševa, kao što su doterivanje, šetanje ili pomeranje, dovode do smanjenja amplitude električne aktivnosti u suprahijazmatskom jedru, što je najverovatnije povezano sa serotonergičkim ulaznim signalima iz *nc. raphe*, dok je spontano i dobrovoljno trčanje na točku kod eksperimentalnih životinja dovelo do povećanja koncentracije serotonina u ovom jedru koje je centar cirkadijalne sinhronizacije (Leise i sar. 2013). Takođe, hronična fizička aktivnost indukuje i povećanu sintezu proteina toplotnog stresa koji predstavljaju odbrambeni mehanizam ćelija na različite fizičke, hemijske ili imunološke stresore (Fehrenbach i Niess 1999).

U studiji koju su sprovedi Dybowski i sar. (2018), pokazano je da se kod obolelih od CP/CPPS simptomi anksioznosti pogoršavaju direktno proporcionalno porastu intenziteta bolnih senzacija. Ovaj podatak se može delimično objasniti kroz uticaj nocicepcije na razvoj komorbiditeta CP/CPPS, ali ipak ostaje nejasno da li je anksioznost samo posledica hroničnog bola, ili pak sa druge strane učestvuje u patogenezi ostalih simptoma ovog sindroma, iako je opšte prihvaćena hipoteza da disfunkcija HPA osovine najčešće leži u osnovi anksioznosti (Boudarene i sar. 2002). Efekti fizičke aktivnosti na brojne fiziološke funkcije dobro su proučeni, ali tačni mehanizmi anksiolitičkog dejstva fizičke aktivnosti su ostali nejasni. Posmatrajući ovu situaciju kroz prizmu rezultata naše studije, anksiolitički efekat fizičke aktivnosti se delimično može objasniti njenim povoljnim efektima u odgovoru na stres i to putem stabilizacije HPA osovine u smislu smanjenog oslobađanja glukokortikoida (Plavsic i sar. 2020). Poznato je da pacijenti oboleli od ovog sindroma ispoljavaju povišene vrednosti kortizola u serumu (Anderson i sar. 2008), a istu opservaciju smo i uspostavili na osnovu našeg istraživanja posmatrajući grupu životinja sa eksperimentalnim CP/CPPS. Mehanizam smanjenja aktivnosti HPA osovine hroničnom fizičkom aktivnošću se najčešće dovodi u vezu sa činjenicom da hronični aerobni trening dovodi do smanjene ekspresije *c-fos* transkripcionog faktora u paraventrikularnom jedru hipotalamusa što dovodi do smanjene sekrecije CRH, ACTH i glukokortikoida (Tsai i sar. 2019).

S obzirom na činjenicu da smo opservirali da je eksperimentalni CP/CPPS praćen oksidativnim stresom u talamusu, hipokampusu i cerebralnom korteksu i objasnili povezanost ovog patološkog procesa sa nastankom bihevioralnih alteracija, potencijalni modulatorni efekti fizičke aktivnosti se mogu razmotriti i kroz uticaj vežbanja na oksidativni stres. Povišene vrednosti kortikosterona će kao adaptivni mehanizam povećati koncentraciju glukoze u mozgu, a ujedno i količinu stvorenih ROS, što će pogoršati bihevioralne performanse (Simioni i sar. 2018). Oksidativni stres u mozgu je identifikovan i od strane kliničkih studija kao faktor rizika za nastanak anksioznosti i depresije (Hovatta i sar. 2010). U prethodnim istraživanjima smo pokazali da je fizička aktivnost povezana sa redukcijom ponašanja povezanog sa anksioznošću, gde je glavni efekat fizičke aktivnosti posredovan upravo smanjenjem oksidativnog stresa i povećanjem enzimskih mehanizama antioksidativne zaštite (Hrncic i sar. 2013). Slična zapažanja postoje i u drugim studijama, gde je zapaženo da fizička aktivnost dovodi do smanjenja parametara oksidativnog stresa, uz istovremeno povećanje ekspresije enzima antioksidativne zaštite u strijatumu, hipokampusu i prefrontalnoj moždanoj kori (Aksu i sar. 2009). Istraživanja su pokazala da se benefiti fizičke aktivnosti ostvaruju i posredstvom dejstva na strijatum, povećanjem aktivnosti enzima tirozin hidrosilaze koji katalizuje konverziju L-tirozina u L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), koji je prekursor dopamina, neurotransmitera čiji je nedostatak centralni etiopatogenetski mehanizam nastanka depresije (Belujon i Grace 2017).

Fizička aktivnost, naročito ukoliko je spontana/voluntarna u eksperimentalnim uslovima, dovodi do porasta obima adultne neurogeneze (Selakovic i sar. 2017), a kao pretpostavljeni mehanizam ovog dejstva se navodi fizičkom aktivnošću indukovani porast u produkciji BDNF. Sa druge strane, esencijalna uloga BDNF u neurogenezi, ali i u neuroprotekciji i smanjenju podložnosti ka nastanku depresije je takođe poznata u literaturi (Yang i sar. 2020b)

Modulatorni efekat hronične fizičke aktivnosti na hiperekscitabilnost CNS se može objasniti kompleksnim mehanizmima kojima fizička aktivnost utiče na bioelektrične fenomene CNS. Međutim, porast broja studija koje su u fokusu imale efekte vežbanja na frekvenciju konvulzivnih napada kod obolelih od epilepsije su pokazale pozitivne efekte fizičke aktivnosti kod pacijenata sa epilepsijom (Arida i sar. 2008). Naši rezultati koji su pokazali antikonvulzivni efekat hronične fizičke aktivnosti su u saglasnosti sa studijama koje su pokazale da trčanje na tredmilu i plivanje smanjuju broj napada i povećavaju latentni period do nastanka pilokarpinom-izazvanih epileptičnih napada kod životinja (Vannucci Campos i sar. 2016). Takođe, rezultate koji su kongruentni sa rezultatima ove studije smo dobili i u prethodnim ispitivanjima uticaja fizičke aktivnosti na podložnost nastanku konvulzija izazvanih homosistein-tiolaktonom u našoj laboratoriji (Hrncic i sar. 2013). Međutim, u literaturi postoje podaci koji nisu u skladu sa našim rezultatima. Naime, pojedine studije koje su ispitivale uticaj akutne fizičke aktivnosti na ekscitabilnost CNS su pokazale veću incidencu konvulzija kod ljudi obolelih od epilepsije, naročito onih sa fokalnim tipom epilepsija (Arida 2021). Međutim, broj takvih studija je mali, a kao glavni razlozi ovakve opservacije se navodi hipoksemija koja potencira konvulzije ili pak lična percepcija fizičke aktivnosti u vidu stresa (Kamel i sar. 2014).

S obzirom na to da smo u našoj studiji pokazali da je hiperekscitabilnost CNS posredovana i neuroinflamatornim promenama u strukturama mozga, najveći broj mehanizama koji objašnjavaju antikonvulzivni efekat hronične dozirane fizičke aktivnosti u našoj studiji bi se mogao odnositi upravo na njene efekte na različite komponente u kaskadnom procesu neuroinflamacije. Planirana i dozirana fizička aktivnost se pacijentima često preporučuje u cilju smanjenja potencijalnih štetnih efekata u stanjima organizma koja su praćena hroničnom inflamacijom (Gleeson i sar. 2011). Sa druge strane, pokazano je da eksperimentalna fizička aktivnost smanjuje ekspresiju GFAP i aktivaciju astrocita, čime se dokazuje neuroprotektivno dejstvo fizičke aktivnosti uz modulatorno dejstvo na neuroinflamaciju (Belaya i sar. 2020). Jedna eksperimentalna studija je pokazala da 3 nedelje dobrovoljne fizičke aktivnosti u vidu trčanja dovode do smanjenja hipokampalne ekspresije citokina IL-1 β i TNF- α (Nichol i sar. 2008). Slični rezultati su pokazani i eksperimentalnom studijom koja je pokazala da pretretman hroničnom aerobnom fizičkom aktivnošću na tredmilu dovodi do manje ekspresije ICAM-1 i manje leukocitne infiltracije CNS nakon eksperimentalno izazvane cerebralne ishemije kod miševa (Ding i sar. 2005). Eksperimentalne studije koje su proučavale uticaj fizičke aktivnosti kod miševa sa eksperimentalno izazvanim neurodegenerativnim bolestima CNS su pokazale da hronični aerobni trening na tredmilu dovodi do redukovane aktivacije mikroglijalnih ćelija u hipokampusu (Yi i sar. 2012).

Dakle, može se zaključiti da se modulatorni efekti hronične fizičke aktivnosti na bihevioralne alteracije poput anksioznosti i depresije, nociceptivnu percepciju i hiperekscitabilnost CNS ostvaruju dejstvom na brojne faktore koji su elementi neuroinflamatornog ili neurodegenerativnog procesa u CNS.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Hiperekscitabilnost centralnog nervnog sistema se razvila kod životinja sa eksperimentalno indukovanim CP/CPPS, što se manifestovalo njihovom povećanom podložnošću za razvoj epileptičnih napada i to kroz veću incidencu, kraći latentni period, veći intenzitet napada, kao i veći broj i duže trajanje EEG iktalnih perioda izazvanih subkonvulzivnom dozom lindana.
2. Razvoj CP/CPPS je kod životinja u našoj studiji bio praćen povećanim ispoljavanjem ponašanja povezanog sa anksioznošću, kao i ponašanja povezanog sa depresijom, na šta su ukazali rezultati etoloških testova. Sem toga, životinje sa razvijenim CP/CPPS su pokazale i smanjene kognitivne sposobnosti na šta su ukazale slabije performanse ovih životinja u bihevioralnom testu spacijalne memorije.
3. U hipokampusu, talamusu i korteksu životinja sa CP/CPPS došlo je do narušavanja redoks homeostaze i pojave oksidativnog stresa na šta je ukazao biohemijski nalaz povećane lipidne peroksidacije i smanjene antioksidativne zaštite u ovim moždanim strukturama. Nivo proinflamatornih citokina IL-1 β i IL-6 je bio povećan u talamusu i korteksu životinja sa eksperimentalno indukovanim CP/CPPS, što ukazuje na postojanje procesa neuroinflamacije u mozgu ovih životinja. Sem toga, u talamusu i korteksu ovih životinja došlo je i do povećanja ekspresije glikoproteina ICAM-1, intercelularnog adhezionog molekula na površini ćelijskih membrana endotelnih ćelija.
4. Razvoj CP/CPPS je doveo do promena hormonskog profila u serumu životinja. Životinje sa razvijenim CP/CPPS imale su povećan nivo hormona kortikosterona u serumu, što ukazuje na moguću aktivaciju HPA osovine kod ovih životinja. Serumski nivo hormona testosterona bio je snižen kod životinja sa CP/CPPS.
5. Adultna neurogeneza je bila smanjenog obima u hipokampusu životinja sa CP/CPPS na šta je ukazalo smanjenje ekspresije imunohistohemijskog markera proliferacije (Ki-67) i nezrelih (DCX) neurona kod ovih životinja. Sa druge strane, CP/CPPS je doveo do povećanja gliogeneze na šta je ukazao imunohistohemijski nalaz povećane ekspresije markera astrocita (GFAP). Takođe, smanjenje broja PV+ ćelija ukazalo je na manji broj inhibitornih interneurona u svim regionima hipokampusa životinja sa CP/CPPS.
6. Administracija CORM A1 nakon indukcije CP/CPPS dovela je kod životinja do povećanja skrotalnog praga bola, smanjenog ispoljavanja ponašanja povezanog sa anksioznošću i depresijom, te do smanjenja zapaljenskog infiltrata u prostati i umanjenja moždane hiperekscitabilnosti. Stoga je CORM-A1, donor gasotransmitera CO, imao antinociptivno, anksiolitičko, antidepresivno, antiinflamatorno i antikonvulzivno dejstvo u eksperimentalnom modelu CP/CPPS, što ukazuje na potencijalne terapijske efekte donora CO u ovom sindromu.
7. Regularna i dozirana aerobna fizička aktivnost, kod životinja koje su joj pre indukcije CP/CPPS bile izložene na tredmilu tokom 30 dana, dovela je do smanjenja ponašanja povezanog sa anksioznošću i depresijom, hiperekscitabilnosti centralnog nervnog sistema, inflamatornog odgovora u tkivu prostate i mehaničke alodinije. Modulatorni efekat hronične aerobne fizičke aktivnosti pokazan u eksperimentalnom modelu CP/CPPS ukazuje da fizičko vežbanje može biti deo nefarmakološkog terapijskog pristupa menadžmentu komorbiditeta koji se javljaju kod pacijenata sa CP/CPPS.

7. LITERATURA

A

- Abbott CR, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, Parkinson JRC, Broadhead LL, Ghatei MA, Bloom SR. The importance of acclimatisation i habituation to experimental conditions when investigating the anorectic effects of gastrointestinal hormones in the rat. *International Journal of Obesity. Int J Obes (Lond)*; 2006;30(2):288–92.
- Abdallah CG, Geha P. Chronic Pain i Chronic Stress: Two Sides of the Same Coin? *Chronic Stress*. 2017;1:247054701770476.
- Åberg A-M, Abrahamsson P, Johansson G, Haney M, Winsö O, Larsson JE. Does carbon monoxide treatment alter cytokine levels after endotoxin infusion in pigs? A randomized controlled study. *Journal of Inflammation*. 2008;5(1):13.
- Abeyrathna N, Washington K, Bashur C, Liao Y. Nonmetallic carbon monoxide releasing molecules (CORMs). *Org Biomol Chem*. 2017;15(41):8692–9.
- Aboumarzouk OM, Nelson RL. Pregabalin for chronic prostatitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(8):CD009063.
- Agasse F, Mendez-David I, Christaller W, Carpentier R, Braz BY, David DJ, Saudou F, Humbert S. Chronic Corticosterone Elevation Suppresses Adult Hippocampal Neurogenesis by Hyperphosphorylating Huntingtin. *Cell Reports*. 2020;32(1):107865.
- Ahn SG, Kim SH, Chung KI, Park KS, Cho SY, Kim HW. Depression, anxiety, stress perception, i coping strategies in korean military patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Korean J Urol*. 2012;53(9):643–8.
- Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O. Effect of acute i chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex i striatum. *Neurosci Lett*. 2009;452(3):281–5.
- Alapirtti T, Lehtimäki K, Nieminen R, Mäkinen R, Raitanen J, Moilanen E, Mäkinen J, Peltola J. The production of IL-6 in acute epileptic seizure: A video-EEG study. *Journal of Neuroimmunology*. 2018;316:50–5.
- Albani SH, Andrawis MM, Abella RJH, Fulghum JT, Vafamand N, Dumas TC. Behavior in the elevated plus maze is differentially affected by testing conditions in rats under i over three weeks of age. *Front Behav Neurosci*. 2015;9.
- Alkadhi KA, Al-Hijailan RS, Malik K, Hogan YH. Retrograde carbon monoxide is required for induction of long-term potentiation in rat superior cervical ganglion. *J Neurosci*. 2001;21(10):3515–20.
- Almeida AS, Soares NL, Vieira M, Gramsbergen JB, Vieira HLA. Carbon Monoxide Releasing Molecule-A1 (CORM-A1) Improves Neurogenesis: Increase of Neuronal Differentiation Yield by Preventing Cell Death. Dulak J, editor. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0154781.
- Almeida JA, Petriz B de A, da Costa Gomes CP, Pereira RW, Franco OL. Assessment of maximal lactate steady state during treadmill exercise in SHR. *BMC Res Notes*. 2012;5:661.
- Alvaro PK, Roberts RM, Harris JK. A Systematic Review Assessing Bidirectionality between Sleep Disturbances, Anxiety, i Depression. *Sleep*. 2013;36(7):1059–68.
- Ambrogini P, Minelli A, Galati C, Betti M, Lattanzi D, Ciffolilli S, Piroddi M, Galli F, Cuppini R. Post-Seizure α -Tocopherol Treatment Decreases Neuroinflammation i Neuronal Degeneration Induced by Status Epilepticus in Rat Hippocampus. *Mol Neurobiol*. 2014;50(1):246–56.
- Anderson RU, Orenberg EK, Chan CA, Morey A, Flores V. Psychometric profiles i hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *J Urol*. 2008;179(3):956–60.

- Anderson RU, Orenberg EK, Morey A, Chavez N, Chan CA. Stress induced hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses i disturbances in psychological profiles in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *J Urol*. 2009;182(5):2319–24.
- Angelis KD, Rodrigues B, Zanesco A, Oliveira EM de, Evangelista F de S, Coelho Junior HJ, Andreia Delbin M, Chakur Brum P, Ramires PR, Soares PP, Wichi RB, Amaral SL, Sanches IC. The importance of animal studies in Exercise Science. *Motriz: rev educ fis*. 2017;23(spe).
- Annegers JF, Rocca WA, Hauser WA. Causes of Epilepsy: Contributions of the Rochester Epidemiology Project. *Mayo Clinic Proceedings*. 1996;71(6):570–5.
- Arida RM. Physical exercise i seizure activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2021;1867(1):165979.
- Arida RM, Cavaleiro EA, da Silva AC, Scorza FA. Physical activity i epilepsy: proven i predicted benefits. *Sports Med*. 2008;38(7):607–15.
- Arisan ED, Arisan S, Kiremit MC, Tiğli H, Caşkurlu T, Palavan-Unsal N, Ergenekon E. Manganese superoxide dismutase polymorphism in chronic pelvic pain syndrome patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2006;9(4):426–31.
- Arnold MR, Greenwood BN, McArthur JA, Clark PJ, Fleshner M, Lowry CA. Effects of repeated voluntary or forced exercise on brainstem serotonergic systems in rats. *Behavioural Brain Research*. 2020;378:112237.
- Aronica E, Crino PB. Inflammation in epilepsy: Clinical observations: Inflammation in Epilepsy. *Epilepsia*. 2011;52:26–32.
- Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, van Veelen CWM, van Rijen PC, Leenstra S, Ramkema M, Scheffer GL, Scheper RJ, Troost D. Expression i cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia i glioneuronal tumors. *Neuroscience*. 2003;118(2):417–29.
- Arrant AE, Schramm-Sapyta NL, Kuhn CM. Use of the light/dark test for anxiety in adult i adolescent male rats. *Behavioural Brain Research*. 2013;256:119–27.
- Arvidson E, Dahlman AS, Börjesson M, Gullstrand L, Jonsdottir IH. The effects of exercise training on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity i autonomic response to acute stress—a randomized controlled study. *Trials*. 2020;21(1):888.
- Asakawa K, Nandachi N, Satoh S, Honma M, Namikata S, Ishii M, Yasumoto R, Nishisaka N, Masuda C, Kishimoto T. [Effects of cernitin pollen-extract (Cernilton) on inflammatory cytokines in sex-hormone-induced nonbacterial prostatitis rats]. *Hinyokika Kyo*. 2001;47(7):459–65.
- Assady M, Farahnak A, Golestani A, Esharghian M. Superoxide Dismutase (SOD) Enzyme Activity Assay in *Fasciola* spp. Parasites i Liver Tissue Extract. *Iran J Parasitol*. 2011;6(4):17–22.
- Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, Filho WJ, Lent R, Herculano-Houzel S. Equal numbers of neuronal i nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*. 2009;513(5):532–41.

B

- Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009.

