

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04. 2016. godine, broj 5940/4, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Ispitivanje mehanizma supresivnog dejstva magnezijuma na eksperimentalno izazvanu epileptiformnu aktivnost Recijusovih neurona pijavice”

kandidata asistenta dr Marije Stanojević, zaposlene na Katedri za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je prof. dr Vladimir Nedeljkov.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Milica Prostran, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Srđan Lopičić, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Zorica Jovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu.

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija asistenta dr Marije Stanojević napisana je na 131 strani i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 15 slika, 21 tabela i 5 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je prikazan značaj paroksizmalnog talasa depolarizacije (PTD) kao karakterističnog fenomena epileptičke aktivnosti na ćelijskom nivou. Takođe su opisani značaj i uloga nesinaptičkih mehanizama nastanka epileptičke aktivnosti, a naročito izmenjene jonske mikrosredine u vidu porasta vanćelijske koncentracije jona K^+ i smanjenja vanćelijske koncentracije jona Ca^{2+} , koji mogu dovesti do hiperekscitabilnosti neurona. Istaknuti su nalazi eksperimentalnih studija o Na^+ - zavisnoj epileptiformnoj aktivnosti i naglašena uloga perzistentne Na^+ struje u nastanku hiperekscitabilnosti neurona u epilepsiji. U uvodu je takođe istaknut značaj Recijusovog neurona pijavice kao modela natrijumskog oscilatora u bazičnim istraživanjima ćelijskih mehanizama epileptogeneze. Najzad, naglašena je i uloga magnezijuma kao bioesencijalnog elementa značajnog u regulaciji razdražljivosti nervnih ćelija, kao i njegov antiepileptički potencijal.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju efekta jona magnezijuma na eksperimentalnu epileptiformnu aktivnost Recijusovih neurona izolovane segmentne ganglije pijavice *Haemopsis sanguisuga*, indukovanu primenom nikla, i jonskog mehanizma nastalog efekta magnezijuma. U tu svrhu ispitivana je i dozna zavisnost dejstva magnezijuma na karakteristike niklom indukovane epileptiformne aktivnosti Recijusovih neurona pijavice. U cilju ispitivanja mehanizma dejstva magnezijuma na ovom modelu, ispitivan je takođe i efekat magnezijuma na spontanu električnu aktivnost i aktivnost Recijusovih neurona izazvanu draženjem depolarišućim strujnim impulsima, kao i na ulazni otpor slobodne membrane Recijusovog neurona u standardnim jonskim uslovima, i ulazni otpor membrane (UOM) u toku Ni^{2+} - indukovane epileptiformne aktivnosti.

U poglavlju **Materijal i metode** opisan je eksperimentalni protokol izvođenja oglada. Navedeno je da su eksperimenti izvođeni na pijavicama vrste *Haemopsis sanguisuga*. Opisan je postupak anesteziranja i preparacije u cilju izolovanja segmenta nervne vrpce, kao i identifikovanja Recijusovih neurona slobodnih ganglija pijavice. Navedeno je da su korišćene metode klasične elektrofiziologije: intraćelijsko registrovanje potencijala membrane i električne aktivnosti ćelije, direktna električna stimulacija membrane i određivanje ulaznog otpora slobodne membrane Recijusovog neurona pijavice. Navedeni su električni uređaji neophodni za registrovanje i draženje. Precizno je objašnjen postupak izračunavanja ulaznog otpora membrane neurona. Prikazan je sastav rastvora korišćenih u ogleđima. Opisan je način eksperimentalnog izazivanja epileptiformne aktivnosti Recijusovih neurona superfuzijom preparata izolovanih ganglija pijavice Ringerovim rastvorom sa 3 mmol/l NiCl₂. U okviru analize rezultata opisan je postupak merenja sa napravljenih registracija. Niklom indukovana epileptiformna aktivnost opisivana je pomoću nekoliko kvantitativnih parametara paroksizmalnih talasa depolarizacije (frekvencija, trajanje, amplituda i broj akcionih potencijala po PTD-u). Istaknut je postupak izračunavanja intenziteta indukovane epileptiformne aktivnosti, analize dozne zavisnosti supresivnog dejstva Mg²⁺ na datu epileptiformnu aktivnost i statističke analize dobijenih rezultata.

