

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici **Nastavno-naučnog veća** Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 30.06.2023. godine, 14/XV-3/3-AO, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„ POVEZANOST NIVOVA JONIZOVANOG MAGNEZIJUMA,  
POKAZATELJA OKSIDATIVNOG STRESA I SPECIFIČNIH MEDIJATORA  
ZAPALJENJA KOD PACIJENATA SA ANKSIOZNIH I DEPRESIVNIH  
POREMEĆAJIMA “**

kandidata dr Ane Opanković, zaposlene u Klinici za psihijatriju UKCS u Beogradu.

Mentori su Prof. dr Srđan Milovanović i Prof. dr Katarina Savić Vujović

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Doc. dr Čedo Miljević, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Branislava Medić, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Dušan Đurić, vanredni profesor Univerziteta u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Integrisane akademske studije farmacije

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

**IZVEŠTAJ**

**A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije**

Doktorska disertacija dr Ane Opanković napisana je na ukupno 118 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, ispitanici i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 12 tabela, 5 grafikona i 6 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na Srpskom i Engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji, spisak objavljenih radova koji su proizašli iz disertacije i zahvalnicu.

U **uvodu** su definisani anksiozni poremećaji i depresija, sa osvrtom na epidemiološke podatke, kliničku sliku i etiopatogenetske mehanizme nastanka poremećaja. Posebno poglavlje uvoda

opisuje značaj i ulogu magnezijuma u organizmu kao i aktuelno dostupne metode određivanja koncentracije magnezijuma. Opisani su i tipični simptomi hipomagnezijemije kao i uticaj nedostatka magnezijuma na nastanak bolesti. U uvodu su definisani još i oksidativni stres i inflamacija, sa posebnim osvrtom na dosadašnja znanja o parametrima koji ukazuju na oksidativni stres i inflamaciju kao i njihovu ulogu u nastanku i ispoljavanju bolesti CNS-a.

**Ciljevi rada** su precizno definisani. Sastoje se od utvrđivanja i merenja ukupnog i jonizovanog magnezijuma kod obolelih od anksioznih i depresivnog poremećaja kako bi se ispitala povezanost ispoljavanja ispitivanih poremećaja sa koncentracijom ovog jona i ukazalo na značaj određivanja jonizovanog magnezijuma, nasuprot dosadašnjim merenjima ukupnog serumskog magnezijuma. Drugi važni ciljevi odnose se na određivanje koncentracije pokazatelja oksidativnog stresa kao i faktora inflamacije u serumu ispitanika kako bi se utvrdila potencijalna povezanost ovih parametara sa koncentracijom jonizovanog magnezijuma i utvrdio mogući posredni mehanizam od značaja za nastanak anksioznih poremećaja i depresije.

U poglavlju **ispitanici i metode** je navedeno da se radi o neintervencijskoj studiji preseka koja je sprovedena u Klinici za Psihijatriju UKCS. Detaljno su opisani kriterijumi za uključenje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje iz studije, kako za pacijente tako i za zdrave kontrole. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Pre uključivanja u studiju svim ispitanicima su detaljno objašnjeni ciljevi i metode istraživanja. Svi ispitanici su potpisali pristanak za dobrovoljno učešće u studiji. Svim pacijentima su urađene uobičajene dijagnostičke procedure, prikupljanje anamnestičkih podataka neophodnih za dijagnostikovanje psihijatrijskog poremećaja, a klinička dijagnoza je postavljena na osnovu kriterijuma Međunarodne klasifikacije bolesti (MKB 10). Ispitanici su nakon završenog pregleda popunili upitnik za samoocenjivanje stresa, anksioznosti i depresije (Depression, Anxiety and Stress Scale - DASS 21) i Bekovu skalu depresivnosti (Beck's Depression Inventory - BDI). Nakon pregleda pacijentima je istog dana ili prvog narednog jutra izvađena krv. Krv je uzeta za standardne laboratorijske analize kompletna krvna slika (KKS) i biohemijske analize krvi, kao i krv za analizu parametara oksidativnog stresa, medijatora zapaljenja i jonizovanog magnezijuma. Uzorak krvi uzet je pre početka uzimanja preporučene terapije koja se uobičajeno propisuje za odgovarajuće poremećaje. Za obradu i analizu podataka korišćen je program IBM SPSS Statistics 22

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 380 referenci.

## **B) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Povezanost nivoa jonizovanog magnezijuma, pokazatelja oksidativnog stresa i specifičnih medijatora zapaljenja kod pacijenata sa anksioznim i depresivnim poremećajima", autora dr Ane Opanković, utvrđeno podudaranje teksta iznosi 10 %. Ovaj stepen podudarnosti posledica je opštih mesta i podataka, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