- Baker MD. Protein kinase C mediates up-regulation of tetrodotoxin-resistant, persistent Na⁺ current in rat i mouse sensory neurones: PKC-pathway control of persistent Na⁺ current. *The Journal of Physiology*. 2005;567(3):851–67.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, i clinical implications. *Neurobiol Dis*. 2004;16(1):1–13.
- Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, McHugh SB, Rawlins JNP, Monyer H, Seeburg PH. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory i anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(3):181–92.
- Barker-Haliski ML, Löscher W, White HS, Galanopoulou AS. Neuroinflammation in epileptogenesis: insights i translational perspectives from new models of epilepsies. *Epilepsia*. 2017;58(Suppl 3):39–47.
- Barkhudaryan N, Dunn AJ. Molecular mechanisms of actions of interleukin-6 on the brain, with special reference to serotonin i the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neurochem Res*. 1999;24(9):1169–80.
- Bates SM, Hill VA, Anderson JB, Chapple CR, Spence R, Ryan C, Talbot MD. A prospective, randomized, double-blind trial to evaluate the role of a short reducing course of oral corticosteroid therapy in the treatment of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *BJU Int*. 2007;99(2):355–9.
- Beauchet O. Testosterone i cognitive function: current clinical evidence of a relationship. *Eur J Endocrinol*. 2006;155(6):773–81.
- Beckhauser TF, Francis-Oliveira J, De Pasquale R. Reactive Oxygen Species: Physiological i Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *J Exp Neurosci*. 2016;10(Suppl 1):23–48.
- Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CV. Maximum oxygen consumption of rats i its changes with various experimental procedures. *Journal of Applied Physiology*. 1979;47(6):1278–83.
- Beghi E. The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*. 2020;54(2):185–91.
- Behl C, Lezoualc’h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, Holsboer F. Glucocorticoids Enhance Oxidative Stress-Induced Cell Death in Hippocampal Neurons *in Vitro*. *Endocrinology*. 1997;138(1):101–6.
- Bei Y, Wang L, Ding R, Che L, Fan Z, Gao W, Liang Q, Lin S, Liu S, Lu X, Shen Y, Wu G, Yang J, Zhang G, Zhao W, Guo L, Xiao J. Animal exercise studies in cardiovascular research: Current knowledge i optimal design—A position paper of the Committee on Cardiac Rehabilitation, Chinese Medical Doctors’ Association. *Journal of Sport i Health Science*. 2021;10(6):660–74.
- Belaya I, Ivanova M, Sorvari A, Ilicic M, Loppi S, Koivisto H, Varricchio A, Tikkanen H, Walker FR, Atalay M, Malm T, Grubman A, Tanila H, Kanninen KM. Astrocyte remodeling in the beneficial effects of long-term voluntary exercise in Alzheimer’s disease. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):271.
- Belujon P, Grace AA. Dopamine System Dysregulation in Major Depressive Disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017;20(12):1036–46.
- Benedetti B, Matyash V, Kettenmann H. Astrocytes control GABAergic inhibition of neurons in the mouse barrel cortex: Astrocytes inhibit cortical neurons. *The Journal of Physiology*. 2011;589(5):1159–72.
- Bergamini MR, Bernardi MM, Sufredini IB, Ciaramicoli MT, Kodama RM, Kabadayan F, Saraceni CHC. Dentin hypersensitivity induces anxiety i increases corticosterone serum levels in rats. *Life Sciences*. 2014;98(2):96–102.
- Bergman J, Zeitlin SI. Prostatitis i chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2007;7(3):301–7.

- Berna C, Leknes S, Holmes EA, Edwards RR, Goodwin GM, Tracey I. Induction of depressed mood disrupts emotion regulation neurocircuitry i enhances pain unpleasantness. *Biol Psychiatry*. 2010;67(11):1083–90.
- Bhalsing KS, Abbas MM, Tan LCS. Role of Physical Activity in Parkinson’s Disease. *Ann Indian Acad Neurol*. 2018;21(4):242–9.
- Biedermann SV, Biedermann DG, Wenzlaff F, Kurjak T, Nouri S, Auer MK, Wiedemann K, Briken P, Haaker J, Lonsdorf TB, Fuss J. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. *BMC Biol*. 2017;15(1):125.
- Binder MR. Emergent Success of GABA Modulators Links Neuronal Hyperexcitability to the Pathophysiology of Depression. *American Journal of Psychiatry i Neuroscience*. Science Publishing Group; 2022;10(3):134.
- Binshtok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Vardeh D, Shi L, Brenner GJ, Ji R-R, Bean BP, Woolf CJ, Samad TA. Nociceptors Are Interleukin-1 Sensors. *Journal of Neuroscience*. 2008;28(52):14062–73.
- Blair JA, McGee H, Bhatta S, Palm R, Casadesus G. Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis Involvement in Learning i Memory i Alzheimer’s Disease: More than “Just” Estrogen. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:45.
- Blaszczak P, Turski WA. Excitatory amino acid antagonists alleviate convulsive i toxic properties of lindane in mice. *Pharmacol Toxicol*. 1998;82(3):137–41.
- Blok BFM. Central pathways controlling micturition i urinary continence. *Urology*. 2002;59(5 Suppl 1):13–7.
- Boehm BJ, Colopy SA, Jerde TJ, Loftus CJ, Bushman W. Acute bacterial inflammation of the mouse prostate. *The Prostate*. 2012;72(3):307–17.
- Bogdanova OV, Kanekar S, D’Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav*. 2013;118:227–39.
- von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 2007;329(3):409–20.
- Boiko DI, Skrypnikov AM, Shkodina AD, Hasan MM, Ashraf GMd, Rahman MdH. Circadian rhythm disorder i anxiety as mental health complications in post-COVID-19. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(19):28062–9.
- Boison D. Adenosine dysfunction in epilepsy. *Glia*. 2012;60(8):1234–43.
- Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frecherro N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G. Comparison of the value of PCNA i Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumor. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(2):e174–9.
- Bölükbas I, Mundorf A, Freund N. Maternal separation in rats induces neurobiological i behavioral changes on the maternal side. *Sci Rep*. 2020;10:22431.
- Bond SL, Greco-Otto P, Sides R, Kwong GPS, Léguillette R, Bayly WM. Assessment of two methods to determine the relative contributions of the aerobic i anaerobic energy systems in racehorses. *Journal of Applied Physiology*. 2019;126(5):1390–8.
- Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. Dissociation of ACTH i glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(5):175–80.
- Borowicz-Reutt KK, Czuczwar SJ. Role of oxidative stress in epileptogenesis i potential implications for therapy. *Pharmacol Rep*. 2020;72(5):1218–26.
- Borsook D. Neurological diseases i pain. *Brain*. 2012;135(Pt 2):320–44.

- Bouayed J, Soulimani R. Evidence that hydrogen peroxide, a component of oxidative stress, induces high-anxiety-related behaviour in mice. *Behavioural Brain Research*. 2019;359:292–7.
- Boudarene M, Legros JJ, Timsit-Berthier M. [Study of the stress response: role of anxiety, cortisol i DHEAs]. *Encephale*. 2002;28(2):139–46.
- Bovetto S, Rouillard C, Richard D. Role of CRH in the effects of 5-HT-receptor agonists on food intake i metabolic rate. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative i Comparative Physiology*. American Physiological Society; 1996;271(5 40-5).
- Brahmachari S, Fung YK, Pahan K. Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *J Neurosci*. 2006;26(18):4930–9.
- Breser ML, Motrich RD, Sanchez LR, Mackern-Oberti JP, Rivero VE. Expression of CXCR3 on Specific T Cells Is Essential for Homing to the Prostate Gland in an Experimental Model of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Jl*. 2013;190(7):3121–33.
- Breser ML, Salazar FC, Rivero VE, Motrich RD. Immunological Mechanisms Underlying Chronic Pelvic Pain i Prostate Inflammation in Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Front Immunol*. 2017;8:898.
- Brooks GA, White TP. Determination of metabolic i heart rate responses of rats to treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*. 1978;45(6):1009–15.
- Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med*. 2000;192(7):1015–26.
- Brünahl C, Dybowski C, Albrecht R, Riegel B, Höink J, Fisch M, Löwe B. Mental disorders in patients with chronic pelvic pain syndrome (CPPS). *J Psychosom Res*. 2017;98:19–26.
- Brünahl CA, Klotz SGR, Dybowski C, Riegel B, Gregorzik S, Tripp DA, Ketels G, Löwe B. Combined Cognitive-Behavioural i Physiotherapeutic Therapy for Patients with Chronic Pelvic Pain Syndrome (COMBI-CPPS): study protocol for a controlled feasibility trial. *Trials*. 2018;19:20.
- Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, i tumorigenesis. *J Leukoc Biol*. 2020;108(3):787–99.
- Busch AJ, Webber SC, Brachaniec M, Bidonde J, Bello-Haas VD, Danyliw AD, Overend TJ, Richards RS, Sawant A, Schachter CL. Exercise Therapy for Fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep*. 2011;15(5):358–67.

C

- Calhoon GG, Tye KM. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nat Neurosci*. 2015;18(10):1394–404.
- Çalışkan G, Müller I, Semtner M, Winkelmann A, Raza AS, Hollnagel JO, Rösler A, Heinemann U, Stork O, Meier JC. Identification of Parvalbumin Interneurons as Cellular Substrate of Fear Memory Persistence. *Cereb Cortex*. 2016;26(5):2325–40.
- Campbell BM, Charych E, Lee AW, Möller T. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front Neurosci*. 2014;8.
- Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The Mouse Forced Swim Test. *J Vis Exp*. 2012;(59):3638.
- Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(4):864–71.

- Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev.* 2006;213(1):48–65.
- Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause K-H. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation i neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005;48(1):16–42.
- Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, i physical fitness: definitions i distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 1985;100(2):126–31.
- Catena-Dell’Osso M, Bellantuono C, Consoli G, Baroni S, Rotella F, Marazziti D. Inflammatory i neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development? *Curr Med Chem.* 2011;18(2):245–55.
- Chandrasekaran A, Avci HX, Leist M, Kobolák J, Dinnyés A. Astrocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: New Tools for Neurological Disorder Research. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2016;10.
- Chaskiel L, Bristow AD, Bluthé RM, Dantzer R, Blomqvist A, Konsman JP. Interleukin-1 reduces food intake i body weight in rat by acting in the arcuate hypothalamus. *Brain, Behavior, i Immunity.* Academic Press Inc.; 2019;81:560–73.
- Chen C-S, Chang P-J, Lin W-Y, Huang Y-C, Ho D-R. Evidences of the inflammasome pathway in chronic prostatitis i chronic pelvic pain syndrome in an animal model. *The Prostate.* 2013;73(4):391–7.
- Chen J, Song H, Ruan J, Lei Y. Prostatic protective nature of the flavonoid-rich fraction from *Cyclosorus acuminatus* on carrageenan-induced non-bacterial prostatitis in rat. *Pharmaceutical Biology.* 2014;52(4):491–7.
- Chen L, Chen J, Mo F, Bian Z, Jin C, Chen X, Liang C. Genetic Polymorphisms of IFNG, IFNGR1, i Androgen Receptor i Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome in a Chinese Han Population. *Dis Markers.* 2021;2021:2898336.
- Chen L, Sooranna SR, Lei K, Kandola M, Bennett PR, Liang Z, Grammatopoulos D, Johnson MR. Cyclic AMP increases COX-2 expression via mitogen-activated kinase in human myometrial cells. *J Cell Mol Med.* 2012;16(7):1447–60.
- Chen X, Zhou Z, Qiu X, Wang B, Dai J. The Effect of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome (CP/CPSP) on Erectile Function: A Systematic Review i Meta-Analysis. Eldabe S, editor. *PLoS ONE.* 2015;10(10):e0141447.
- Chen Y, Wu X, Liu J, Tang W, Zhao T, Zhang J. Effects of a 6-month course of tamsulosin for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a multicenter, randomized trial. *World J Urol.* 2011;29(3):381–5.
- Chiechio S, Zammataro M, Caraci F, Rampello L, Copani A, Sabato AF, Nicoletti F. Pregabalin in the treatment of chronic pain: an overview. *Clin Drug Investig.* 2009;29(3):203–13.
- Cho I-C, Min SK. Proposed New Pathophysiology of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Urogenit Tract Infect.* 2015;10(2):92.
- Choi J, Nordli DR, Alden TD, DiPatri A, Laux L, Kelley K, Rosenow J, Schuele SU, Rajaram V, Koh S. Cellular injury i neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *J Neuroinflammation.* 2009;6(1):38.
- Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci.* 2000;3(1):15–21.
- Chora AA, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, Lee LY, Sobel RA, Steinman L, Soares MP. Heme oxygenase-1 i carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest.* 2007;117(2):438–47.

- Chuang Y-C, Yoshimura N, Huang C-C, Wu M, Chiang P-H, Chancellor MB. Intraprostatic botulinum toxin a injection inhibits cyclooxygenase-2 expression i suppresses prostatic pain on capsaicin induced prostatitis model in rat. *J Urol*. 2008;180(2):742–8.
- Chuang Y-C, Yoshimura N, Wu M, Huang C-C, Chiang P-H, Tyagi P, Chancellor MB. Intraprostatic Capsaicin Injection as a Novel Model for Nonbacterial Prostatitis i Effects of Botulinum Toxin A. *European Urology*. 2007;51(4):1119–27.
- Chung S-D, Huang C-C, Lin H-C. Chronic prostatitis i depressive disorder: a three year population-based study. *J Affect Disord*. 2011;134(1–3):404–9.
- Chung S-D, Lin H-C. Association between Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome i Anxiety Disorder: A Population-Based Study. *PLoS One*. 2013;8(5).
- Clemens JQ. Male i Female Pelvic Pain Disorders—Is it All in Their Heads? *Journal of Urology*. 2008;179(3):813–4.
- Clemens JQ, Brown SO, Calhoun EA. Mental Health Diagnoses in Patients With Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome i Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Case/Control Study. *Journal of Urology*. 2008a;180(4):1378–82.
- Clemens JQ, Brown SO, Calhoun EA. Mental health diagnoses in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome i chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a case/control study. *J Urol*. 2008b;180(4):1378–82.
- Clemens JQ, Meenan RT, O’Keeffe Rosetti MC, Kimes T, Calhoun EA. Prevalence of i risk factors for prostatitis: population based assessment using physician assigned diagnoses. *J Urol*. 2007;178(4 Pt 1):1333–7.
- Clemens JQ, Meenan RT, Rosetti MCO, Brown SO, Gao SY, Calhoun EA. PREVALENCE OF INTERSTITIAL CYSTITIS SYMPTOMS IN A MANAGED CARE POPULATION. *Journal of Urology*. 2005;174(2):576–80.
- Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms i their clinical implications. *BMJ*. 2014;348(feb05 6):f7656–f7656.
- Collo G, Cavalleri L, Spano P. Structural plasticity in mesencephalic dopaminergic neurons produced by drugs of abuse: critical role of BDNF i dopamine. *Front Pharmacol*. 2014;5.
- Condorelli RA, Calogero AE, La Vignera S. Hyperestrogenism i low serum testosterone-17 β -estradiol ratio are associated with non-bacterial male accessory gland inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol*. SAGE Publications Ltd; 2016;29(3):488–93.
- Conrad CD. Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Rev Neurosci*. 2008;19(6):395–411.
- Cortese GP, Barrientos RM, Maier SF, Patterson SL. Aging i a Peripheral Immune Challenge Interact to Reduce Mature Brain-Derived Neurotrophic Factor i Activation of TrkB, PLC 1, i ERK in Hippocampal Synaptoneurosomes. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(11):4274–9.
- Crane NA, Chang F, Kinney KL, Klumpp H. Individual differences in striatal i amygdala response to emotional faces are related to symptom severity in social anxiety disorder. *Neuroimage Clin*. 2021;30:102615.
- Crestani CC, Alves FH, Gomes FV, Resstel LB, Correa FM, Herman JP. Mechanisms in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Involved in Control of Autonomic i Neuroendocrine Functions: A Review. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(2):141–59.
- Cryan JF, Mombereau C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry*. 2004;9(4):326–57.
- Crystal JD. Prospective cognition in rats. *Learn Motiv*. 2012;43(4):181–91.

Czeh B, Simon M, van der Hart MG, Schmelting B, Hesselink MB, Fuchs E. Chronic Stress Decreases the Number of Parvalbumin-Immunoreactive Interneurons in the Hippocampus: Prevention by Treatment with a Substance P Receptor (NK1) Antagonist. *Neuropsychopharmacol.* 2005;30(1):67–79.

D

Da Silva Santos R, Galdino G. Endogenous systems involved in exercise-induced analgesia. *J Physiol Pharmacol.* 2018;69(1):3–13.

Dalvi SM, Patil VW, Ramraje NN. The Roles of Glutathione, Glutathione Peroxidase, Glutathione Reductase i the Carbonyl Protein in Pulmonary i Extra Pulmonary Tuberculosis. *J Clin Diagn Res.* 2012;6(9):1462–5.

Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) i response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science.* 2014;2.

Das Sarma J. Microglia-mediated neuroinflammation is an amplifier of virus-induced neuropathology. *J Neurovirol.* 2014;20(2):122–36.

David Y, Cacheaux LP, Ivens S, Lapilover E, Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Astrocytic Dysfunction in Epileptogenesis: Consequence of Altered Potassium i Glutamate Homeostasis? *Journal of Neuroscience.* 2009;29(34):10588–99.

Davis M, Walker DL, Lee Y. Roles of the amygdala i bed nucleus of the stria terminalis in fear i anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;821:305–31.

De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):256–69.

Deacon RMJ. Hyponeophagia: a measure of anxiety in the mouse. *J Vis Exp.* 2011;(51):2613.

Delprato A, Xiao E, Manoj D. Connecting DCX, COMT i FMR1 in social behavior i cognitive impairment. *Behav Brain Funct.* 2022;18(1):7.

Deng G-C, Lu M, Zhao Y-Y, Yuan Y, Chen G. Activated spinal astrocytes contribute to the later phase of carrageenan-induced prostatitis pain. *Journal of Neuroinflammation.* 2019;16(1):189.

Deshane J, Wright M, Agarwal A. Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(2):273–84.

Desireddi NV, Campbell PL, Stern JA, Sobkoviak R, Chuai S, Shahrara S, Thumbikat P, Pope RM, Landis JR, Koch AE, Schaeffer AJ. Monocyte Chemoattractant Protein-1 i Macrophage Inflammatory Protein-1 α as Possible Biomarkers for the Chronic Pelvic Pain Syndrome. *The Journal of Urology.* 2008;179(5):1857–62.

Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia i epilepsy: excitability i inflammation. *Trends in Neurosciences.* 2013;36(3):174–84.

Di Filippo M, Chiasserini D, Gardoni F, Viviani B, Tozzi A, Giampà C, Costa C, Tantucci M, Zianni E, Boraso M, Siliquini S, de Iure A, Ghiglieri V, Colcelli E, Baker D, Sarchielli P, Fusco FR, Di Luca M, Calabresi P. Effects of central i peripheral inflammation on hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of Disease.* 2013;52:229–36.

Diamant G, Dikstein R. Transcriptional Control by NF- κ B: Elongation in Focus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* 2013;1829(9):937–45.