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

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 184 reference.

B) Kratak opis postignutih rezultata

U ovom istraživanju korišćen je eksperimentalni model epileptiformne aktivnosti Recijusovih neurona indukovane blokadom voltažno - zavisnih Ca²⁺ kanala pomoću Ni²⁺. Iz literaturnih podataka je poznato da se radi o Na⁺ - zavisnoj nesinaptičkoj epileptiformnoj aktivnosti. Pokazano je da ova Na⁺ - zavisna Ni²⁺ – indukovana epileptiformna aktivnost biva reverzibilno dozno – zavisno suprimirana primenom MgCl₂. U opsegu testiranih koncentracija

(1 mmol/l, 3 mmol/l, 7 mmol/l, 10 mmol/l i 20 mmol/l Mg^{2+}), magnezijum pokazuje supresiju ove epileptiformne aktivnosti, statistički značajno smanjujući vrednosti svih posmatranih PTD parametara na dozno – zavisani način. Analiza dozne zavisnosti magnezijumske supresije pokazala je da se polumaksimalno inhibitorno dejstvo magnezijuma na sve PTD parametre od značaja postiže sa približno 10 mmol/l Mg^{2+} .

Obzirom da je doza od 20 mmol/l Mg^{2+} u potpunosti suzbijala indukovano epileptiformno pražnjenje, u ovoj studiji ispitivani su njeni efekti na elektrofiziološka svojstva membrane i spontanu aktivnost Recijusovih neurona. Rezultati su pokazali da magnezijum suprimira spontanu električnu aktivnost Recijusovih neurona, visoko statistički značajno smanjujući njihovu frekvenciju spontanog okidanja akcionih potencijala (AP). Takođe je nađeno da 20 mmol/l Mg^{2+} suprimira i aktivnost ćelije izazvanu draženjem depolarizujućim strujnim impulsima, statistički značajno podižući nivo praga za izbijanje AP-â i visoko statistički značajno smanjujući učestalost okidanja izazvanih AP-â Recijusovih neurona. Premda istovremeno izaziva i malu depolarizaciju mirovnog membranskog potencijala, Mg^{2+} ispoljava neto stabilizujuće dejstvo na membranu Recijusovog neurona, značajno smanjujući njenu ekscitabilnost. Rezultati su takođe pokazali da 20 mmol/l Mg^{2+} značajno povećava UOM Recijusovog neurona u standardnim jonskim uslovima, kao i tokom Ni^{2+} - indukovane epileptiformne aktivnosti. Ovo ukazuje na to da Mg^{2+} deluje na membranu Recijusovog neurona da izazove zatvaranje jonskih kanala i smanjenje provodljivosti membrane, kao i da ovaj mehanizam posreduje njegovo supresivno dejstvo na datu epileptiformnu aktivnost.

Navedeno je da opisana supresivna dejstva Mg^{2+} na spontanu aktivnost, stimulacijom izazvanu aktivnost, kao i na Ni^{2+} - indukovanu epileptiformnu aktivnost Recijusovih neurona pijavice, Mg^{2+} najverovatnije ostvaruje pretpostavljenim mehanizmom blokade Na^+ kanala.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Glavni ćelijski događaj u osnovi procesa epileptogeneze jeste povećana ekscitabilnost neurona koja se manifestuje ritmičkim nastankom PTD-a; pa ipak, osnovni mehanizmi nastanka PTD-a još uvek nisu u potpunosti objašnjeni. U većini do sada opisanih eksperimentalnih modela nastanak plato depolarizacija zahteva influks Ca^{2+} kroz voltažno -

zavisne Ca^{2+} kanale, te je Ca^{2+} neophodan za ritmičku aktivnost neurona. Međutim, sve veći broj studija nalazi da indukcija epileptiformne aktivnosti može biti Ca^{2+} - nezavistan i sinaptički nezavistan proces. Tako se epileptiformna aktivnost razvija u isečcima hipokampusa pacova u rastvorima sa niskim sadržajem Ca^{2+} ili bez Ca^{2+} (Wang i sar., 2004). Slično tome, u pojedinačnih izolovanih Recijusovih neurona pijavice *Hirudo medicinalis* blokatori Ca^{2+} kanala indukuju Na^+ - zavisne plato potencijale (Angstadt i Choo, 1996; Angstadt i sar., 1998). Angstadt i Friesen (1991) i Angstadt (1999) predložili su mehanizam inicijacije ove epileptiformne aktivnosti kojim blokada voltažno - zavisnog influksa Ca^{2+} suprimira Ca^{2+} - aktiviranu K^+ struju ($I_{\text{K}(\text{Ca})}$), demaskirajući efekte perzistentne Na^+ struje (I_{NaP}), što rezultuje brzom depolarizacijom i njenim održavanjem u fazi platoa. U Recijusovih neurona pijavice *H. sanguisuga* u prisustvu 3 mmol/l Ni^{2+} dolazi do spontane indukcije endogene oscilatorne aktivnosti sa ritmičkim visokofrekventnim pražnjenjem (Pathak i sar., 2009 i 2010; Stanojević i sar., 2015). Tako izazvana epileptiformna aktivnost smatra se suštinski nesinaptičkim procesom, jer biva indukovana u uslovima supresije hemijske sinaptičke transmisije. Ova studija koristi ovaj eksperimentalni model Na^+ - zavisne Ni^{2+} - indukovane epileptiformne aktivnosti Recijusovih neurona pijavice *H. sanguisuga*, za koju Pathak i sar. (2009) navode da je odgovoran isti mehanizam kao i onaj opisan na vrsti *H. medicinalis*. Ovde je ispitivano dejstvo Mg^{2+} na dato epileptiformno pražnjenje, kao i karakteristike i mehanizam antiepileptičkog efekta Mg^{2+} na ovom modelu.

Primena rastvora sa Mg^{2+} na ovom modelu dovela je do značajne dozno - zavisne redukcije svih posmatranih parametara epileptiformne aktivnosti, a najviša primenjena koncentracija od 20 mmol/l Mg^{2+} izazivala je brzu i potpunu eliminaciju epileptiformne aktivnosti. Ovo je u skladu sa navodima Borges-a i Gücer-a (1978), koji su našli da MgSO_4 suzbija epileptičku aktivnost neurona indukovanu topikalnom primenom penicilina na motornu koru u mačaka, pasa i primata. Standley i sar. (1995) takođe su našli da intraperitonealna injekcija MgSO_4 značajno skraćuje trajanje epileptičkih napada izazvanih razbuktavanjem u hipokampusa pacova. Sa druge strane, sniženje ekstracelularne koncentracije Mg^{2+} u mnogim delovima CNS-a dovodi do epileptiformne aktivnosti (Walther i sar., 1986). Svi ovi rezultati ukazuju da se Mg^{2+} može koristiti u lečenju nekih oblika epilepsije (James, 2010). Međutim, uprkos sve većem broju i eksperimentalnih i kliničkih

dokaza antiepileptičkog potencijala magnezijuma, mehanizmi i mesta dejstva još uvek su većinom samo hipotetički (Hunter i Gibbins, 2011). Stoga je u ovoj studiji ispitivan efekat visoke doze Mg^{2+} na provodljivost membrane u toku Ni^{2+} - indukovane epileptiformne aktivnosti. Stanojević i saradnici (2015) po prvi put navode da Mg^{2+} značajno povećava UOM, tj. značajno redukuje provodljivost membrane neurona u toku epileptiformne aktivnosti. Smanjenje membranske provodljivosti moglo bi biti rezultat multiplih mehanizama. Jedan mogući mehanizam povećanja UOM-a pod dejstvom Mg^{2+} jeste blokada NMDA receptora jonima Mg^{2+} (Gean i Shinnick – Gallagher, 1988). Međutim ovde Ni^{2+} korišćen da indukuje epileptiformnu aktivnost, kao i sâm rastvor sa visokim sadržajem Mg^{2+} , brzo i potpuno blokiraju hemijsku sinaptičku transmisiju blokadom Ca^{2+} kanala. Osim toga, drugi autori navode da blokada NMDA receptora ne sprečava sve oblike epileptiformne aktivnosti indukovane obustavom Mg^{2+} (Thomson i West, 1986). Stoga je zaključeno da je malo verovatno da je magnezijumska blokada NMDA receptora uzrok smanjenja provodljivosti membrane i supresije epileptiformne aktivnosti magnezijumom na ovom modelu. Ovde verovatniji mehanizam dejstva Mg^{2+} predstavljaju direktni efekti Mg^{2+} na jonske kanale uključene u mehanizam Ni^{2+} - indukovane epileptiformne aktivnosti.