- Dickerson BC, Salat DH, Greve DN, Chua EF, Rand-Giovannetti E, Rentz DM, Bertram L, Mullin K, Tanzi RE, Blacker D, Albert MS, Sperling RA. Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging i AD. *Neurology*. 2005;65(3):404–11.
- Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1978;45(6):927-32.
- Dimitrakov J, Joffe H V., Soldin SJ, Bolus R, Buffington CAT, Nickel JC. Adrenocortical Hormone Abnormalities in Men with Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Urology*. 2008a;71(2):261–6.
- Dimitrakov J, Joffe HV, Soldin SJ, Bolus R, Buffington CAT, Nickel JC. Adrenocortical Hormone Abnormalities in Men with Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Urology*. 2008b;71(2):261–6.
- Ding Y-H, Young CN, Luan X, Li J, Rafols JA, Clark JC, McAllister JP, Ding Y. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathol*. 2005;109(3):237–46.
- Dishman RK, Bunnell BN, Youngstedt SD, Yoo HS, Mougey EH, Meyerhoff JL. Activity wheel running blunts increased plasma adrenocorticotrophin (ACTH) after footshock i cage-switch stress. *Physiol Behav*. 1998;63(5):911–7.
- Doherty A, Forés Miravalles A. Physical Activity i Cognition: Inseparable in the Classroom. *Frontiers in Education*. 2019;4.
- Doiron RC, Nickel JC. Evaluation of the male with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Can Urol Assoc J*. 2018;12(6 Suppl 3):S152–4.
- Donadio AC, Depiante-Depaoli M. Inflammatory cells i MHC class II antigens expression in prostate during time-course experimental autoimmune prostatitis development. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;85(2):158–65.
- Done JD, Rudick CN, Quick ML, Schaeffer AJ, Thumbikat P. Role of mast cells in male chronic pelvic pain. *J Urol*. 2012;187(4):1473–82.
- Dousset JC, Trouilh M, Foglietti MJ. Plasma malonaldehyde levels during myocardial infarction. *Clin Chim Acta*. 1983;129(3):319–22.
- Drach GW, Fair WR, Meares EM, Stamey TA. Classification of Benign Diseases Associated with Prostatic Pain: Prostatitis or Prostatodynia? *Journal of Urology*. 1978;120(2):266–266.
- Dremencov E, Csatlósová K, Ďurišová B, Moravčíková L, Lacinová Ľ, Ježová D. Effect of Physical Exercise i Acute Escitalopram on the Excitability of Brain Monoamine Neurons: In Vivo Electrophysiological Study in Rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017;20(7):585–92.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47–95.
- Du H, Chen X, Zhang L, Liu Y, Zhan C, Chen J, Wang H, Yu Z, Liang C. Experimental Autoimmune Prostatitis Induces Learning-Memory Impairment i Structural Neuroplastic Changes in Mice. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;40(1):99–111.
- Du H-X, Chen X-G, Zhang L, Liu Y, Zhan C-S, Chen J, Zhang Y, Yu Z-Q, Zhang J, Yang H-Y, Zhong K, Liang C-Z. Microglial activation i neurobiological alterations in experimental autoimmune prostatitis-induced depressive-like behavior in mice. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2019;15:2231–45.
- Duman RS. Pathophysiology of depression i innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. Taylor & Francis; 2014;16(1):11–27.

- Dun R, Tsai J, Hu X, Mao J, Zhu W, Qi G, Peng Y. A systematic review of cross-cultural adaptation of the National Institutes of Health Chronic Prostatitis Symptom Index. *Health Qual Life Outcomes*. 2021;19:159.
- Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *The Lancet*. 2006;367(9516):1087–100.
- Dunn AJ. Cytokine Activation of the HPA Axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;917(1):608–17.
- Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, i where? *Journal of Leukocyte Biology*. 2013;94(4):657–70.
- Duque E de A, Munhoz CD. The Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids in the Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:78.
- Duval ER, Javanbakht A, Liberzon I. Neural circuits in anxiety i stress disorders: a focused review. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;11:115–26.
- Dybowski C, Löwe B, Brünahl C. Predictors of pain, urinary symptoms i quality of life in patients with chronic pelvic pain syndrome (CPPS): A prospective 12-month follow-up study. *J Psychosom Res*. 2018;112:99–106.

E

- Egan KJ, Krieger JN. Psychological problems in chronic prostatitis patients with pain. *Clin J Pain*. 1994;10(3):218–26.
- Eid T, Behar K, Dhaher R, Bumanglag AV, Lee T-SW. Roles of Glutamine Synthetase Inhibition in Epilepsy. *Neurochem Res*. 2012;37(11):2339–50.
- Eisch AJ, Petrik D. Depression i Hippocampal Neurogenesis: A Road to Remission? *Science*. 2012;338(6103):72–5.
- Ejchel-Cohen TF, Wood GE, Wang JF, Barlow K, Nobrega JN, S McEwen B, Trevor Young L. Chronic restraint stress decreases the expression of glutathione S-transferase pi2 in the mouse hippocampus. *Brain Res*. 2006;1090(1):156-62.
- Ellacott KLJ, Morton GJ, Woods SC, Tso P, Schwartz MW. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metabolism*. Cell Press; 2010. p. 10–7.
- El-Sayed S, Hassan M, Ibrahim M, Elbassuoni E, Aziz N. Modified endogenous carbon monoxide production through modulation of heme oxygenase activity alters some aspects of the cold restraint stress response in male albino rats. *Endo*. 2012;46(04):205–15.
- El Assar M, Angulo J, Rodríguez-Mañas L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:380-401.
- Endedijk HM, Nelemans SA, Schür RR, Boks MPM, Lier P van, Meeus W, Branje S, Vinkers CH. The Role of Stress i Mineralocorticoid Receptor Haplotypes in the Development of Symptoms of Depression i Anxiety During Adolescence. *Frontiers in Psychiatry*. 2020;11.
- Engeler DS, Baranowski AP, Dinis-Oliveira P, Elneil S, Hughes J, Messelink EJ, van Ophoven A, Williams AC. The 2013 EAU Guidelines on Chronic Pelvic Pain: Is Management of Chronic Pelvic Pain a Habit, a Philosophy, or a Science? 10 Years of Development. *European Urology*. 2013;64(3):431–9.

Ercan AC, Bahceci B, Polat S, Cenker OC, Bahceci I, Koroglu A, Sahin K, Hocaoglu C. Oxidative status i prolidase activities in generalized anxiety disorder. *Asian Journal of Psychiatry*. 2017;25:118–22.

Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1254–66.

F

Fabene PF, Mora GN, Martinello M, Rossi B, Merigo F, Ottoboni L, Bach S, Angiari S, Benati D, Chakir A, Zanetti L, Schio F, Osculati A, Marzola P, Nicolato E, Homeister JW, Xia L, Lowe JB, McEver RP, Osculati F, Sbarbati A, Butcher EC, Constantin G. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat Med*. 2008;14(12):1377–83.

Fabis MJ, Phares TW, Kean RB, Koprowski H, Hooper DC. Blood–brain barrier changes i cell invasion differ between therapeutic immune clearance of neurotrophic virus i CNS autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(40):15511–6.

Fagone P, Mazzon E, Bramanti P, Bendtzen K, Nicoletti F. Gasotransmitters i the immune system: Mode of action i novel therapeutic targets. *European Journal of Pharmacology*. 2018;834:92–102.

Fan L-W, Pang Y. Dysregulation of neurogenesis by neuroinflammation: key differences in neurodevelopmental i neurological disorders. *Neural Regen Res*. 2017;12(3):366–71.

Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) i the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis*. 2004;9(1):27–35.

Farmer MA, Chanda ML, Parks EL, Baliki MN, Apkarian AV, Schaeffer AJ. Brain functional i anatomical changes in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *J Urol*. 2011;186(1):117–24.

Fedoce A das G, Ferreira F, Bota RG, Bonet-Costa V, Sun PY, Davies KJA. The role of oxidative stress in anxiety disorder: cause or consequence? *Free Radical Research*. 2018;52(7):737–50.

Fehrenbach E, Niess AM. Role of heat shock proteins in the exercise response. *Exerc Immunol Rev*. 1999;5:57–77.

Felger JC, Lotrich FE. Inflammatory Cytokines in Depression: Neurobiological Mechanisms i Therapeutic Implications. *Neuroscience*. 2013;246:199–229.

Fidalgo AR, Cibelli M, White JPM, Nagy I, Noormohamed F, Benzonana L, Maze M, Ma D. Peripheral orthopaedic surgery down-regulates hippocampal brain-derived neurotrophic factor i impairs remote memory in mouse. *Neuroscience*. 2011;190:194–9.

Fijal B, Perlis RH, Heinloth AN, Houston JP. The association of single nucleotide polymorphisms in the catechol-O-methyltransferase gene i pain scores in female patients with major depressive disorder. *J Pain*. 2010;11(9):910–5, 915.e1-9.

File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol*. 1978;62(1):19–24.

Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011;194(1):7–15.

Fisher RS, Boas W van E, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J. Epileptic Seizures i Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) i the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005;46(4):470–2.

- Foll C Le, Johnson MD, Dunn-Meynell AA, Boyle CN, Lutz TA, Levin BE. Amylin-induced central IL-6 production enhances ventromedial hypothalamic leptin signaling. *Diabetes*. American Diabetes Association Inc.; 2015;64(5):1621–31.
- Foster SC, Daniels C, Bourdette DN, Bebo BF. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in experimental autoimmune encephalomyelitis i multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003;140(1–2):78–87.
- Franco JVA, Turk T, Jung JH, Xiao Y-T, Iakhno S, Garrote V, Vietto V. Non-pharmacological interventions for treating chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a Cochrane systematic review. *BJU Int*. 2019;124(2):197–208.
- Frank S, Veit R, Sauer H, Enck P, Friederich H-C, Unholzer T, Bauer U-M, Linder K, Heni M, Fritsche A, Preissl H. Dopamine Depletion Reduces Food-Related Reward Activity Independent of BMI. *Neuropsychopharmacol*. Nature Publishing Group; 2016;41(6):1551–9.
- Friedman BH. Feelings i the body: The Jamesian perspective on autonomic specificity of emotion. *Biological Psychology*. 2010;84(3):383–93.
- Fu W, Zhou Z, Liu S, Li Q, Yao J, Li W, Yan J. The Effect of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome (CP/CPPS) on Semen Parameters in Human Males: A Systematic Review i Meta-Analysis. Thumbikat P, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e94991.

G

- Galic MA, Riazi K, Pittman QJ. Cytokines i brain excitability. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2012;33(1):116–25.
- Gallo L. Effectiveness of diet, sexual habits i lifestyle modifications on treatment of chronic pelvic pain syndrome. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2014;17(3):238–45.
- Gao J, Gao P, Hao Z, Zhou Z, Liu J, Li H, Xing J, Zhou Z, Deng C, Deng L, Wei Q, Zhang X, Zhou J, Fan S, Tai S, Yang C, Shi K, Huang Y, Ye Z, Liang C. Comparison of National Institutes of Health-Chronic Prostatitis Symptom Index with International Index of Erectile Function 5 in Men with Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Large Cross-Sectional Study in China. *BioMed Research International*. 2015;2015:1–6.
- Garbi M de OSS, Hortense P, Gomez RRF, da Silva T de CR, Castanho ACF, Sousa FAEF. Pain intensity, disability i depression in individuals with chronic back pain1. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2014;22(4):569–75.
- Gartside SE, Yurttaser AE, Burns AL, Jovanović N, Smith KJ, Amegashiti NS, Olthof BMJ. A role for nitric oxide in serotonin neurons of the midbrain raphe nuclei. *Eur J Neurosci*. 2020;51(9):1881–99.
- Gaweł S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. *Wiad Lek*. 2004;57(9–10):453–5.
- Gendelman HE. Neural Immunity: Friend or Foe? *J Neurovirol*. 2002;8(6):474–9.
- Geneen LJ, Moore RA, Clarke C, Martin D, Colvin LA, Smith BH. Physical activity i exercise for chronic pain in adults: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;2017(4):CD011279.
- Giubilei G, Mondaini N, Minervini A, Saieva C, Lapini A, Serni S, Bartoletti R, Carini M. Physical Activity of Men With Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome Not Satisfied With Conventional Treatments—Could it Represent a Valid Option? The Physical Activity i Male Pelvic Pain Trial: A Double-Blind, Randomized Study. *Journal of Urology*. 2007;177(1):159–65.

- Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms i implications for the prevention i treatment of disease. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2011;11(9):607–15.
- Godavarthi SK, Dey P, Maheshwari M, Jana NR. Defective glucocorticoid hormone receptor signaling leads to increased stress i anxiety in a mouse model of Angelman syndrome. *Hum Mol Genet*. 2012;21(8):1824–34.
- Godukhin OV, Levin SG, Parnyshkova EYu. The Effects of Interleukin-10 on the Development of Epileptiform Activity in the Hippocampus Induced by Transient Hypoxia, Bicuculline, i Electrical Kindling. *Neurosci Behav Physiol*. 2009;39(7):625–31.
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):126–31
- Gomez-Sanchez E. Brain mineralocorticoid receptors in cognition i cardiovascular homeostasis. *Steroids*. 2014;91:20–31.
- Gordon KE, Dooley JM. Food insecurity i epilepsy in a nationally representative sample. *Epilepsy & Behavior*. 2015;43:139–42.
- Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Letters*. 2011;585(23):3798–805.
- Gray JA, MacNaughton N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. second edition. Oxford New York: Oxford University Press; 2003.
- Greenberg JA, Burke JF, Haque R, Kahana MJ, Zaghoul KA. Decreases in theta i increases in high frequency activity underlie associative memory encoding. *NeuroImage*. 2015;114:257–63.
- Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC. Mechanisms of Stress-induced Visceral Pain. *J Neurogastroenterol Motil*. 2018;24(1):7–18.
- Grinberg K, Sela Y, Nissanholtz-Gannot R. New Insights about Chronic Pelvic Pain Syndrome (CPPS). *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(9):E3005.
- Guan Y-F, Huang G-B, Xu M-D, Gao F, Lin S, Huang J, Wang J, Li Y-Q, Wu C-H, Yao S, Wang Y, Zhang Y-L, Teoh J, Xuan A, Sun X-D. Anti-depression effects of ketogenic diet are mediated via the restoration of microglial activation i neuronal excitability in the lateral habenula. *Brain, Behavior, i Immunity*. 2020;88:748–62.
- Günzler WA, Kremers H, Flohé L. An Improved Coupled Test Procedure for Glutathione Peroxidase (EC 1.11.1.9.) in Blood. *Clinical Chemistry i Laboratory Medicine*. 1974;12(10).

H

- Haj-Yasein NN, Jensen V, Vindedal GF, Gundersen GA, Klungland A, Ottersen OP, Hvalby Ø, Nagelhus EA. Evidence that compromised K⁺ spatial buffering contributes to the epileptogenic effect of mutations in the human kir4.1 gene (KCNJ10). *Glia*. 2011;59(11):1635–42.
- Hanafy KA, Oh J, Otterbein LE. Carbon Monoxide i the Brain: Time to Rethink the Dogma. *Curr Pharm Des*. 2013;19(15):2771–5.
- Hannibal KE, Bishop MD. Chronic Stress, Cortisol Dysfunction, i Pain: A Psychoneuroendocrine Rationale for Stress Management in Pain Rehabilitation. *Physical Therapy*. 2014;94(12):1816–25.
- Harkness JH, Bushana PN, Todd RP, Clegern WC, Sorg BA, Wisor JP. Sleep disruption elevates oxidative stress in parvalbumin-positive cells of the rat cerebral cortex. *Sleep*. 2019;42(1).

- Harpaz I, Abutbul S, Nemirovsky A, Gal R, Cohen H, Monsonego A. Chronic exposure to stress predisposes to higher autoimmune susceptibility in C57BL/6 mice: Glucocorticoids as a double-edged sword. *European Journal of Immunology*. 2013;43(3):758–69.
- Harper DE, Ichesco E, Schrepf A, Halvorson M, Puiu T, Clauw DJ, Harris RE, Harte SE. Relationships between brain metabolite levels, functional connectivity, i negative mood in urologic chronic pelvic pain syndrome patients compared to controls: A MAPP research network study. *NeuroImage: Clinical*. 2018;17:570–8.
- Harris MT, Feldberg RS, Lau KM, Lazarus NH, Cochrane DE. Expression of proinflammatory genes during estrogen-induced inflammation of the rat prostate. *Prostate*. 2000;44(1):19–25.
- Harter CJL, Kavanagh GS, Smith JT. The role of kisspeptin neurons in reproduction i metabolism. *J Endocrinol*. 2018;238(3):R173–83.
- Haskell WL, Lee I-M, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, Bauman A. Physical activity i public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine i the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(8):1423–34.
- Hassan W, Barroso Silva C, Mohammadzai IU, Teixeira da Rocha J, Landeira-Fernandez J. Association of Oxidative Stress to the Genesis of Anxiety: Implications for Possible Therapeutic Interventions. *CN*. 2014;12(2):120–39.
- Hauger RL, Saelzler UG, Pagadala MS, Panizzon MS. The role of testosterone, the androgen receptor, i hypothalamic-pituitary–gonadal axis in depression in ageing Men. *Rev Endocr Metab Disord*. 2022;
- Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*. 2004;336(2):241–50.
- ter Heegde F, De Rijk RH, Vinkers CH. The brain mineralocorticoid receptor i stress resilience. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;52:92–110.
- Heijnen S, Hommel B, Kibele A, Colzato LS. Neuromodulation of Aerobic Exercise—A Review. *Frontiers in Psychology*. 2016;6.
- Heinemann SH, Hoshi T, Westerhausen M, Schiller A. Carbon monoxide – physiology, detection i controlled release. *Chem Commun (Camb)*. 2014;50(28):3644–60.
- Heise C, Taha E, Murru L, Ponzoni L, Cattaneo A, Guarnieri FC, Montani C, Mossa A, Vezzoli E, Ippolito G, Zapata J, Barrera I, Ryazanov AG, Cook J, Poe M, Stephen MR, Kopanitsa M, Benfante R, Rusconi F, Braida D, Francolini M, Proud CG, Valtorta F, Passafaro M, Sala M, Bachi A, Verpelli C, Rosenblum K, Sala C. eEF2K/eEF2 Pathway Controls the Excitation/Inhibition Balance i Susceptibility to Epileptic Seizures. *Cerebral Cortex*. 2016;bhw075.
- Hennessy MB, Chun K, Capitanio JP. Depressive-like behavior, its sensitization, social buffering, i altered cytokine responses in rhesus macaques moved from outdoor social groups to indoor housing. *Soc Neurosci*. 2017;12(1):65–75.
- Herati AS, Shorter B, Srinivasan AK, Tai J, Seideman C, Lesser M, Moldwin RM. Effects of foods i beverages on the symptoms of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urology*. 2013;82(6):1376–80.
- Herzog AG, Fowler KM, Sperling MR, Massaro JM, Progesterone Trial Study Group. Distribution of seizures across the menstrual cycle in women with epilepsy. *Epilepsia*. 2015;56(5):e58–62.

- Hetrick DC, Ciol MA, Rothman I, Turner JA, Frest M, Berger RE. Musculoskeletal dysfunction in men with chronic pelvic pain syndrome type III: a case-control study. *J Urol.* 2003;170(3):828–31.
- Hettiarachchi N, Dallas M, Al-Owais M, Griffiths H, Hooper N, Scragg J, Boyle J, Peers C. Heme oxygenase-1 protects against Alzheimer's amyloid- β (1-42)-induced toxicity via carbon monoxide production. *Cell Death Dis.* 2014;5(12):e1569.
- Ho Y-H, Lin Y-T, Wu C-WJ, Chao Y-M, Chang AYW, Chan JYH. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation i oxidative stress in the hippocampus. *Journal of Biomedical Science.* 2015;22(1).
- Hong CY, Park JH, Ahn RS, Im SY, Choi H-S, Soh J, Mellon SH, Lee K. Molecular Mechanism of Suppression of Testicular Steroidogenesis by Proinflammatory Cytokine Tumor Necrosis Factor Alpha. *Mol Cell Biol.* 2004;24(7):2593–604.
- Hoogland ICM, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation i microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015;12(1):114.
- Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y. Electrical stimulation of afferent vagus nerve induces IL-1 β expression in the brain i activates HPA axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(1):R141-147.
- Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety i comorbid disorders. *Neuroscience Research.* 2010;68(4):261–75.
- Hrnčić D. *Sleep, Nutrition i Physical Activity in Regulation of Brain Hyperexcitability.* Belgrade: Zadužbina Andrejević; 2015.
- Hrnčić D, Grubač Ž, Rašić-Marković A, Šutulović N, Šušić V, Bječić-Macut J, Stanojlović O. Sleep disruption increases seizure susceptibility: Behavioral i EEG evaluation of an experimental model of sleep apnea. *Physiol Behav.* 2016;155:188–94.
- Hrnčić D, Mikić J, Rasic-Markovic A, Velimirović M, Stojković T, Obrenović R, Rankov-Petrović B, Šušić V, Djuric D, Petronijević N, Stanojlovic O. Anxiety-related behavior in hyperhomocysteinemia induced by methionine nutritional overload in rats: role of the brain oxidative stress. *Canadian Journal of Physiology i Pharmacology.* 2016;94(10):1074–82.
- Hrnčić D, Rašić -Marković A, Stojković T, Velimirović M, Puškaš N, Obrenović R, Macut D, Šušić V, Jakovljević V, Djuric D, Petronijević N, Stanojlović O. Hyperhomocysteinemia induced by methionine dietary nutritional overload modulates acetylcholinesterase activity in the rat brain. *Mol Cell Biochem.* 2014;396(1–2):99–105.
- Hrnčić D, Rašić -Marković A, Šušić V, Djuric D, Stanojlović O. Significance of positive stimulation for successful rat treadmill training. *Blaubeuren, Germany: Perfusion;* 2012. p. 32.
- Hrnčić D, Rašić-Marković A, Djuric D, Šušić V, Stanojlović O. The Role of nitric oxide in convulsions induced by lindane in rats. *Food i Chemical Toxicology.* 2011;49(4):947–54.
- Hrnčić D, Rašić-Marković A, Krstić D, Macut D, Djuric D, Stanojlović O. The Role of Nitric Oxide in Homocysteine Thiolactone-Induced Seizures in Adult Rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30(2):219–31.
- Hrnčić D, Rasic-Markovic A, Lekovic J, Krstic D, Colovic M, Macut D, Susic V, Djuric D, Stanojlovic O. Exercise Decreases Susceptibility to Homocysteine Seizures: the Role of Oxidative Stress. *Int J Sports Med.* 2013;35(07):544–50.
- Hrnčić D, Rasić-Marković A, Susić V, Djurić D, Stanojlović O. Influence of NR2B-selective NMDA antagonist on lindane-induced seizures in rats. *Pharmacology.* 2009;84(4):234–9.