Značajna supresija i spontanog i izazvanog pražnjenja neurona, kao i povišenje potencijala praga za izbijanje AP-a, pretpostavlja se da nastaju usled smanjenja aktivacije voltažno - zavisnih Na^+ kanala putem efekta neutralizacije površnog potencijala membrane jonima Mg^{2+} (Somjen, 2004). Takođe je nađeno da joni Mg^{2+} proizvode kompetitivnu i reverzibilnu blokadu Na^+ kanala centralnih neurona u sisara (Lin i sar., 1991; Sang i Meng, 2002). Mehanizam ovog dejstva je dvostruk, jer Mg^{2+} menja potencijal površine membrane i utiče na provodljivost za Na^+ kompetitivno zauzimajući Na^+ kanale. U skladu sa tim nalazima su i rezultati ovog istraživanja o gotovo potpunom suzbijanju aktivnosti i depresiji ekscitabilnosti Recijusovih neurona u prisustvu Mg^{2+} (Stanojević i sar., 2016).

U ovoj studiji nađeno je sveukupno inhibitorno dejstvo Mg^{2+} na elektrofiziološka svojstva i električnu aktivnost membrane Recijusovih neurona, koje je bilo brzog početka, značajno i reverzibilno. Nalaz Mg^{2+} - indukovano porasta UOM-a (Stanojević i sar., 2016) u skladu je sa rezultatima drugih autora na motoneuronima moždanog stabla pacova (Cameron i sar., 2000; Núñez-Abades i sar., 2000), i hipokampalnim neuronima pacova (Dribben i sar.,

2010). Ovo bi moglo da potvrdi prethodno predloženi mehanizam dejstva magnezijuma putem blokade Na^+ kanala jonima Mg^{2+} .

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Stanojević M**, Lopicic S, Jovanovic Z, Pathak D, Pavlovic D.V, Spasic S, Nedeljkov V, Prostran M. Magnesium effects on nonsynaptic epileptiform activity in leech Retzius neurons. *Folia Biol Krakow*, 2015; 63(4): 301-306.
2. **Stanojević M**, Lopicic S, Spasic S, Vukovic I, Nedeljkov V, Prostran M. Effects of high extracellular magnesium on electrophysiological properties of membranes of Retzius neurons in leech *Haemopsis sanguisuga*. *J Elem* 2016; 21(1): 221-230.

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Ispitivanje mehanizma supresivnog dejstva magnezijuma na eksperimentalno izazvanu epileptiformnu aktivnost Recijusovih neurona pijavice**” dr Marije Stanojević predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizama supresivnog delovanja magnezijuma na epileptičku aktivnost. Ispitivanje mehanizma supresivnog delovanja magnezijuma na indukovanu epileptiformnu aktivnost na ovom eksperimentalnom animalnom modelu nesinaptičke epileptogeneze može doprineti boljem razumevanju etiopatogeneze epileptičkih napada i sagledavanju značaja koji homeostaza magnezijuma ima za normalnu električnu aktivnost nervnih ćelija. Rezultati ove studije takođe bi mogli da pomognu u razumevanju uloge magnezijuma u ćelijskim mehanizmima epileptogeneze, te rasvetljavanju mehanizama antiepileptičkog dejstva magnezijuma, ali i poboljšanju terapije bar nekih tipova epileptičkih napada kod ljudi.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

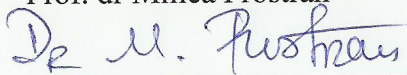
Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, Komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Marije Stanojević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 13.05.2016.

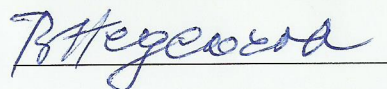
Članovi Komisije:

Mentor:

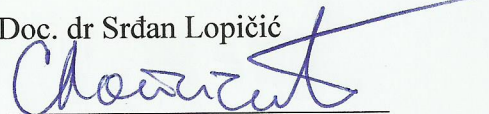
Prof. dr Milica Prostran



Prof. dr Vladimir Nedeljkov



Doc. dr Srđan Lopičić



Prof. dr Zorica Jovanović