- Hrncic D, Sutulovic N, Grubac Z, Rasic-Markovic A, Stanojlovic O. The central nervous system is not immunoprivileged: Inflammation i epileptogenesis. *Vojnosanitetski preglod*. 2018;75(8):820–5.
- Hrncić D, Vučević D, Rasić A, Radosavljević T, Mladenović D, Susić V, Djurić D, Stanojlović O. Moderate body hypothermia alleviates behavioral i EEG manifestations of audiogenic seizures in metaphit-treated rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007;85(10):1032–7.
- Hruz P, Danuser H, Studer UE, Hochreiter WW. Non-Inflammatory Chronic Pelvic Pain Syndrome Can Be Caused by Bladder Neck Hypertrophy. *European Urology*. 2003;44(1):106–10.
- Hu C, Yang H, Zhao Y, Chen X, Dong Y, Li L, Dong Y, Cui J, Zhu T, Zheng P, Lin C-S, Dai J. The role of inflammatory cytokines i ERK1/2 signaling in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome with related mental health disorders. *Scientific Reports*. 2016;6(1).
- Hu JC, Link CL, McNaughton-Collins M, Barry MJ, McKinlay JB. The association of abuse i symptoms suggestive of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: results from the Boston Area Community Health survey. *J Gen Intern Med*. 2007;22(11):1532–7.
- Hu S, Sheng WS, Ehrlich LC, Peterson PK, Chao CC. Cytokine Effects on Glutamate Uptake by Human Astrocytes. *Neuroimmunomodulation*. 2000;7(3):153–9.
- Hu S, Tucker L, Wu C, Yang L. Beneficial Effects of Exercise on Depression i Anxiety During the Covid-19 Pandemic: A Narrative Review. *Frontiers in Psychiatry*. 2020;11.
- Hua JT, Hildreth KL, Pelak VS. Effects of Testosterone Therapy on Cognitive Function in Aging: A Systematic Review. *Cogn Behav Neurol*. 2016;29(3):122–38.
- Huang G-J, Ben-David E, Tort Piella A, Edwards A, Flint J, Shifman S. Neurogenomic Evidence for a Shared Mechanism of the Antidepressant Effects of Exercise i Chronic Fluoxetine in Mice. Choi D-S, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35901.
- Huang X, Qin Z, Cui H, Chen J, Liu T, Zhu Y, Yuan S. Psychological factors i pain catastrophizing in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS): a meta-analysis. *Transl Androl Urol*. 2020;9(2):485–93.
- Hughes ATL, Samuels RE, Baño-Otálora B, Belle MDC, Wegner S, Guilding C, Northeast RC, Loudon ASI, Gigg J, Piggins HD. Timed daily exercise remodels circadian rhythms in mice. *Commun Biol*. Nature Publishing Group; 2021;4(1):1–17.

I

- Ihsan AU, Khan FU, Khongorzul P, Ahmad KA, Naveed M, Yasmeen S, Cao Y, Taleb A, Maiti R, Akhter F, Liao X, Li X, Cheng Y, Khan HU, Alam K, Zhou X. Role of oxidative stress in pathology of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome i male infertility i antioxidants function in ameliorating oxidative stress. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:714–23.
- Iqbal J, Chamberlain J, Alfaidi M, Hughes M, Alizadeh T, Casbolt H, Evans P, Mann B, Motterlini R, Francis S, Gunn J. Carbon Monoxide Releasing Molecule A1 Reduces Myocardial Damage After Acute Myocardial Infarction in a Porcine Model. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2021;78(5):e656–61.
- Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system: role i significance in human body. *Indian J Exp Biol*. 2002;40(11):1233–9.
- Ishigooka M, Nakada T, Hashimoto T, Iijima Y, Yaguchi H. Spinal substance P immunoreactivity is enhanced by acute chemical stimulation of the rat prostate. *Urology*. 2002;59(1):139–44.

Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine i electroconvulsive shock. *Psychopharmacology (Berl)*. 1990;101(1):27–33.

J

Jackson CM, Flies DB, Mosse CA, Parwani A, Hipkiss EL, Drake CG. Strain-Specific Induction of Experimental Autoimmune Prostatitis (EAP) in Mice. *Prostate*. 2013;73(6):651–6.

Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth*. 2010;2(3):161–75.

Jang TL, Schaeffer AJ. The role of cytokines in prostatitis. *World J Urol*. 2003;21(2):95–9.

Janigro D, Iffland II PH, Marchi N, Granata T. A role for inflammation in status epilepticus is revealed by a review of current therapeutic approaches. *Epilepsia*. 2013;54:30–2.

Jia X, Gao Z, Hu H. Microglia in depression: current perspectives. *Sci China Life Sci*. 2021;64(6):911–25.

Jimenez JC, Berry JE, Lim SC, Ong SK, Kheirbek MA, Hen R. Contextual fear memory retrieval by correlated ensembles of ventral CA1 neurons. *Nature Communications*. Nature Publishing Group; 2020;11(1):3492.

Jocelyn PC. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol*. 1987;143:44–67.

Johansson MS, Holtermann A, Marott JL, Prescott E, Schnohr P, Korshøj M, Søgaard K. The physical activity health paradox i risk factors for cardiovascular disease: A cross-sectional compositional data analysis in the Copenhagen City Heart Study. *PLoS One*. 2022;17(4):e0267427.

John H, John H, Barghorn A, Barghorn A, Funke G, Funke G, Sulser T, Sulser T, Hailemariam S, Hailemariam S, Hauri D, Hauri D, Joller-Jemelka HI, Joller-Jemelka HI. Noninflammatory Chronic Pelvic Pain Syndrome: Immunological Study in Blood, Ejaculate i Prostate Tissue¹. *European Urology*. 2001;39(1):72–8.

John H, Maake C, Barghorn A, Zbinden R, Hauri D, Joller-Jemelka HI. Immunological alterations in the ejaculate of chronic prostatitis patients: clues for autoimmunity. *Andrologia*. 2003;35(5):294–9.

Johnson AC, Hammer ES, Sakkaki S, Tremble SM, Holmes GL, Cipolla MJ. Inhibition of blood-brain barrier efflux transporters promotes seizure in pregnant rats: Role of circulating factors. *Brain, Behavior, i Immunity*. 2018;67:13–23.

Joiner TE, Walker RL, Pettit JW, Perez M, Cukrowicz KC. Evidence-based assessment of depression in adults. *Psychol Assess*. 2005;17(3):267–77.

K

Kalueff AV, Lehtimäki KA, Ylinen A, Honkaniemi J, Peltola J. Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats. *Neuroscience Letters*. 2004;365(2):106–10.

Kamel JT, Badawy RAB, Cook MJ. Exercise-induced seizures i lateral asymmetry in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav Case Rep*. 2014;2:26–30.

Kang J, Cho SS, Kim HY, Lee BH, Cho HJ, Gwak YS. Regional Hyperexcitability i Chronic Neuropathic Pain Following Spinal Cord Injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;40(6):861–78.

- Karatas OF, Turkey C, Bayrak O, Cimentepe E, Unal D. *Helicobacter pylori* seroprevalence in patients with chronic prostatitis: A pilot study. *Scandinavian Journal of Urology i Nephrology*. 2010;44(2):91–4.
- Kawasaki Y, Zhang L, Cheng J-K, Ji R-R. Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct i Overlapping Role of Interleukin-1 β , Interleukin-6, i Tumor Necrosis Factor- α in Regulating Synaptic i Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord. *J Neurosci*. 2008;28(20):5189–94.
- Keith IM, Jin J, Neal D, Teunissen BD, Moon TD. CELL RELATIONSHIP IN A WISTAR RAT MODEL OF SPONTANEOUS PROSTATITIS. *Journal of Urology*. 2001;166(1):323–8.
- Kempuraj D, Thangavel R, Selvakumar GP, Zaheer S, Ahmed ME, Raikwar SP, Zahoor H, Saeed D, Natteru PA, Iyer S, Zaheer A. Brain i Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation i Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017;11.
- Khera M. Patients with testosterone deficit syndrome i depression. *Arch Esp Urol*. 2013;66(7):729–36.
- Khlaifia A, Honoré E, Artinian J, Laplante I, Lacaille J-C. mTORC1 function in hippocampal parvalbumin interneurons: regulation of firing i long-term potentiation of intrinsic excitability but not long-term contextual fear memory i context discrimination. *Mol Brain*. 2022;15(1):56.
- Ki SH, Cho IJ, Choi DW, Kim SG. Glucocorticoid Receptor (GR)-Associated SMRT Binding to C/EBP TAD i Nrf2 Neh4/5: Role of SMRT Recruited to GR in GSTA2 Gene Repression. *Molecular i Cellular Biology*. 2005;25(10):4150–65.
- Kim SH, Ha U-S, Lee HR, Sohn DW, Lee S-J, Kim HW, Han CH, Lee CB, Cho Y-H. Do *Escherichia coli* extract i cranberry exert preventive effects on chronic bacterial prostatitis? Pilot study using an animal model. *Journal of Infection i Chemotherapy*. 2011a;17(3):322–6.
- Kim T-H, Kim HR, Myung S-C. Detection of nanobacteria in patients with chronic prostatitis i vaginitis by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Korean J Urol*. 2011b;52(3):194–9.
- Kim Y, Park J, Choi YK. The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel i Heme Oxygenase Metabolites: A Review. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(5):121.
- Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin i ghrelin in the regulation of food intake i body weight in humans: A review. *Obesity Reviews*. *Obes Rev*; 2007. p. 21–34.
- Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G. Murine Features of Neurogenesis in the Human Hippocampus across the Lifespan from 0 to 100 Years. Callaerts P, editor. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8809.
- Koh JS, Ko HJ, Wang S-M, Cho KJ, Kim JC, Lee S-J, Pae C-U, Serretti A. The association of personality trait on treatment outcomes in patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: An exploratory study. *Journal of Psychosomatic Research*. 2014;76(2):127–33.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, i methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002;30(6):620–50.
- Koo JW, Duman RS. Evidence for IL-1 receptor blockade as a therapeutic strategy for the treatment of depression. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10(7):664–71.
- Kotsch K, Martins PNA, Klemz R, Janssen U, Gerstmayer B, Dernier A, Reutzel-Selke A, Kuckelkorn U, Tullius SG, Volk H-D. Heme oxygenase-1 ameliorates ischemia/reperfusion injury by targeting dendritic cell maturation i migration. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(12):2049–63.

- Kouiavskaia DV, Southwood S, Berard CA, Klyushnenkova EN, Alexander RB. T-Cell Recognition of Prostatic Peptides in Men With Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Journal of Urology*. WoltersKluwer; 2009;182(5):2483–9.
- Kozak W, Kluger MJ, Soszynski D, Conn CA, Rudolph K, Leon LR, Zheng H. IL-6 i IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;856:33–47.
- Kramer JM, Plowey ED, Beatty JA, Little HR, Waldrop TG. Hypothalamus, hypertension, i exercise. *Brain Res Bull*. 2000;53(1):77–85.
- Krauss GL, Sperling MR. Treating patients with medically resistant epilepsy. *Neurol Clin Pract*. 2011;1(1):14–23.
- Krieger JN. NIH Consensus Definition i Classification of Prostatitis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1999;282(3):236–7.
- Krieger JN, Nyberg L, Nickel JC. NIH consensus definition i classification of prostatitis. *JAMA*. 1999;282(3):236–7.
- Krieger JN, Takahashi S, Riley DE. Chronic Prostatitis: Role of Uncommon Organisms. *European Urology Supplements*. 2003;2(2):19–22.
- Krsmanovic A, Tripp DA, Nickel JC, Shoskes DA, Pontari M, Litwin MS, McNaughton-Collins MF. Psychosocial mechanisms of the pain i quality of life relationship for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS). *Canadian Urological Association Journal*. 2014;8(11–12):403.
- Kruk M, Tendera K, Biała G. Memory-related effects of cholinergic receptor ligands in mice as measured by the elevated plus maze test. *Pharmacol Rep*. 2011;63(6):1372–82.
- Kwon JK, Chang IH. Pain, Catastrophizing, i Depression in Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Int Neurourol J*. 2013;17(2):48–58.
- Kwon SM, Kim SI, Chun DC, Cho NH, Chung BC, Park BW, Hong SJ. Development of rat prostatitis model by oral administration of isoflavone i its characteristics. *Yonsei Med J*. 2001;42(4):395–404.

L

- Landmark T, Romundstad P, Borchgrevink PC, Kaasa S, Dale O. Associations between recreational exercise i chronic pain in the general population: evidence from the HUNT 3 study. *Pain*. 2011;152(10):2241–7.
- Lanerolle NC, Lee T-S, Spencer DD. Astrocytes i epilepsy. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):424–38.
- Lang MD, Nickel JC, Olson ME, Howard SR, Ceri H. Rat model of experimentally induced abacterial prostatitis. *Prostate*. 2000;45(3):201–6.
- Law LF, Sluka KA. How does physical activity modulate pain? *Pain*. 2017;158(3):369–70.
- Lazarus RS. A cognitively oriented psychologist looks at biofeedback. *American Psychologist*. 1975;30(5):553–61.
- Le Thuc O, Blondeau N, Nahon J-L, Rovère C. The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1351:127–40.
- Leal B, Chaves J, Carvalho C, Bettencourt A, Brito C, Boleixa D, Freitas J, Brás S, Lopes J, Ramalheira J, Costa PP, da Silva BM, da Silva AM. Immunogenetic predisposing factors for mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *International Journal of Neuroscience*. 2018;128(4):305–10.

- Lee DJ, Hsu MS, Seldin MM, Arellano JL, Binder DK. Decreased expression of the glial water channel aquaporin-4 in the intrahippocampal kainic acid model of epileptogenesis. *Experimental Neurology*. 2012;235(1):246–55.
- Lee JH, Lee SW. Testosterone i Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Propensity Score-Matched Analysis. *J Sex Med*. 2016a;13(7):1047–55.
- Lee SJ, Drabik K, Van Wagoner NJ, Lee S, Choi C, Dong Y, Benveniste EN. ICAM-1-induced expression of proinflammatory cytokines in astrocytes: involvement of extracellular signal-regulated kinase i p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol*. 2000;165(8):4658–66.
- Lee SW. Recent trend of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS) management. *Hanyang Med Rev. Hanyang University School of Medicine*; 2017;37(1):40–6.
- Lee T-S, Chau L-Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med*. 2002;8(3):240–6.
- Lehmann ML, Weigel TK, Poffenberger CN, Herkenham M. The Behavioral Sequelae of Social Defeat Require Microglia i Are Driven by Oxidative Stress in Mice. *J Neurosci*. 2019;39(28):5594–605.
- Lehtimäki KA, Keränen T, Huhtala H, Hurme M, Ollikainen J, Honkaniemi J, Palmio J, Peltola J. Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid i serum compartments by seizures: the effect of seizure type i duration. *Journal of Neuroimmunology*. 2004;152(1–2):121–5.
- Lehtimäki KA, Keränen T, Palmio J, Mäkinen R, Hurme M, Honkaniemi J, Peltola J. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2007;116(4):226–30.
- Leise TL, Harrington ME, Molyneux PC, Song I, Queenan H, Zimmerman E, Lall GS, Biello SM. Voluntary exercise can strengthen the circadian system in aged mice. *Age (Dordr)*. 2013;35(6):2137–52.
- Leng F, Edison P. Neuroinflammation i microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol*. 2021;17(3):157–72.
- Levy R, Dubois B. Apathy i the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex*. 2006;16(7):916–28.
- Lezak KR, Missig G, Carlezon Jr WA. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(2):181–91.
- Li G, Bauer S, Nowak M, Norwood B, Tackenberg B, Rosenow F, Knake S, Oertel WH, Hamer HM. Cytokines i epilepsy. *Seizure*. 2011;20(3):249–56.
- Li X, Clark JD. The role of heme oxygenase in neuropathic i incisional pain. *Anesth Analg*. 2000;90(3):677–82.
- Li X, Lighthall G, Liang D-Y, Clark JD. Alterations in spinal cord gene expression after hindpaw formalin injection. *J Neurosci Res*. 2004;78(4):533–41.
- Liao C-H, Lin H-C, Huang C-Y. Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome is associated with Irritable Bowel Syndrome: A Population-based Study. *Sci Rep*. 2016;6:26939.
- Liimatainen S, Fallah M, Kharazmi E, Peltola M, Peltola J. Interleukin-6 levels are increased in temporal lobe epilepsy but not in extra-temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurology*. 2009;256(5):796–802.
- Lima LV, Abner TSS, Sluka KA. Does exercise increase or decrease pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. *J Physiol*. 2017;595(13):4141–50.
- Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*. 2020;108(4):608–22.

- Litwin MS, McNAUGHTON-COLLINS M, Fowler FJ, Nickel JC, Calhoun EA, Pontari MA, Alexander RB, Farrar JT, O'Leary MP. The National Institutes Of Health Chronic Prostatitis Symptom Index: Development And Validation Of A New Outcome Measure. *The Journal of Urology*. 1999;369-75.
- Liu F, Xu X, Wang Z, Wu P. Abnormal prostate microbiota composition is associated with experimental autoimmune prostatitis complicated with depression in rats. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:966004.
- Liu J, Tao J, Xia R, Li M, Huang M, Li S, Chen X, Wilson G, Park J, Zheng G, Chen L, Kong J. Mind-Body Exercise Modulates Locus Coeruleus i Ventral Tegmental Area Functional Connectivity in Individuals With Mild Cognitive Impairment. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2021;13.
- Liu M-Y, Yin C-Y, Zhu L-J, Zhu X-H, Xu C, Luo C-X, Chen H, Zhu D-Y, Zhou Q-G. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat Protoc*. 2018;13(7):1686-98.
- Liu T, Jiang C-Y, Fujita T, Luo S-W, Kumamoto E. Enhancement by interleukin-1 β of AMPA i NMDA receptor-mediated currents in adult rat spinal superficial dorsal horn neurons. *Mol Pain*. 2013;9:16.
- Loggia ML, Berna C, Kim J, Cahalan CM, Gollub RL, Wasan AD, Harris RE, Edwards RR, Napadow V. Disrupted brain circuitry for pain-related reward/punishment in fibromyalgia. *Arthritis i Rheumatology*. John Wiley i Sons Inc.; 2014;66(1):203-12.
- Löscher W. How to Explain Multidrug Resistance in Epilepsy? *Epilepsy Curr*. 2005;5(3):107-12.
- Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *Neurotherapeutics*. 2005a;2(1):86-98.
- Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases i the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci*. 2005b;6(8):591-602.
- Lundh D, Hedelin H, Jonsson K, Gifford M, Larsson D. Assessing chronic pelvic pain syndrome patients: Blood plasma factors i cortisol saliva. *Scandinavian Journal of Urology*. 2013;47(6):521-8.
- Luo Y, Ullah R, Wang J, Du Y, Huang S, Meng L, Gao Y, Gong M, Galaj E, Yin X, Shi H. Exogenous Carbon Monoxide Produces Rapid Antidepressant- i Anxiolytic-Like Effects. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour i cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):434-45.
- Lurie DI. An Integrative Approach to Neuroinflammation in Psychiatric disorders i Neuropathic Pain. *J Exp Neurosci*. 2018;12:1179069518793639.
- Lutgendorf SK, Kreder KJ, Rothrock NE, Hoffman A, Kirschbaum C, Sternberg EM, Zimmerman MB, Ratliff TL. Diurnal cortisol variations i symptoms in patients with interstitial cystitis. *J Urol*. 2002;167(3):1338-43.
- Lv C, Zhong Z, Wu Z, Xiao N, Yang M, Zhao X. Nonbacterial Prostatitis in Kunming Mouse Induced by Long-Term Stimuli of Passive Sexual Abstinence. *J. Androl*. 2010;31(3):244-9.

M

- Maccioni M, Rivero VE, Riera CM. Prostatein (or rat prostatic steroid binding protein) is a major autoantigen in experimental autoimmune prostatitis. *Clin Exp Immunol*. 1998;112(2):159-65.

- Magistro G, Wagenlehner FME, Grabe M, Weidner W, Stief CG, Nickel JC. Contemporary Management of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *European Urology*. 2016;69(2):286–97.
- Maier JA, Hla T, Maciag T. Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1990;265(19):10805–8.
- Majores M, Eils J, Wiestler OD, Becker AJ. Molecular profiling of temporal lobe epilepsy: comparison of data from human tissue samples i animal models. *Epilepsy Research*. 2004;60(2–3):173–8.
- Marciniak MD, Lage MJ, Dunayevich E, Russell JM, Bowman L, Landbloom RP, Levine LR. The cost of treating anxiety: the medical i demographic correlates that impact total medical costs. *Depress Anxiety*. 2005;21(4):178–84.
- Maricque BB, Eickhoff JC, McNeel DG. Antibody Responses to Prostate-Associated Antigens in Patients with Prostatitis i Prostate Cancer. *Prostate*. 2011;71(2):134–46.
- Maripuu M, Wikgren M, Karling P, Adolfsson R, Norrback K-F. Relative Hypo- i Hypercortisolism Are Both Associated with Depression i Lower Quality of Life in Bipolar Disorder: A Cross-Sectional Study. *PLoS One*. 2014;9(6):e98682.
- Marques L, Robinaugh DJ, LeBlanc NJ, Hinton D. Cross-cultural variations in the prevalence i presentation of anxiety disorders. *Expert Rev Neurother*. 2011;11(2):313–22.
- Masterson TA, Masterson JM, Azzinaro J, Manderson L, Swain S, Ramasamy R. Comprehensive pelvic floor physical therapy program for men with idiopathic chronic pelvic pain syndrome: a prospective study. *Transl Androl Urol*. 2017;6(5):910–5.
- Mauter AEM, Bergeron M, Sharp FR, Panter SS, Weinzierl M, Guenther K, Noble LJ. Sustained Induction of Heme Oxygenase-1 in the Traumatized Spinal Cord. *Experimental Neurology*. 2000;166(2):254–65.
- McEwen BS. Stress, sex, i neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1204 Suppl:E38-59.
- McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE*. 2006;2006(356):re12.
- McNaughton Collins M, Pontari MA, O’Leary MP, Calhoun EA, Santanna J, Landis JR, Kusek JW, Litwin MS, Chronic Prostatitis Collaborative Research Network. Quality of life is impaired in men with chronic prostatitis: the Chronic Prostatitis Collaborative Research Network. *J Gen Intern Med*. 2001;16(10):656–62.
- Meeren HKM, Pijn JPM, Van Luijckelaar ELJM, Coenen AML, Lopes da Silva FH. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J Neurosci*. 2002;22(4):1480–95.
- Meerwijk EL, Ford JM, Weiss SJ. Brain regions associated with psychological pain: Implications for a neural network i its relationship to physical pain. *Brain Imaging i Behavior*. Springer Science i Business Media, LLC; 2013;7(1):1–14.
- Megahed T, Hattiangady B, Shuai B, Shetty AK. Parvalbumin i neuropeptide Y expressing hippocampal GABA-ergic inhibitory interneuron numbers decline in a model of Gulf War illness. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:447.
- Meini A, Benocci A, Frosini M, Sgaragli G, Pessina G, Aldinucci C, Youmbi GT, Palmi M. Nitric oxide modulation of interleukin-1[beta]-evoked intracellular Ca²⁺ release in human astrocytoma U-373 MG cells i brain striatal slices. *J Neurosci*. 2000;20(24):8980–6.
- Mélik-Parsadaniantz S, Rostène W. Chemokines i neuromodulation. *Journal of Neuroimmunology*. 2008;198(1–2):62–8.

- Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz C, Juárez-Rebollar D, Rodríguez-Martínez E, Yescas Gómez P. Oxidative Stress Associated with Neuronal Apoptosis in Experimental Models of Epilepsy. *Oxidative Medicine i Cellular Longevity*. 2014;2014:1–12.
- Mercer Lindsay N, Chen C, Gilam G, Mackey S, Scherrer G. Brain circuits for pain i its treatment. *Sci Transl Med*. 2021;13(619):eabj7360.
- Meusburger SM, Keast JR. Testosterone i nerve growth factor have distinct but interacting effects on structure i neurotransmitter expression of adult pelvic ganglion cells in vitro. *Neuroscience*. 2001;108(2):331–40.
- Micheli L, Ceccarelli M, D’Andrea G, Tirone F. Depression i adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine i of physical exercise. *Brain Res Bull*. 2018;143:181–93.
- Milad MR, Rauch SL. The Role of the Orbitofrontal Cortex in Anxiety Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1121(1):546–61.
- Millan MJ, Czlonkowski A, Pilcher CWT, Almeida OFX, Millan MH, Colpaert FC, Herz A. A model of chronic pain in the rat: Functional correlates of alterations in the activity of opioid systems. *Journal of Neuroscience*. 1987;7(1):77–87.
- Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation i Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biological Psychiatry*. 2009;65(9):732–41.
- Miller AH, Pariante CM, Pearce BD. Effects of Cytokines on Glucocorticoid Receptor Expression And Function: Glucocorticoid Resistance i Relevance to Depression. In: Dantzer R, Wollman EE, Yirmiya R, editors. *Cytokines, Stress, i Depression*. New York, NY: Springer US; 1999. p. 107–16.
- Milovanović M, Martinović Ž, Tošković O. Determinants of quality of life in people with epilepsy in Serbia. *Epilepsy Behav*. 2014;31:160–6.
- Minegishi S, Sagami I, Negi S, Kano K, Kitagishi H. Circadian clock disruption by selective removal of endogenous carbon monoxide. *Sci Rep*. 2018;8:11996.
- Mishra D, Richard JE, Maric I, Porteiro B, Häring M, Kooijman S, Musovic S, Eerola K, López-Ferreras L, Peris E, Grycel K, Shevchouk OT, Micallef P, Olofsson CS, Wernstedt Asterholm I, Grill HJ, Nogueiras R, Skibicka KP. Parabrachial Interleukin-6 Reduces Body Weight i Food Intake i Increases Thermogenesis to Regulate Energy Metabolism. *Cell Reports*. Elsevier B.V.; 2019;26(11):3011-3026.e5.
- Misiak B, Łoniewski I, Marlicz W, Frydecka D, Szulc A, Rudzki L, Samochowiec J. The HPA axis dysregulation in severe mental illness: Can we shift the blame to gut microbiota? *Progress in Neuro-Psychopharmacology i Biological Psychiatry*. 2020;102:109951.
- Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine i a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170–5.
- Mitra R, Sapolsky RM. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety i amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(14):5573–8.
- Mladenović D, Djuric D, Petronijević N, Radosavljević T, Radonjić N, Matić D, Hrnčić D, Rašić-Marković A, Vučević D, Dekanski D, Stanojlović O. The correlation between lipid peroxidation in different brain regions i the severity of lindane-induced seizures in rats. *Mol Cell Biochem*. 2010;333(1–2):243–50.
- Mladenović D, Hrnčić D, Vučević D, Radosavljević T, Loncar-Stevanović H, Petrović J, Susić V, Djuric D, Stanojlović O. Ethanol suppressed seizures in lindane-treated rats. Electroencephalographic i behavioral studies. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58(4):641–56.

- Moncrieff J, Cooper RE, Stockmann T, Amendola S, Hengartner MP, Horowitz MA. The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Mol Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2022;1–14.
- Moon H-J, Seo J-G, Park S-P. Perceived stress i its predictors in people with epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 2016;62:47–52.
- Moon M, Cha M-Y, Mook-Jung I. Impaired hippocampal neurogenesis i its enhancement with ghrelin in 5XFAD mice. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(1):233–41.
- Mora F, Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P. Stress, neurotransmitters, corticosterone i body-brain integration. *Brain Res*. 2012;1476:71–85.
- Morgan JA, Corrigan F, Baune BT. Effects of physical exercise on central nervous system functions: a review of brain region specific adaptations. *J Mol Psychiatry*. 2015;3:3.
- Motrich R, Maccioni M, Molina R, Tissera A, Olmedo J, Riera C, Rivero V. Presence of INFy-secreting lymphocytes specific to prostate antigens in a group of chronic prostatitis patients. *Clinical Immunology*. 2005;116(2):149–57.
- Motrich RD, Bresler ML, Molina RI, Tissera A, Olmedo JJ, Rivero VE. Patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome show T helper type 1 (Th1) i Th17 self-reactive immune responses specific to prostate i seminal antigens i diminished semen quality. *BJU Int*. 2020;126(3):379–87.
- Motrich RD, van Etten E, Baeke F, Riera CM, Mathieu C, Rivero VE. Crucial Role of Interferon- γ in Experimental Autoimmune Prostatitis. *Journal of Urology*. 2010;183(3):1213–20.
- Motterlini R, Foresti R. Biological signaling by carbon monoxide i carbon monoxide-releasing molecules. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2017;312(3):C302–13.
- Motterlini R, Nikam A, Manin S, Ollivier A, Wilson JL, Djouadi S, Muchova L, Martens T, Rivard M, Foresti R. HYCO-3, a dual CO-releaser/Nrf2 activator, reduces tissue inflammation in mice challenged with lipopolysaccharide. *Redox Biol*. 2019;20:334–48.
- Muhammad F, Al-Ahmadi S. Human state anxiety classification framework using EEG signals in response to exposure therapy. Nisar H, editor. *PLoS ONE*. 2022;17(3):e0265679.
- Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima L de S, Avellar MCW, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex i hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci*. 2006;26(14):3813–20.
- Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. A Review on Hemeoxygenase-2: Focus on Cellular Protection i Oxygen Response. *Oxidative Medicine i Cellular Longevity*. Hindawi; 2014;2014:e604981.
- Murphy MP, Bayir H, Belousov V, Chang CJ, Davies KJA, Davies MJ, Dick TP, Finkel T, Forman HJ, Janssen-Heininger Y, Gems D, Kagan VE, Kalyanaraman B, Larsson N-G, Milne GL, Nyström T, Poulsen HE, Radi R, Van Remmen H, Schumacker PT, Thornalley PJ, Toyokuni S, Winterbourn CC, Yin H, Halliwell B. Guidelines for measuring reactive oxygen species i oxidative damage in cells i in vivo. *Nat Metab*. Nature Publishing Group; 2022;4(6):651–62.
- Murphy SF, Schaeffer AJ, Done J, Wong L, Bell-Cohn A, Roman K, Cashy J, Ohlhausen M, Thumbikat P. IL17 Mediates Pelvic Pain in Experimental Autoimmune Prostatitis (EAP). *PLoS One*. 2015;10(5):e0125623.
- Murphy SF, Schaeffer AJ, Thumbikat P. Immune mediators of chronic pelvic pain syndrome. *Nat Rev Urol*. 2014;11(5):259–69.
- Murray PS, Groves JL, Pettett BJ, Britton SL, Koch LG, Dishman RK, Holmes PV. Locus coeruleus galanin expression is enhanced after exercise in rats selectively bred for high capacity for aerobic activity. *Peptides*. 2010;31(12):2264–8.

- Murta V, Farías MI, Pitossi FJ, Ferrari CC. Chronic systemic IL-1 β exacerbates central neuroinflammation independently of the blood–brain barrier integrity. *Journal of Neuroimmunology*. 2015;278:30–43.
- Mutlu O, Akar F, Celikyurt IK, Tanyeri P, Ulak G, Erden F. 7-NI i ODQ Disturbs Memory in the Elevated Plus Maze, Morris Water Maze, i Radial Arm Maze Tests in Mice. *Drug Target Insights*. 2015;9:1–8.
- Mykoniatis I, Tsiakaras S, Samarinas M, Anastasiadis A, Symeonidis EN, Sountoulides P. Monoclonal Antibody Therapy for the Treatment of Interstitial Cystitis. *BTT*. 2022;Volume 16:47–55.

N

- Nadler RB, Collins MM, Propert KJ, Mikolajczyk SD, Knauss JS, Landis JR, Fowler JE, Schaeffer AJ, Alexander RB, Chronic Prostatitis Collaborative Research Network. Prostate-specific antigen test in diagnostic evaluation of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urology*. 2006;67(2):337–42.
- Nahar L, Delacroix BM, Nam HW. The Role of Parvalbumin Interneurons in Neurotransmitter Balance i Neurological Disease. *Front Psychiatry*. 2021;12:679960.
- Naliboff BD, Stephens AJ, Afari N, Lai H, Krieger JN, Hong B, Lutgendorf S, Strachan E, Williams D. Widespread Psychosocial Difficulties in Men i Women With Urologic Chronic Pelvic Pain Syndromes: Case-control Findings From the Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain Research Network. *Urology*. 2015;85(6):1319–27.
- Nascimento CGO, Branco LGS. Antinociception synergy between the peripheral i spinal sites of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(1):141–7.
- Naslund MJ, Strandberg JD, Coffey DS. The Role of Androgens i Estrogens in the Pathogenesis of Experimental Nonbacterial Prostatitis. *The Journal of Urology*. 1988;140(5, Part 1):1049–53.
- Nebert DW, Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics*. 2004;1(6):460–4.
- Necas J, Bartosikova L. Carrageenan: a review. *Veterinární Medicína*. 2013;58(No. 4):187–205.
- Nguyen CT, Shoskes DA. Evaluation of the Prostatitis Patient. In: Shoskes DA, editor. *Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 1–16.
- Nichol KE, Poon WW, Parachikova AI, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance i decreased amyloid. *J Neuroinflammation*. 2008;5:13.
- Nickel JC. Prostatitis. *Can Urol Assoc J*. 2011;5(5):306–15.
- Nickel JC, Alexander RB, Schaeffer AJ, Landis JR, Knauss JS, Propert KJ, CHRONIC PROSTATITIS COLLABORATIVE RESEARCH NETWORK STUDY GROUP. Leukocytes And Bacteria In Men With Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome Compared To Asymptomatic Controls. *Journal of Urology*. 2003;170(3):818–22.
- Nickel JC, Berger R, Pontari M. Changing Paradigms for Chronic Pelvic Pain. *Rev Urol*. 2006a;8(1):28–35.
- Nickel JC, Downey J, Pontari MA, Shoskes DA, Zeitlin SI. A randomized placebo-controlled multicentre study to evaluate the safety i efficacy of finasteride for male chronic pelvic pain syndrome (category IIIA chronic nonbacterial prostatitis). *BJU Int*. 2004;93(7):991–5.
- Nickel JC, Forrest JB, Tomera K, Hernandez-Graulau J, Moon TD, Schaeffer AJ, Krieger JN, Zeitlin SI, Evans RJ, Lama DJ, Neal DE, Sant GR. Pentosan Polysulfate Sodium Therapy For Men With

- Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Multicenter, Randomized, Placebo Controlled Study. *Journal of Urology*. 2005;173(4):1252–5.
- Nickel JC, Olson ME, Costerton JW. Rat model of experimental bacterial prostatitis. *Infection*. 1991;19 Suppl 3:S126-130.
- Nickel JC, Shoskes D, Wang Y, Alexander RB, Fowler JE, Zeitlin S, O'Leary MP, Pontari MA, Schaeffer AJ, Landis JR, Nyberg L, Kusek JW, Propert KJ. How does the pre-massage i post-massage 2-glass test compare to the Meares-Stamey 4-glass test in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome? *J Urol*. 2006b;176(1):119–24.
- Nickel JC, Stephens A, Landis JR, Chen J, Mullins C, van Bokhoven A, Lucia MS, Melton-Kreft R, Ehrlich GD. Search for Microorganisms in Men with Urologic Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Culture-Independent Analysis in the MAPP Research Network. *The Journal of Urology*. 2015;194(1):127–35.
- Nickel JC, Touma N. α -Blockers for the Treatment of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: An Update on Current Clinical Evidence. *Rev Urol*. 2012;14(3–4):56–64.
- Nickel JC, Tripp DA, Chuai S, Litwin MS, McNaughton-Collins M, Landis JR, Alexander RB, Schaeffer AJ, O'Leary MP, Pontari MA, White P, Mullins C, Nyberg L, Kusek J, Group the N-CS. Psychosocial variables affect the quality of life of men diagnosed with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *BJU International*. 2008;101(1):59–64.
- Nickel JC, Tripp DA, Chuai S, Litwin MS, McNaughton-Collins M, Landis JR, Alexander RB, Schaeffer AJ, O'Leary MP, Pontari MA, White P, Mullins C, Nyberg L, Kusek J, the NIH-CPCRN Study Group. Psychosocial variables affect the quality of life of men diagnosed with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *BJU Int*. 2007;0(0):071009190733001-???
- Nishijima S, Sugaya K, Yamada T, Miyazato M, Ogawa Y. Efficacy of tricyclic antidepressant is associated with beta2-adrenoceptor genotype in patients with interstitial cystitis. *Biomed Res*. 2006;27(4):163–7.
- Nitti M, Piras S, Brondolo L, Marinari UM, Pronzato MA, Furfaro AL. Heme Oxygenase 1 in the Nervous System: Does It Favor Neuronal Cell Survival or Induce Neurodegeneration? *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):2260.

O

- Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*. 2009;30(6):713–43.
- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance i disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013;19(12):1584–96.
- O'Callaghan JP, Miller DB. Neuroinflammation disorders exacerbated by environmental stressors. *Metabolism*. 2019;100S:153951.
- Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, i acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(2):192–200.
- Oliveira DSM, Dzinic S, Bonfil AI, Saliganan AD, Sheng S, Bonfil RD. The mouse prostate: a basic anatomical i histological guideline. *Bosn J Basic Med Sci*. 2016;16(1):8–13.
- Orlando G, Leone S, Ferrante C, Chiavaroli A, Mollica A, Stefanucci A, Macedonio G, Dimmito MP, Leporini L, Menghini L, Brunetti L, Recinella L. Effects of Kisspeptin-10 on Hypothalamic Neuropeptides i Neurotransmitters Involved in Appetite Control. *Molecules*. 2018;23(12):3071.

- Ormel J, Kessler RC, Schoevers R. Depression: more treatment but no drop in prevalence: how effective is treatment? And can we do better? *Curr Opin Psychiatry*. 2019;32(4):348–54.
- Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, Mohr DC, Schatzberg AF. Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16065.
- Overall RW, Kempermann G. The Small World of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;12.
- Öztekin İ, Akdere H, Can N, Aktoz T, Arda E, Turan FN. Therapeutic Effects of Oligonol, Acupuncture, i Quantum Light Therapy in Chronic Nonbacterial Prostatitis. *Evidence-Based Complementary i Alternative Medicine*. 2015;2015:1–8.

P

- Pacheco-Rupil B, Depiante-Depaoli M, Casadio B. Experimental autoimmune damage to rat male accessory glands. II. T cell requirement in adoptive transfer of specific tissue damage. *Am J Reprod Immunol* (1980). 1984;5(1):15–9.
- Pałasz A, Menezes IC, Worthington JJ. The role of brain gaseous neurotransmitters in anxiety. *Pharmacol Rep*. 2021;73(2):357–71.
- Parfenova H, Leffler CW. Cerebroprotective functions of HO-2. *Curr Pharm Des*. 2008;14(5):443–53.
- Parfenova H, Leffler CW, Basuroy S, Liu J, Fedinec AL. Antioxidant roles of heme oxygenase, carbon monoxide, i bilirubin in cerebral circulation during seizures. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(6):1024–34.
- Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories i new developments. *Trends Neurosci*. 2008;31(9):464–8.
- Park JH, Moon JH, Kim HJ, Kong MH, Oh YH. Sedentary Lifestyle: Overview of Updated Evidence of Potential Health Risks. *Korean J Fam Med*. 2020;41(6):365–73.
- Park S, Sapkota K, Kim S, Kim H, Kim S. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases i protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells: Kaempferol inhibits LPS-induced neuroinflammation. *British Journal of Pharmacology*. 2011;164(3):1008–25.
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts JM, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology*. 2000;55(6):881–5.
- Passavanti MB, Pota V, Sansone P, Aurilio C, De Nardis L, Pace MC. Chronic Pelvic Pain: Assessment, Evaluation, i Objectivation. *Pain Research i Treatment*. 2017;2017:1–15.
- Paul BD, Snyder SH. Gasotransmitter hydrogen sulfide signaling in neuronal health i disease. *Biochem Pharmacol*. 2018;149:101–9.
- Pavlov D, Bettendorff L, Gorlova A, Olkhovik A, Kalueff AV, Ponomarev ED, Inozemtsev A, Chekhonin V, Lesch K-P, Anthony DC, Strekalova T. Neuroinflammation i aberrant hippocampal plasticity in a mouse model of emotional stress evoked by exposure to ultrasound of alternating frequencies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology i Biological Psychiatry*. 2019;90:104–16.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam; Boston: Elsevier; 2007.
- Pecorelli A, Natrella F, Belmonte G, Miracco C, Cervellati F, Ciccoli L, Mariottini A, Rocchi R, Vatti G, Bua A, Canitano R, Hayek J, Forman HJ, Valacchi G. NADPH oxidase activation i 4-hydroxy-2-nonenal/aquaporin-4 adducts as possible new players in oxidative neuronal damage

- presents in drug-resistant epilepsy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(3):507–19.
- Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, McBain CJ. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev*. 2017;97(4):1619–747.
- Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of Aging*. 2008;29(11):1754–62.
- Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Giarratana N, De Carli E, Fibbi B, Adorini L. Spontaneous i Prostatic Steroid Binding Protein Peptide-Induced Autoimmune Prostatitis in the Nonobese Diabetic Mouse. *J Immunol*. 2007;179(3):1559–67.
- Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Sanvito F, Doglioni C, Adorini L. Treatment of Experimental Autoimmune Prostatitis in Nonobese Diabetic Mice by the Vitamin D Receptor Agonist Elocalcitol. *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists; 2006;177(12):8504–11.
- Perez A, de Oliveira C, Prieto J, Ferrando A, Vila L, Alvarez A. Quantitative assessment of nitric oxide in rat skeletal muscle i plasma after exercise. *European Journal of Applied Physiology*. 2002;88(1–2):189–91.
- Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components i function under physiologic i pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006;1(3):223–36.
- Petecchia L, Sabatini F, Usai C, Caci E, Varesio L, Rossi GA. Cytokines induce tight junction disassembly in airway cells via an EGFR-dependent MAPK/ERK1/2-pathway. *Lab Invest*. Nature Publishing Group; 2012;92(8):1140–8.
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms i Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763.
- Planchez B, Surget A, Belzung C. Animal models of major depression: drawbacks i challenges. *J Neural Transm*. 2019;126(11):1383–408.
- Plavsic L, Knezevic OM, Sovtic A, Minic P, Vukovic R, Mazibrada I, Stanojlovic O, Hrnčić D, Rasic-Markovic A, Macut D. Effects of high-intensity interval training i nutrition advice on cardiometabolic markers i aerobic fitness in adolescent girls with obesity. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2020;45(3):294–300.
- Polackwich AS, Shoskes DA. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a review of evaluation i therapy. *Prostate Cancer i Prostatic Diseases*. 2016;19(2):132–8.
- Pomeranec Y, Grion N, Gadda L, Pannunzio V, Podesta EJ, Cymeryng CB. Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells. *J Endocrinol*. 2004;180(1):113–24.
- Pontari MA. Etiology of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: psychoimmunoneuroendocrine dysfunction (PINE syndrome) or just a really bad infection? *World J Urol*. 2013;31(4):725–32.
- Pontari MA, McNaughton-Collins M, O’leary MP, Calhoun EA, Jang T, Kusek JW, Landis JR, Knauss J, Litwin MS, CPCR Study Group. A case-control study of risk factors in men with chronic pelvic pain syndrome. *BJU Int*. 2005;96(4):559–65.
- Pontari MA, Ruggieri MR. Mechanisms in Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *The Journal of Urology*. 2004;179(5):S61–7.
- Poole DC, Copp SW, Colburn TD, Craig JC, Allen DL, Sturek M, O’Leary DS, Zucker IH, Musch TI. Guidelines for animal exercise i training protocols for cardiovascular studies. *American Journal of Physiology-Heart i Circulatory Physiology*. American Physiological Society; 2020;318(5):H1100–38.

- Porasuphatana S, Tsai P, Rosen GM. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2003;134(3):281–9.
- Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Deniel M, Jalfre M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine i serotonin activity. *Eur J Pharmacol.* 1979;57(2–3):201–10.
- Potts JM, Payne CK. Urologic chronic pelvic pain. *Pain.* 2012;153(4):755–8.
- Potts JM. Male Pelvic Pain: Beyond Urology i Chronic Prostatitis. *Current Rheumatology Reviews.* 2016;12(1):27–39.
- Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *J Sport Health Sci.* 2020;9(5):415–425.
- Prins GS, Korach KS. The Role of Estrogens i Estrogen Receptors in Normal Prostate Growth i Disease. *Steroids.* 2008;73(3):233–44.
- Pruessner M, Hellhammer DH, Pruessner JC, Lupien SJ. Self-reported depressive symptoms i stress levels in healthy young men: associations with the cortisol response to awakening. *Psychosom Med.* 2003;65(1):92–9.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1–3):3–33.
- Pryor WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med.* 1994;17(5):451–65.
- Puttachary S, Sharma S, Stark S, Thippeswamy T. Seizure-Induced Oxidative Stress in Temporal Lobe Epilepsy. *BioMed Research International.* 2015;2015:1–20.

Q

- Quartana PJ, Campbell CM, Edwards RR. Pain catastrophizing: a critical review. *Expert Rev Neurother.* 2009;9(5):745–58.
- Quick ML, Mukherjee S, Rudick CN, Done JD, Schaeffer AJ, Thumbikat P. CCL2 i CCL3 are essential mediators of pelvic pain in experimental autoimmune prostatitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;303(6):R580–589.
- Quick ML, Wong L, Mukherjee S, Done JD, Schaeffer AJ, Thumbikat P. Th1-Th17 cells contribute to the development of uropathogenic *Escherichia coli*-induced chronic pelvic pain. *PLoS One.* 2013;8(4):e60987.
- Qureshi OS, Zeb A, Akram M, Kim M-S, Kang J-H, Kim H-S, Majid A, Han I, Chang S-Y, Bae O-N, Kim J-K. Enhanced acute anti-inflammatory effects of CORM-2-loaded nanoparticles via sustained carbon monoxide delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;108:187–95.

R

- Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain.* 2003;104(3):567–77.
- Radhakrishnan R, Nallu RS. Development i characterisation of a novel animal model of prostate inflammation-induced chronic pelvic pain. *Inflammopharmacology.* 2009;17(1):23–8.
- Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, i peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(23):5839–48.

- Rahimian R, Belliveau C, Chen R, Mechawar N. Microglial Inflammatory-Metabolic Pathways i Their Potential Therapeutic Implication in Major Depressive Disorder. *Front Psychiatry*. 2022;13:871997.
- Raison CL, Borisov AS, Majer M, Drake DF, Pagnoni G, Woolwine BJ, Vogt GJ, Massung B, Miller AH. Activation of Central Nervous System Inflammatory Pathways by Interferon-Alpha: Relationship to Monoamines i Depression. *Biological Psychiatry*. 2009;65(4):296–303.
- Ramamoorthy S, Ramamoorthy JD, Prasad PD, Bhat GK, Mahesh VB, Leibach FH, Ganapathy V. Regulation of the Human Serotonin Transporter by Interleukin-1 β . *Biochemical i Biophysical Research Communications*. 1995;216(2):560–7.
- Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. Cytokines i Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, i Neuropathic Pain. *Mediators of Inflammation*. Hindawi; 2013;2013:e480739.
- Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain, Behavior, i Immunity*. 2008;22(8):1156–9.
- Rampil IJ. Fast Fourier Transformation of EEG Data. *JAMA*. 1984;251(5):601.
- Rankov Petrovic B, Hrcic D, Mladenovic D, Simic T, Suvakov S, Jovanovic D, Puskas N, Zaletel I, Velimirovic M, Cirkovic V, Macut D, Stanojlovic O, Rasic-Markovic A. Prenatal Androgenization Induces Anxiety-Like Behavior in Female Rats, Associated with Reduction of Inhibitory Interneurons i Increased BDNF in Hippocampus i Cortex. *BioMed Research International*. 2019;2019:1–12.
- Rao RS, Medhi B, Saikia UN, Arora SK, Toor JS, Khanduja KL, Pandhi P. Experimentally induced various inflammatory models i seizure: Understanding the role of cytokine in rat. *European Neuropsychopharmacology*. 2008;18(10):760–7.
- Rasika S, Alvarez-Buylla A, Nottebohm F. BDNF mediates the effects of testosterone on the survival of new neurons in an adult brain. *Neuron*. 1999;22(1):53–62.
- Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate i adaptive immunity during epileptogenesis i spontaneous seizures: Evidence from experimental models i human temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*. 2008;29(1):142–60.
- Ravizza T, Vezzani A. Status epilepticus induces time-dependent neuronal i astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. *Neuroscience*. 2006;137(1):301–8.
- Reiter E, Hennuy B, Bruyninx M, Cornet A, Klug M, McNamara M, Closset J, Hennen G. Effects of pituitary hormones on the prostate. *Prostate*. 1999;38(2):159–65.
- Rhudy JL. The importance of emotional processes in the modulation of pain: *Pain*. 2009;146(3):233–4.
- Riazi K, Galic MA, Kentner AC, Reid AY, Sharkey KA, Pittman QJ. Microglia-Dependent Alteration of Glutamatergic Synaptic Transmission i Plasticity in the Hippocampus during Peripheral Inflammation. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(12):4942–52.
- Riazi K, Galic MA, Pittman QJ. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: Cytokines i brain excitability. *Epilepsy Research*. 2010;89(1):34–42.
- Riazi K, Honar H, Homayoun H, Demehri S, Bahadori M, Dehpour AR. Intestinal inflammation alters the susceptibility to pentylentetrazole-induced seizure in mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19(3):270–7.
- Ribeiro FF, Xapelli S. An Overview of Adult Neurogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1331:77–94.
- Riegel B, Bruenahl CA, Ahyai S, Bingel U, Fisch M, Löwe B. Assessing psychological factors, social aspects i psychiatric co-morbidity associated with Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain

- Syndrome (CP/CPSP) in men — A systematic review. *Journal of Psychosomatic Research*. 2014b;77(5):333–50.
- Rigau V, Morin M, Rousset M-C, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, Picot M-C, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Crespel A, Lerner-Natoli M. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2007;130(7):1942–56.
- Riley DE, Krieger JN. Diverse eukaryotic transcripts suggest short tandem repeats have cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002a;298(4):581–6.
- Riley DE, Krieger JN. X Chromosomal short tandem repeat polymorphisms near the phosphoglycerate kinase gene in men with chronic prostatitis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2002b;1586(1):99–107.
- Roberts RO, Jacobson DJ, Girman CJ, Rhodes T, Lieber MM, Jacobsen SJ. Low Agreement Between Previous Physician Diagnosed Prostatitis i National Institutes of Health Chronic Prostatitis Symptom Index Pain Measures. *The Journal of Urology*. 2004;171(1):279–83.
- Röhl C, Lucius R, Sievers J. The effect of activated microglia on astrogliosis parameters in astrocyte cultures. *Brain Res*. 2007;1129(1):43–52.
- Rojas A, Jiang J, Ganesh T, Yang M-S, Lelutiu N, Gueorguieva P, Dingledine R. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(1):17–25.
- Roman K, Done JD, Schaeffer AJ, Murphy SF, Thumbikat P. Tryptase-PAR2 axis in experimental autoimmune prostatitis, a model for chronic pelvic pain syndrome. *Pain*. 2014;155(7):1328–38.
- Rosa DV, Rezende VB, Costa BS, Mudado F, Schütze M, Torres KC, Martins LC, Moreira-Filho CA, Miranda DM, Romano-Silva MA. Circulating CD4 i CD8 T cells expressing pro-inflammatory cytokines in a cohort of mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res*. 2016;120:1–6.
- Rosell DR, Nacher J, Akama KT, McEwen BS. Spatiotemporal distribution of gp130 cytokines i their receptors after status epilepticus: comparison with neuronal degeneration i microglial activation. *Neuroscience*. 2003;122(2):329–48.
- Rosen JB, Hamerman E, Sitcoske M, Glowa JR, Schulkin J. Hyperexcitability: exaggerated fear-potentiated startle produced by partial amygdala kindling. *Behav Neurosci*. 1996;110(1):43–50.
- Rosen JB, Schulkin J. Hyperexcitability: From Normal Fear to Pathological Anxiety i Trauma. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2022;16.
- de la Rosette JJ, Hubregtse MR, Karthaus HF, Debruyne FM. Results of a questionnaire among Dutch urologists i general practitioners concerning diagnostics i treatment of patients with prostatitis syndromes. *Eur Urol*. 1992;22(1):14–9.
- Rossetti AC, Paladini MS, Colombo M, Gruca P, Lason-Tyburkiewicz M, Tota-Glowczyk K, Papp M, Riva MA, Molteni R. Chronic Stress Exposure Reduces Parvalbumin Expression in the Rat Hippocampus through an Imbalance of Redox Mechanisms: Restorative Effect of the Antipsychotic Lurasidone. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018;21(9):883–93.
- Roumeguère T, Sfeir J, El Rassy E, Albisinni S, van Antwerpen P, Zouaoui Boudjeltia K, Farès N, Kattan J, Aoun F. Oxidative stress i prostatic diseases (Review). *Molecular i Clinical Oncology*. 2017;7(5):723–8.
- Rubin SA, Mickle D. A simply constructed treadmill for rodent exercise studies. *Journal of Applied Physiology*. 1982;52(2):505–7.
- Ruden JB, Dugan LL, Konradi C. Parvalbumin interneuron vulnerability i brain disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2021;46(2):279–87.

- Rudick CN, Berry RE, Johnson JR, Johnston B, Klumpp DJ, Schaeffer AJ, Thumbikat P. Uropathogenic *Escherichia coli* Induces Chronic Pelvic Pain. Payne SM, editor. Infect Immun. 2011;79(2):628–35.
- Rudick CN, Schaeffer AJ, Thumbikat P. Experimental autoimmune prostatitis induces chronic pelvic pain. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative i Comparative Physiology. 2008;294(4):R1268–75.
- Rytova V, Ganella DE, Hawkes D, Bathgate RAD, Ma S, Gundlach AL. Chronic activation of the relaxin-3 receptor on GABA neurons in rat ventral hippocampus promotes anxiety i social avoidance. Hippocampus. 2019;29(10):905–20.

S

- Sadler KE, Kolber BJ. Urine Trouble: Alterations in Brain Function Associated with Bladder Pain. The Journal of Urology. 2016;196(1):24–32.
- Sagheddu C, Aroni S, De Felice M, Lecca S, Luchicchi A, Melis M, Muntoni AL, Romano R, Palazzo E, Guida F, Maione S, Pistis M. Enhanced serotonin i mesolimbic dopamine transmissions in a rat model of neuropathic pain. Neuropharmacology. Elsevier Ltd; 2015;97:383–93.
- Salim S. Oxidative Stress i the Central Nervous System. J Pharmacol Exp Ther. 2017;360(1):201–5.
- Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited: Current Opinion in Neurology. 2003;16(2):165–70.
- Sandhir R, Puri V, Klein RM, Berman NEJ. Differential expression of cytokines i chemokines during secondary neuron death following brain injury in old i young mice. Neurosci Lett. 2004;369(1):28–32.
- Sandhu JK, Birnboim HC. Mutagenicity i cytotoxicity of reactive oxygen i nitrogen species in the MN-11 murine tumor cell line. Mutation Research/Fundamental i Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1997;379(2):241–52.
- dos Santos Gomes FO, Oliveira AC, Ribeiro EL, da Silva BS, dos Santos LAM, de Lima IT, Silva AKS e., da Rocha Araújo SM, Gonçalves T, de Melo-Junior MR, Peixoto CA. Intraurethral injection with LPS: an effective experimental model of prostatic inflammation. Inflamm Res. 2018;67(1):43–55.
- Sayyah M, Javad-Pour M, Ghazi-Khansari M. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide enhances seizure susceptibility in mice: involvement of proinflammatory factors: nitric oxide i prostaglandins. Neuroscience. 2003;122(4):1073–80.
- Schaeffer AJ, Landis JR, Knauss JS, Propert KJ, Alexander RB, Litwin MS, Nickel JC, O'leary MP, Nadler RB, Pontari MA, Shoskes DA, Zeitlin SI, Fowler JE, Mazurick CA, Kishel L, Kusek JW, Nyberg LM, the CHRONIC PROSTATITIS COLLABORATIVE RESEARCH NETWORK GROUP††. Demographic And Clinical Characteristics Of Men With Chronic Prostatitis: The National Institutes Of Health Chronic Prostatitis Cohort Study. Journal of Urology. 2002;168(2):593–8.
- Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. Heme oxygenase-1 i neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. Journal of Neurochemistry. 2009;110(2):469–85.
- Schlereth T, Heiland A, Breimhorst M, Féchir M, Kern U, Magerl W, Birklein F. Association between pain, central sensitization i anxiety in postherpetic neuralgia. Eur J Pain. 2015;19(2):193–201.

- Scibior D, Czczot H. [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2006;60:170–80.
- Seethalakshmi L, Bala RS, Malhotra RK, Austin -Ritchie T., Miller -Graziano C., Menon M, Luber -Narod J. 17 beta-Estradiol Induced Prostatitis in the Rat is an Autoimmune Disease. *Journal of Urology*. WoltersKluwer; 1996;156(5):1838–42.
- Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor i Anxiety-like Behavior in Mice. *J Vis Exp*. 2015;(96):52434.
- Seidel MF, Hügler T, Morlion B, Koltzenburg M, Chapman V, MaassenVanDenBrink A, Lane NE, Perrot S, Zieglgänsberger W. Neurogenic inflammation as a novel treatment target for chronic pain syndromes. *Experimental Neurology*. 2022;356:114108.
- Selakovic D, Joksimovic J, Zaletel I, Puskas N, Matovic M, Rosic G. The opposite effects of nandrolone decanoate i exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189595.
- Seo SI, Lee S-J, Kim JC, Choi Y-J, Sw SW, Hwang TK, Cho Y-H. Effects of androgen deprivation on chronic bacterial prostatitis in a rat model. *Int J Urol*. 2003;10(9):485–91.
- Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity i anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects i role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*. 2013;6(3):126–35.
- Shaftel SS, Griffin WST, O'Banion MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation i Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation*. 2008;5(1):7.
- Sharma OP, Adlercreutz H, Strandberg JD, Zirkin BR, Coffey DS, Ewing LL. Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992;43(6):557–64.
- Sharma R, Leung WL, Zamani A, O'Brien TJ, Casillas Espinosa PM, Semple BD. Neuroinflammation in Post-Traumatic Epilepsy: Pathophysiology i Tractable Therapeutic Targets. *Brain Sciences*. 2019;9(11):318.
- Shefa U, Kim M-S, Jeong NY, Jung J. Antioxidant i Cell-Signaling Functions of Hydrogen Sulfide in the Central Nervous System. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1873962.
- Shin M-S, Kim T-W, Park S-S, Ko I-G, Kim C-J, Kim M, Roh SY, Kim KT, Kim KH. Long-term Surgical i Chemical Castration Deteriorates Memory Function Through Downregulation of PKA/CREB/BDNF i c-Raf/MEK/ERK Pathways in Hippocampus. *Int Neurourol J*. 2019;23(2):116–24.
- Shneker BF, Fountain NB. *Epilepsy. Disease-a-Month*. 2003;49(7):426–78.
- Shoskes DA, editor. *Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.
- Shoskes DA, Albakri Q, Thomas K, Cook D. Cytokine polymorphisms in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: association with diagnosis i treatment response. *J Urol*. 2002;168(1):331–5.
- Shoskes DA, Keslar KS, Gotwald P, Berglund R, Vij S. Neuroinflammatory gene expression in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome patients: insights into etiology i phenotype biology. *Transl Androl Urol*. 2021;10(8):3340–7.
- Shoskes DA, Nickel JC, Dolinga R, Prots D. Clinical Phenotyping of Patients With Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome i Correlation With Symptom Severity. *Urology*. 2009;73(3):538–42.

- Shoskes DA, Nickel JC, Kattan MW. Phenotypically Directed Multimodal Therapy for Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Prospective Study Using UPOINT. *Urology*. 2010;75(6):1249–53.
- Shukla-Dave A, Hricak H, Eberhardt SC, Olgac S, Muruganandham M, Scardino PT, Reuter VE, Koutcher JA, Zakian KL. Chronic Prostatitis: MR Imaging i 1H MR Spectroscopic Imaging Findings—Initial Observations. *Radiology*. Radiological Society of North America; 2004;231(3):717–24.
- Silva RL, Lopes AH, Guimarães RM, Cunha TM. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: Role in peripheral i central sensitization. *Neurobiol Dis*. 2017;105:109–16.
- Simard AR, Rivest S. Do pathogen exposure i innate immunity cause brain diseases? *Neurological Research*. 2005;27(7):717–25.
- Simioni C, Zauli G, Martelli AM, Vitale M, Sacchetti G, Gonelli A, Neri LM. Oxidative stress: role of physical exercise i antioxidant nutraceuticals in adulthood i aging. *Oncotarget*. 2018;9(24):17181–98.
- Sindhu RK, Kaur P, Kaur P, Singh H, Batiha GE-S, Verma I. Exploring multifunctional antioxidants as potential agents for management of neurological disorders. *Environ Sci Pollut Res*. 2022;29(17):24458–77.
- Singal A, Thami GP. Lindane Neurotoxicity in Childhood: *American Journal of Therapeutics*. 2006;13(3):277–80.
- Sjostrand T. The formation of carbon monoxide by the decomposition of haemoglobin in vivo. *Acta Physiol Scand*. 1952;26(4):338–44.
- Sluka KA, Danielson J, Rasmussen L, DaSilva LF. Exercise-induced pain requires NMDA receptor activation in the medullary raphe nuclei. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(3):420–7.
- Sluka KA, O'Donnell JM, Danielson J, Rasmussen LA. Regular physical activity prevents development of chronic pain i activation of central neurons. *Journal of Applied Physiology*. 2013;114(6):725–33.
- Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przegaliński E, Pera J, Filip M. Oxidative stress as an etiological factor i a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia i autism. *Pharmacol Rep*. 2015;67(3):569–80.
- Smarr KL, Keefer AL. Measures of depression i depressive symptoms: Beck Depression Inventory-II (BDI-II), Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D), Geriatric Depression Scale (GDS), Hospital Anxiety i Depression Scale (HADS), i Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9). *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63 Suppl 11:S454-466.
- Smith G. Carbon Monoxide Poisoning. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1965;117(2):684–7.
- Smith MM, Saklofske DH, Keefer KV, Tremblay PF. Coping Strategies i Psychological Outcomes: The Moderating Effects of Personal Resiliency. *J Psychol*. 2016;150(3):318–32.
- Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):383–95.
- Soares NL, Paiva I, Bravo J, Queiroga CSF, Melo BF, Conde SV, Romão CC, Summavielle T, Vieira HLA. Carbon Monoxide Modulation of Microglia-Neuron Communication: Anti-Neuroinflammatory i Neurotrophic Role. *Mol Neurobiol*. 2022;59(2):872–89.
- Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(2):a020420.
- Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4+T Cells in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:114.

- Sorrells SF, Munhoz CD, Manley NC, Yen S, Sapolsky RM. Glucocorticoids increase excitotoxic injury i inflammation in the hippocampus of adult male rats. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2-3):129-40.
- Stahnisch FW, Nitsch R. Santiago Ramón y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on. *Trends in Neurosciences*. 2002;25(11):589-91.
- Stanojlović O, Hrncić D, Rasić A, Loncar-Stevanović H, Djuric D, Susić V. Interaction of Delta sleep-inducing peptide i valproate on metaphit audiogenic seizure model in rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2007;27(7):923-32.
- Stanojlović O, Nikolić T, Hrncić D, Radonjić N, Rašić-Marković A, Mladenović D, Petronijević N. Ontogenetic influence on rat susceptibility to lindane seizure after pretreatment with phencyclidine. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;35(2):161-70.
- Stanojlović O, Rašić-Marković A, Hrncić D, Šušić V, Macut D, Radosavljević T, Djuric D. Two Types of Seizures in Homocysteine Thiolactone-Treated Adult Rats, Behavioral i Electroencephalographic Study. *Cellular i Molecular Neurobiology*. 2009a;29(3):329-39.
- Stanojlović O, Rasić-Marković A, Hrncić D, Susić V, Macut D, Radosavljević T, Djuric D. Two types of seizures in homocysteine thiolactone-treated adult rats, behavioral i electroencephalographic study. *Cell Mol Neurobiol*. 2009b;29(3):329-39.
- Steimer M, Kaiser S, Ulbrich F, Kalbhenn J, Bürkle H, Schallner N. Expression of HO1 i PER2 can predict the incidence of delirium in trauma patients with concomitant brain injury. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2021;11(1):15388.
- Stephen LJ, Brodie MJ. Epilepsy in elderly people. *The Lancet*. 2000;355(9213):1441-6.
- Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, Amor S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2018;154(2):204-19.
- Steullet P, Cabungcal J-H, Coyle J, Didriksen M, Gill K, Grace AA, Hensch TK, LaMantia A-S, Lindemann L, Maynard TM, Meyer U, Morishita H, O'Donnell P, Puhl M, Cuenod M, Do KQ. Oxidative stress-driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2017;22(7):936-43.
- Ströhle A. Physical activity, exercise, depression i anxiety disorders. *J Neural Transm (Vienna)*. 2009;116(6):777-84.
- Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress i antioxidants in epilepsy. *Clinica Chimica Acta*. 2001;303(1-2):19-24.
- Sugaya K, Nishijima S, Yamada T, Miyazato M, Hatano T, Ogawa Y. Molecular analysis of adrenergic receptor genes i interleukin-4/interleukin-4 receptor genes in patients with interstitial cystitis. *J Urol*. 2002;168(6):2668-71.
- Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018;127(2):175-86.
- Sun Y, Koyama Y, Shimada S. Inflammation From Peripheral Organs to the Brain: How Does Systemic Inflammation Cause Neuroinflammation? *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;14.
- Susić V, Markovic O. Potentiation of metaphit-induced audiogenic seizures by REM sleep deprivation in rats. *Physiology & Behavior*. 1993;54(2):331-8.
- Svensson M, Lexell J, Deierborg T. Effects of Physical Exercise on Neuroinflammation, Neuroplasticity, Neurodegeneration, i Behavior: What We Can Learn From Animal Models in Clinical Settings. *Neurorehabil Neural Repair*. 2015;29(6):577-89.
- Sweatt JD. Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology*. 2004;174(1).

Š

Šutulović N, Pietro M, Šuvakov S, Hrnčić D. Glial cells, blood brain barrier i cytokines in seizures: Implications for therapeutic modalities. *Medicinski podmladak*. 2018;69(3):33–40.

T

't Hart BA, den Dunnen WF. Commentary on Special Issue: CNS Diseases i the Immune System. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8(4):757–9.

Tadros NN, Shah AB, Shoskes DA. Utility of trigger point injection as an adjunct to physical therapy in men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Transl Androl Urol*. 2017;6(3):534–7.

Tajerian M, Hung V, Nguyen H, Lee G, Joubert L-M, Malkovskiy AV, Zou B, Xie S, Huang T-T, Clark JD. The hippocampal extracellular matrix regulates pain i memory after injury. *Mol Psychiatry*. 2018;23(12):2302–13.

Takata F, Nakagawa S, Matsumoto J, Dohgu S. Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention i Treatment of BBB Dysfunction. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:661838.

Takechi S, Yokoyama M, Tanji N, Nishio S, Araki N. Nonbacterial prostatitis caused by partial urethral obstruction in the rat. *Urol Res*. 1999;27(5):346–50.

Takei S, Hasegawa-Ishii S, Uekawa A, Chiba Y, Umegaki H, Hosokawa M, Woodward DF, Watanabe K, Shimada A. Immunohistochemical demonstration of increased prostaglandin F2 α levels in the rat hippocampus following kainic acid-induced seizures. *Neuroscience*. 2012;218:295–304.

Tang M, Ullah R, Wazir J, Khan FU, Ihsan AU, Cui X, Wang W, Hu M, Liu Y, Zhou X. Effect of Oral T2 Antigen on Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome in Mice Model. *Inflammation*. 2019;42(6):2086–94.

Tanila H. Testing cognitive functions in rodent disease models: Present pitfalls i future perspectives. *Behavioural Brain Research*. 2018;352:23–7.

Tellez-Zenteno JF, Matijevec S, Wiebe S. Somatic Comorbidity of Epilepsy in the General Population in Canada. *Epilepsia*. 2005;46(12):1955–62.

Temp FR, Marafija JR, Milanese LH, Duarte T, Rambo LM, Pillat MM, Mello CF. Cyclooxygenase-2 inhibitors differentially attenuate pentylentetrazol-induced seizures i increase of pro- i anti-inflammatory cytokine levels in the cerebral cortex i hippocampus of mice. *European Journal of Pharmacology*. 2017;810:15–25.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968;61(2):748–55.

Tian D-S, Peng J, Murugan M, Feng L-J, Liu J-L, Eyo UB, Zhou L-J, Mogilevsky R, Wang W, Wu L-J. Chemokine CCL2–CCR2 Signaling Induces Neuronal Cell Death via STAT3 Activation i IL-1 β Production after Status Epilepticus. *J Neurosci*. 2017;37(33):7878–92.

Toda T, Parylak S, Linker SB, Gage FH. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health i disease. *Mol Psychiatry*. 2019;24(1):67–87.

Tomé A da R, Feitosa CM, Freitas RM de. Neuronal damage i memory deficits after seizures are reversed by ascorbic acid? *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2010;68(4):579–85.

- Torres-Platas SG, Cruceanu C, Chen GG, Turecki G, Mechawar N. Evidence for increased microglial priming i macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain, Behavior, i Immunity*. 2014;42:50–9.
- Treede R-D, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Evers S, Finnerup NB, First MB, Giamberardino MA, Kaasa S, Korwisi B, Kosek E, Lavand’homme P, Nicholas M, Perrot S, Scholz J, Schug S, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JWS, Wang S-J. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*. 2019;160(1):19–27.
- Tripp DA, Nickel JC, Wang Y, Litwin MS, McNaughton-Collins M, Landis JR, Alexander RB, Schaeffer AJ, O’Leary MP, Pontari MA, Fowler JE, Nyberg LM, Kusek JW. Catastrophizing i Pain-Contingent Rest Predict Patient Adjustment in Men With Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *The Journal of Pain*. 2006;7(10):697–708.
- True LD, Berger RE, Rothman I, Ross SO, Krieger JN. PROSTATE HISTOPATHOLOGY AND THE CHRONIC PROSTATITIS/CHRONIC PELVIC PAIN SYNDROME: A PROSPECTIVE BIOPSY STUDY. *Journal of Urology*. 1999;162(6):2014–8.
- Tsai S-F, Liu Y-W, Kuo Y-M. Acute i long-term treadmill running differentially induce c-Fos expression in region- i time-dependent manners in mouse brain. *Brain Struct Funct*. 2019;224(8):2677–89.
- Tsang AH, Koch CE, Kiehn JT, Schmidt CX, Oster H. An adipokine feedback regulating diurnal food intake rhythms in mice. *eLife*. eLife Sciences Publications Ltd; 2020;9:1–25.
- Tsilidis KK, Rohrmann S, McGlynn KA, Nyante SJ, Lopez DS, Bradwin G, Feinleib M, Joshi CE, Kanarek N, Nelson WG, Selvin E, Platz EA. Association between endogenous sex steroid hormones i inflammatory biomarkers in US men. *Andrology*. 2013;1(6):919–28.
- Tzeng T-T, Tsay H-J, Chang L, Hsu C-L, Lai T-H, Huang F-L, Shiao Y-J. Caspase 3 involves in neuroplasticity, microglial activation i neurogenesis in the mice hippocampus after intracerebral injection of kainic acid. *J Biomed Sci*. 2013;20:90.

U

- Ulrich K, Jakob U. The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic Biol Med*. 2019;140:14–27.
- Ulrich-Lai YM, Fulton S, Wilson M, Petrovich G, Rinaman L. Stress exposure, food intake i emotional state. *Stress*. Taylor i Francis Ltd; 2015. p. 381–99.
- Untereiner AA, Wu L, Wang R. The Role of Carbon Monoxide as a Gasotransmitter in Cardiovascular i Metabolic Regulation. In: Hermann A, Sitdikova GF, Weiger TM, editors. *Gasotransmitters: Physiology i Pathophysiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 37–70.
- Useinović N, Vorkapić M, Leković A, Ademović A, Šutulović N, Grubač Ž, Rašić-Marković A, Hrnčić D, Stanojlović O. Basic characteristics of epileptiform discharges triggered by lindane in rats. *Medicinski podmladak*. 2018;69(3):69–75.

V

- Vale C, Fonfra E, Bujons J, Messeguer A, Rodriguez-Farr E, Suol C. The organochlorine pesticides γ -hexachlorocyclohexane (lindane), α -endosulfan i dieldrin differentially interact with GABAA i glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience*. 2003;117(2):397–403.

- Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R. The Role of Glia i the Immune System in the Development i Maintenance of Neuropathic Pain: Role of Glia in Neuropathic Pain. *Pain Practice*. 2010;10(3):167–84.
- Vannucci Campos D, Lopim GM, de Almeida VS, Amado D, Arida RM. Effects of different physical exercise programs on susceptibility to pilocarpine-induced seizures in female rats. *Epilepsy & Behavior*. 2016;64:262–7.
- Varatharaj A, Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, i Immunity*. 2017;60:1–12.
- Varma DR, Mulay S, Chemtob S. Chapter 21 - Carbon Monoxide: From Public Health Risk to Painless Killer. In: Gupta RC, editor. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. p. 267–86.
- Vasdev N, C A. Chronic Prostatitis / Chronic Pelvic Pain Syndrome. In: Nikibakhsh A, editor. *Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection*. InTech; 2011.
- Verkhatsky A, Rodríguez JJ, Parpura V. Astroglia in neurological diseases. *Future Neurol*. 2013;8(2):149–58.
- Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, Pittman QJ. Epilepsy i brain inflammation. *Experimental Neurology*. 2013;244:11–21.
- Vezzani A, Baram TZ. New Roles for Interleukin-1 Beta in the Mechanisms of Epilepsy. *Epilepsy Currents*. 2007;7(2):45–50.
- Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F, De Simoni MG. Interleukin-1beta immunoreactivity i microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci*. 1999;19(12):5054–65.
- Vezzani A, Granata T. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental i Clinical Evidence. *Epilepsia*. 2005;46(11):1724–43.
- Vezzani A, Maroso M, Balosso S, Sanchez M-A, Bartfai T. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress i neurodegeneration couples hyperexcitability i seizures. *Brain, Behavior, i Immunity*. 2011;25(7):1281–9.
- Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, Perego C, De Simoni MG. Functional Role of Inflammatory Cytokines i Antiinflammatory Molecules in Seizures i Epileptogenesis. *Epilepsia*. 2002;43(s5):30–5.
- Viviani B, Gardoni F, Marinovich M. Cytokines i Neuronal Ion Channels in Health i Disease. *International Review of Neurobiology*. Elsevier; 2007. p. 247–63.
- Vučević D, Hrnčić D, Radosavljević T, Mladenović D, Rašić-Marković A, Lončar-Stevanović H, Djurić D, Macut D, Šušić V, Stanojlović O. Correlation between electrocorticographic i motor phenomena in lindane-induced experimental epilepsy in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86(4):173–9.
- Vučković S, Srebro D, Vujović KS, Vučetić Č, Prostran M. Cannabinoids i Pain: New Insights From Old Molecules. *Front Pharmacol*. 2018;9:1259.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal i amygdaloid neurons. *J Neurosci*. 2002;22(15):6810–8.
- Vykhovanets EV, Resnick MI, MacLennan GT, Gupta S. Experimental rodent models of prostatitis: limitations i potential. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. Nature Publishing Group; 2007;10(1):15–29.

W

- Wagenlehner FME, van Till JWO, Magri V, Perletti G, Houbiers JGA, Weidner W, Nickel JC. National Institutes of Health Chronic Prostatitis Symptom Index (NIH-CPSI) symptom evaluation in multinational cohorts of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Eur Urol.* 2013;63(5):953–9.
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322–8.
- Walker WH, Walton JC, DeVries AC, Nelson RJ. Circadian rhythm disruption i mental health. *Transl Psychiatry.* Nature Publishing Group; 2020;10(1):1–13.
- Walling SA, Um W, Corkhill CL, Hyatt NC. Fenton i Fenton-like wet oxidation for degradation i destruction of organic radioactive wastes. *npj Mater Degrad.* Nature Publishing Group; 2021;5(1):1–20.
- Wallner LP, Clemens JQ, Sarma AV. Prevalence And Risk Factors For Prostatitis In African American Men: Findings From The Flint Men’s Health Study. *Prostate.* 2009;69(1).
- Wang J, Zhang D, Fu X, Yu L, Lu Z, Gao Y, Liu X, Man J, Li S, Li N, Chen X, Hong M, Yang Q, Wang J. Carbon monoxide-releasing molecule-3 protects against ischemic stroke by suppressing neuroinflammation i alleviating blood-brain barrier disruption. *J Neuroinflammation.* 2018a;15(1):188.
- Wang J-Y, Wang Y-L, Zhou S-L, Zhou J-F. May chronic childhood constipation cause oxidative stress i potential free radical damage to children? *Biomed Environ Sci.* 2004;17(3):266–72.
- Wang L, Song Y-L, Sun P, Li Z-C, Zhao N. Analysis of EEG abnormalities of cognitive impairment i epileptic seizures in patients with epilepsy. *European Review for Medical i Pharmacological Sciences.* 2019;23(24):10964–9.
- Wang Q, Van Heerikhuize J, Aronica E, Kawata M, Seress L, Joels M, Swaab DF, Lucassen PJ. Glucocorticoid receptor protein expression in human hippocampus; stability with age. *Neurobiology of Aging.* 2013;34(6):1662–73.
- Wang R, Tian H, Guo D, Tian Q, Yao T, Kong X. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. *J Sport Health Sci.* 2020;9(3):211–27.
- Wang S, Cheng Q, Malik S, Yang J. Interleukin-1 β Inhibits γ -Aminobutyric Acid Type A (GABAA) Receptor Current in Cultured Hippocampal Neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292(2):497–504.
- Wang W, Naveed M, Baig MMFA, Abbas M, Xiaohui Z. Experimental rodent models of chronic prostatitis i evaluation criteria. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018b;108:1894–901.
- Wang X, Gu J, Wu X, Meng Q, Mei M. Effect of zinc protoporphyrin on carbon monoxide/heme oxygenase-1 system in rats subjected to recurrent febrile convulsion. *Neural Regeneration Research.* 2007;2(8):466–70.
- Wang Y, Chen C, Zhu C, Chen L, Han Q, Ye H. Social Determinants of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome Related Lifestyle i Behaviors among Urban Men in China: A Case-Control Study. *BioMed Research International.* Hindawi; 2016;2016:e1687623.
- Wang Y-L, Han Q-Q, Gong W-Q, Pan D-H, Wang L-Z, Hu W, Yang M, Li B, Yu J, Liu Q. Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- i anxiety-like behavior in adult rats. *J Neuroinflammation.* 2018c;15(1):21.
- Warburton DER, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. *Curr Opin Cardiol.* 2017;32(5):541–56.

- Wardill HR, Mander KA, Van Sebille YZA, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Sonis ST. Cytokine-mediated blood brain barrier disruption as a conduit for cancer/chemotherapy-associated neurotoxicity i cognitive dysfunction. *Int J Cancer*. 2016;139(12):2635–45.
- Warner TA, Kang J-Q, Kennard JA, Harrison FE. Low brain ascorbic acid increases susceptibility to seizures in mouse models of decreased brain ascorbic acid transport i Alzheimer’s disease. *Epilepsy Research*. 2015;110:20–5.
- Watts ME, Pocock R, Claudianos C. Brain Energy i Oxygen Metabolism: Emerging Role in Normal Function i Disease. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:216.
- Wee A, Shoskes DA. Ultrasound findings in patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Curr prostate rep*. 2008;6(4):182–4.
- Wei F, Dubner R, Zou S, Ren K, Bai G, Wei D, Guo W. Molecular Depletion of Descending Serotonin Unmasks Its Novel Facilitatory Role in the Development of Persistent Pain. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(25):8624–36.
- Weiner ML. Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies. *Crit Rev Toxicol*. 2014;44(3):244–69.
- Weissman MM, Gross R, Fyer A, Heiman GA, Gameroff MJ, Hodge SE, Kaufman D, Kaplan SA, Wickramaratne PJ. Interstitial cystitis i panic disorder: a potential genetic syndrome. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61(3):273–9.
- Weninger SC, Muglia LJ, Jacobson L, Majzoub JA. CRH-deficient mice have a normal anorectic response to chronic stress. *Regulatory Peptides*. *Regul Pept*; 1999;84(1–3):69–74.
- Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW, Parks TP. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha i phorbol myristate acetate. *J Biol Chem*. 1992;267(17):12030–5.
- Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*. 2007;24(2):178–98.
- Wetherington J, Serrano G, Dingleline R. Astrocytes in the Epileptic Brain. *Neuron*. 2008;58(2):168–78.
- Whitlock EL, Diaz-Ramirez LG, Glymour MM, Boscardin WJ, Covinsky KE, Smith AK. Association Between Persistent Pain i Memory Decline i Dementia in a Longitudinal Cohort of Elders. *JAMA Intern Med*. 2017;177(8):1146–53.
- Wilhelmsson U, Pozo-Rodrigalvarez A, Kalm M, de Pablo Y, Widestrand Å, Pekna M, Pekny M. The role of GFAP i vimentin in learning i memory. *Biological Chemistry*. 2019;400(9):1147–56.
- Wilson JL, Bouillaud F, Almeida AS, Vieira HL, Ouidja MO, Dubois-Randé J-L, Foresti R, Motterlini R. Carbon monoxide reverses the metabolic adaptation of microglia cells to an inflammatory stimulus. *Free Radical Biology i Medicine*. 2017;104:311–23.
- Wojtowicz JM, Kee N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc*. Nature Publishing Group; 2006;1(3):1399–405.
- Wooltorton E. Concerns over lindane treatment for scabies i lice. *CMAJ*. 2003;168(11):1447–8.
- Wright AS, Douglas RC, Thomas LN, Lazier CB, Rittmaster RS. Androgen-Induced Regrowth in the Castrated Rat Ventral Prostate: Role of 5 α -Reductase1. *Endocrinology*. 1999;140(10):4509–15.
- Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, i pharmacological applications. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4):585–630.

- Wu S, Wolfe A. Signaling of Cytokines is Important in Regulation of GnRH Neurons. *Mol Neurobiol.* 2012;45(1):119–25.
- Wu X, Cheng K, Xu C, Liu S, Sun Q, Yang Z, Dai X, Li N. Mechanism of Acupuncture i Moxibustion on Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Narrative Review of Animal Studies. *Pain Res Manag.* 2021;2021:2678242.

X

- Xu D, Miller SD, Koh S. Immune mechanisms in epileptogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2013;7.

Y

- Yabluchanskiy A, Sawle P, Homer-Vanniasinkam S, Green CJ, Foresti R, Motterlini R. CORM-3, a carbon monoxide-releasing molecule, alters the inflammatory response i reduces brain damage in a rat model of hemorrhagic stroke*: *Critical Care Medicine.* 2012;40(2):544–52.
- Yan X-S, Yang Z-J, Jia J-X, Song W, Fang X, Cai Z-P, Huo D-S, Wang H. Protective mechanism of testosterone on cognitive impairment in a rat model of Alzheimer’s disease. *Neural Regen Res.* 2019;14(4):649–57.
- Yang T, Dai Y, Chen G, Cui S. Dissecting the Dual Role of the Glial Scar i Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2020a;14.
- Yang T, Nie Z, Shu H, Kuang Y, Chen X, Cheng J, Yu S, Liu H. The Role of BDNF on Neural Plasticity in Depression. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2020b;14.
- Yang Z, Qin J, Du J, Chang X, Han Y. [Effect of endogenous heme oxygenase-carbon monoxide on brain damage induced by recurrent febrile seizures]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2005;43(4):252–5.
- Yang Z, Wang KKW. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly i gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences.* 2015;38(6):364–74.
- Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *J Vis Exp.* 2015;(97):52587.
- Yatkin E, Bernoulli J, Talvitie E-M, Santti R. Inflammation i epithelial alterations in rat prostate: impact of the androgen to oestrogen ratio. *Int J Androl.* 2009;32(4):399–410.
- Yavuzer H, Yavuzer S, Cengiz M, Erman H, Doventas A, Balci H, Erdinçler DS, Uzun H. Biomarkers of lipid peroxidation related to hypertension in aging. *Hypertens Res.* Nature Publishing Group; 2016;39(5):342–8.
- Yi C-X, Al-Massadi O, Donelan E, Lehti M, Weber J, Röss C, Trivedi C, Müller TD, Woods SC, Hofmann SM. Exercise protects against high-fat diet-induced hypothalamic inflammation. *Physiol Behav.* 2012;106(4):485–90.
- Yoon BI, Bae WJ, Kim SJ, Kim HS, Ha US, Sohn DW, Hwang S-Y, Kim SW. The Anti-Inflammatory Effects of a New Herbal Formula (WSY-1075) in a Nonbacterial Prostatitis Rat Model. *The World Journal of Men’s Health.* 2013;31(2):150.
- Yoon YE, Lee KS, Lee YJ, Lee HH, Han WK. Renoprotective Effects of Carbon Monoxide–Releasing Molecule 3 in Ischemia-Reperfusion Injury i Cisplatin-Induced Toxicity. *Transplantation Proceedings.* 2017;49(5):1175–82.
- Youn Y, Sung IK, Lee IG. The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1 β , IL-1Ra, IL-8, i IL-10. *Korean J Pediatr.* 2013;56(7):271.

Yuhas Y, Weizman A, Vanichkin A, Ashkenazi S. Involvement of prostaglandins in an animal model of Shigella-related seizures. *Journal of Neuroimmunology*. 2005;168(1-2):34-9.

Z

Zafir A, Banu N. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress*. 2009;12(2):167-77.

Zeng F, Chen H, Yang J, Wang L, Cui Y, Guan X, Wang Z, Niu J, Zu X, Qi L, Zhang X, Tang Z, Liu L. Development i Validation of an Animal Model of Prostate Inflammation-Induced Chronic Pelvic Pain: Evaluating from Inflammation of the Prostate to Pain Behavioral Modifications. Thumbikat P, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e96824.

Zhang C, Wang X, Du J, Gu Z, Zhao Y. Reactive Oxygen Species-Regulating Strategies Based on Nanomaterials for Disease Treatment. *Adv Sci*. 2021a;8(3):2002797.

Zhang C, Zhang Y-P, Li Y-Y, Liu B-P, Wang H-Y, Li K-W, Zhao S, Song C. Minocycline ameliorates depressive behaviors i neuro-immune dysfunction induced by chronic unpredictable mild stress in the rat. *Behavioural Brain Research*. 2019a;356:348-57.

Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong J-S. Astrogliosis in CNS Pathologies: Is There A Role for Microglia? *Mol Neurobiol*. 2010;41(0):232-41.

Zhang GX, Bai WJ, Xu T, Wang XF. A preliminary evaluation of the psychometric profiles in Chinese men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(4):514-8.

Zhang J, Liang C, Shang X, Li H. Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome: A Disease or Symptom? Current Perspectives on Diagnosis, Treatment, i Prognosis. *Am J Mens Health*. 2020a;14(1):155798832090320.

Zhang J, Zhang X, Cai Z, Li N, Li H. The Lifetime Risk i Prognosis of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome in the Middle-Aged Chinese Males. *Am J Mens Health*. 2019b;13(4):155798831986538.

Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation, i Pain. *International Anesthesiology Clinics*. 2007;45(2):27-37.

Zhang K, Zeng X, Chen Y, Zhao R, Wang H, Wu J. Therapeutic effects of Qian-Yu decoction i its three extracts on carrageenan-induced chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome in rats. *BMC Complementary i Alternative Medicine*. 2017;17(1).

Zhang M, Luo C, Cui K, Xiong T, Chen Z. Chronic inflammation promotes proliferation in the prostatic stroma in rats with experimental autoimmune prostatitis: study for a novel method of inducing benign prostatic hyperplasia in a rat model. *World J Urol*. 2020b;38(11):2933-43.

Zhang R, Chomistek AK, Dimitrakoff JD, Giovannucci EL, Willett WC, Rosner BA, Wu K. Physical Activity i Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2015;47(4):757-64.

Zhang X, Gao R, Zhang C, Chen H, Wang R, Zhao Q, Zhu T, Chen C. Evidence for Cognitive Decline in Chronic Pain: A Systematic Review i Meta-Analysis. *Front Neurosci*. 2021b;15:737874.

Zhang Y, Li X, Zhou K, Zhou M, Xia K, Xu Y, Sun X, Zhu Y, Cui C, Deng C. Influence of Experimental Autoimmune Prostatitis on Sexual Function i the Anti-inflammatory Efficacy of Celecoxib in a Rat Model. *Frontiers in Immunology*. *Frontiers Media S.A.*; 2020c;11.

Zhao WP, Zhang ZG, Li XD, Yu D, Rui XF, Li GH, Ding GQ. Celecoxib reduces symptoms in men with difficult chronic pelvic pain syndrome (Category IIIA). *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(10):963-7.

- Zhao Y, Lin J, Dong Y, Tian Z, Ye Y, Ma Z, Xia S, Huang X, Chen D, Zhang P. Neuroimaging Studies of Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome. *Pain Research i Management*. Hindawi; 2022;2022:e9448620.
- Zhao Y, Zhang J, Zheng Y, Zhang Y, Zhang XJ, Wang H, Du Y, Guan J, Wang X, Fu J. NAD⁺ improves cognitive function i reduces neuroinflammation by ameliorating mitochondrial damage i decreasing ROS production in chronic cerebral hypoperfusion models through Sirt1/PGC-1 α pathway. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):207.
- Zhou WBS, Meng J, Zhang J. Does Low Grade Systemic Inflammation Have a Role in Chronic Pain? *Front Mol Neurosci*. 2021;14:785214.
- Zhou X, Li L, Wu L, Han L, Liu Z, Yang J, Lv Y, You C, Zhou Z. Increased Inflammatory Factors Activity in Model Rats with Experimental Autoimmune Prostatitis. *Archives of Andrology*. Taylor & Francis; 2007;53(2):49–52.
- Zhu G, Okada M, Yoshida S, Mori F, Ueno S, Wakabayashi K, Kaneko S. Effects of interleukin-1 β on hippocampal glutamate i GABA releases associated with Ca²⁺-induced Ca²⁺ releasing systems. *Epilepsy Research*. 2006;71(2–3):107–16.
- Zifkin BG, Inoue Y. Visual Reflex Seizures Induced by Complex Stimuli. *Epilepsia*. 2004;45(s1):27–9.
- Zou D, Chen L, Deng D, Jiang D, Dong F, McSweeney C, Zhou Y, Liu L, Chen G, Wu Y, Mao Y. DREADD in Parvalbumin Interneurons of the Dentate Gyrus Modulates Anxiety, Social Interaction i Memory Extinction. *Curr Mol Med*. 2016;16(1):91–102.
- Zweier JL, Samouilov A, Kuppusamy P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1999;1411(2):250–62.

PRILOZI

OBJAVLJENI REZULTATI

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 Dj, 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 Dj, Puškaš N, Macut Dj, 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 β 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.

Izvodi u zborniku međunarodnog naučnog skupa:

1. **Šutulović N**, Zubelić A, Grubač Ž, Mladenović D, Vesković M, Popov D, Macut Đ, Rašić-Marković A, Stanojlović O, Hrnčić D. Brain hyperexcitability in an experimental model of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: modulation by CO*. 12th European Congress of Andrology (ECA), Barcelona, Spain, October 19th-21st 2022. *Andrology* 2022; 10(suppl. 3):72-73.
**Nagrada u vidu Travel Grant dodeljana od strane EU COST akcije ANDRONET*
2. **Šutulović N**, Grubač Ž, Jerotić Đ, Šuvakov S, Đurić E, Puškaš N, Macut Đ, Rašić-Marković A, Simić T, Stanojlović O, Hrnčić D. Experimental chronic pelvic pain syndrome alters open field behaviour and brain inflammatory interleukin profile. FENS 2020 Virtual forum, July 11th-15th 2020. Abstract print.
3. **Šutulović N**, Grubač Ž, Ademović A, Knežević B, Puškaš N, Rašić-Marković A, Stanojlović O, Hrnčić D. Can chronic pelvic pain provoke rats brain hyperexcitability? FENS regional meeting, Belgrade, Serbia, July 10th-13th 2019. Abstractbook, p374.
4. **Šutulović N**, Grubač Ž, Ademović A, Puškaš N, Rašić-Marković A, Stanojlović O, Hrnčić D. Behavioral alterations linked with anxiety in experimental model of chronic pelvic pain. 4th Congress of Physiological Sciences of Serbia with international participation, Niš, 19. – 23. septembar 2018. Zbornik sažetaka, p74.
5. **Šutulović N**, Grubač Ž, Ademović A, Puškaš N, Rašić-Marković A, Hrnčić D, Stanojlović O. Chronic Prostatitis/ Chronic Pelvic Pain Syndrome in rats: relationship with depressive-linked behavior. 7th congress of Serbian neuroscience society with international participation, Belgrade, Serbia, October 25th-27th 2017. Abstract book, p9

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Nikola B. Šutulović je asistent na Katedri za užu naučnu oblast medicinska fiziologija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Rođen je u Beogradu 1990. godine. Gimnaziju „Bora Stanković“ u Boru završio je 2009. godine kao đak generacije, a potom upisuje Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu koji završava 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,86. Za uspehe tokom studija bio je pet puta nagrađen Pohvalnicom Dekana. Obavezni lekarski staž završava u Univerzitetskom Kliničkom Centru Srbije. Usavršavanje je nastavio na doktorskim akademskim studijama na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Fiziološke nauke pod mentorstvom prof. dr D. Hrnčića. Od 2017. godine dr Šutulović je na zdravstvenoj specijalizaciji iz Ginekologije i akušerstva na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a specijalistički staž obavlja u GAK „Narodni Front“. U zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast medicinska fiziologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu izabran je 2018. godine, kada započinje rad na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, a 2020. godine biva izabran u zvanje asistenta.

Svoj naučno-istraživački rad dr Šutulović je započeo u Laboratoriji za neurofiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“ još kao student, 2011. godine, a sada je u istoj laboratoriji član projekta resornog ministarstva za nauku (OI-175032/200110, rukovodilac O. Stanojlović), međunarodnog bilateralnog projekta (FA4Lin, MNTR i TUBITAK, rukovodilac D. Hrnčić), kao i učesnik dve EU-COST akcije (CA20135 TEATIME i CA20119 ANDRONET, MC: D. Hrnčić).

Bibliografija dr Šutulovića do sada broji 86 jedinice. Autor je 23 *in extenso* rada, od čega je 12 radova u međunarodnim časopisima indeksiranim u JCR/WOS. Učestvovao je na međunarodnim (47 izvoda) i nacionalnim skupovima (15 izvoda). Za učešće na 12. Kongresu androloga 2022. god u Barseloni mu je dodeljena nagrada od strane ANDRONET akcije u vidu putnog granta.

Dr Šutulović učestvuje u svim vidovima nastave koji se realizuju na Institutu za medicinsku fiziologiju, a mentor je u programu CNSIRS-a. Bio je supervizor inostranim studentima koji su bili na studentskoj razmeni na našem fakultetu, zbog čega je dobitnik tri Zahvalnice IFMSA Serbia. Dobitnik je i dve Zahvalnice GSC-a za učešće u organizaciji nekoliko radionica u okviru Global Students' Conference u Beogradu.

Oblasti užeg naučno-stručnog interesovanja: neurofiziologija, fiziologija bola, fiziologija spavanja, reproduktivna fiziologija, ginekologija i akušerstvo.

ОБАВЕЗНИ ПРИЛОЗИ

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Никола Шутуловић**

Број индекса: **ФН-02/15**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Функционалне и биохемијске промене централног нервног система у експерименталном моделу хроничног пелвичног бола“

резултат сопственог истраживачког рада;

- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кришио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 05.12.2022. год.



ОБАВЕЗНИ ПРИЛОЗИ

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Никола Шутуловић**

Број индекса: **ФН-02/15**

Студијски програм: **Докторске студије из медицинских наука – смер Физиолошке науке**

Наслов рада: **„Функционалне и биохемијске промене централног нервног система у експерименталном моделу хроничног пелвичног бола“**

Ментори: **Проф. др Драган Хрнчић, Др Соња Шуваков, научни сарадник**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 05.12.2022. год.



ОБАВЕЗНИ ПРИЛОЗИ

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Функционалне и биохемијске промене централног нервног система у експерименталном моделу хроничног пелвичног бола“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 05.12.2022.



ОБАВЕЗНИ ПРИЛОЗИ

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.