## **C) Kratak opis postignutih rezultata**

Studija je obuhvatila 93 ispitanika: 75 bolesnih i 18 zdravih dobrovoljaca. Svi ispitanici su podeljeni u tri grupe. Prvu grupu činilo je 36 pacijeneta sa dijagnozom anksioznog poremećaja. U drugoj grupi bilo je 39 osoba obolelih od depresije. Treću grupu činilo je 18 zdravih osoba. Grupe su bile konzistentne u pogledu odnosa polova, sa većim udelom žena nego muškaraca. Depresivni pacijenti su bili veće prosečne starosti, dok su po ostalim demografskim obeležjima grupe bile konzistentne. Mereno skalama samoprocene DASS 21 i BDI upitnikom, težina poremećaja je kvalifikovana kao umereno teška za anksioznost i umereno teška depresivnost u najvećem procentu ispitanika obolelih od pomenutih poremećaja. Kod sve tri ispitivane grupe se beleži blag stres prema instrumentima samoprocene. Grupe su bile konzistentne i po standardnim biohemijskim parametrima kao što su glukoza, lipidni status. Sistemski parametri upale kao što su trombociti/limfociti (PLR), neutrofili/limfociti (NLR), monociti/limfociti (MLR), neutrofili/WBC – limfociti (DNLR), širina distribucije crvenih krvnih zrnaca (RDW) i odnos trombocita (RPR), indeks sistemske inflamacije (SII), PLT/albumin (PAR), nisu se značajno razlikovali među ispitivanim grupama. Protein akutne faze - C reaktivni protein (CRP)

je imao vrednosti ispod granice koja ukazuje na zapaljenje ( $\leq 5$  mg/L), bez razlike među ispitivanim grupama. Proinflamatorni citokini: interleukin 6 (IL-6) i faktor nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) nisu se značajno statistički razlikovali među grupama anksioznih, depresivnih i grupe zdravih kontrola. Proinflamatorni citokini nisu bili u korelaciji sa jonizovanim magnezijumom.

Pokazatelji oksidativnog stresa SOD1 i MDA nisu se statistički značajno razlikovali među ispitivanim grupama. GPX se statistički značajno razlikovao kod pacijenata sa dijagnozama ispitivanih psihijatrijskih poremećaja u odnosu na zdrave kontrole. Nije bilo statističke značajnosti u vrednostima GPX između anksioznih i depresivnih.

U ispitivanom uzorku vrednosti jonizovanog magnezijuma su se kretale u rasponu od 0.44 do 0.75 mmol/L. Vrednosti jonizovanog magnezijuma pokazale statistički značajnu razliku među grupama ispitanika. Jonizovani magnezijum se razlikovao u grupi anksioznih naspram zdravih kontrola i u grupi depresivnih naspram zdravih kontrola. Grupe anksioznih i depresivnih se nisu međusobno razlikovale po vrednostima koncentracije jonizovanog magnezijuma. Ukupni magnezijum u serumu se nije razlikovao između kontrolne i grupa anksioznih/ depresivnih.

Korelacijom koncentracije jonizovanog magnezijuma i skorova na upitnicima za samoprocenu BDI/DASS, u grupi anksioznih otkrivena je statistički značajna negativna osrednja povezanost između koncentracije jonizovanog Mg i DASS-A skora. Niže vrednosti jonizovanog magnezijuma su u korelaciji sa višim vrednostima anksioznosti. Utvrđena je i statistički značajna slaba negativna povezanost jonizovanog magnezijuma i depresivnosti merene DASS-D subskalom. Niže vrednosti jonizovanog magnezijuma povezane su sa višim vrednostima depresivnosti.

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

Anksiozni i depresivni poremećaji su najrasprostranjeniji psihijatrijski poremećaji u populaciji. Prema podacima World Health Organization (WHO) 970 miliona ljudi u svetu je tokom 2019. godine živelo sa nekim mentalnim poremećajem. Prve procene nakon pandemije pokazuju da je za skoro trećinu porastao broj obolelih od anksioznih i depresivnih poremećaja (Daly i Robinson, 2022). Anksiozni i depresivni poremećaji su često komorbidna stanja, za dosta zajedničkih kliničkih karakteristika, ali i zajedničkim etiopatogenetskim mehanizmima (Arzoz-Fabregas i sar., 2013). Do skoro je najčešće korišćeni i najlakše primenljiv metod merenja magnezijuma bio metod određivanja koncentracije serumskog magnezijuma.

Rezultati dosadašnjih istraživanja su pokazali da serumski magnezijum može imati vrednosti

u normalnom-referentnom opsegu, a da ispitanici manifestuju simptome koji ukazuju na njegov nedostatak (Elin, 2010). S obzirom da je mali broj raspoloživih radova o uticaju koncentracije jonizovanog magnezijuma, merenog direktno iz pune krvi, na psihičke bolesti, rezultati koji ukazuju na povezanost koncentracije jonizovanog magnezijuma sa anksioznim i depresivnim poremećajima predstavlja veliki naučni doprinos. Po prvi put je, ovim istraživanjem, ispitivana korelacija vrednosti jonizovanog magnezijuma, dobijenog direktnim merenjem, sa vrednostima ukupnog serumskog magnezijuma. Do sada nisu zabeležena ni ispitivanja povezanosti koncentracije jonizovanog magnezijuma između anksioznih i depresivnih poremećaja međusobno. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da su vrednosti koncentracije jonizovanog magnezijuma kod obolelih bile statistički značajno niže u odnosu na zdrave kontrole. Vrednosti jonizovanog magnezijuma nisu se razlikovale u odnosu na tip poremećaja. Veći skorovi na skalama depresivnosti kod depresivnih i skalom anksioznosti kod anksioznih, bili su u korelaciji sa nižim vrednostima izmerene koncentracije jonizovanog magnezijuma. Podaci dosadašnjih studija o uticaju magnezijuma na ispoljavanje psihičkih bolesti ukazuju na njegov značaj u održavanju ispravnog funkcionisanja centralnog nervnog sistema, ali precizna uloga magnezijuma u prevenciji i lečenju psihičkih poremećaja još uvek nije utvrđena, usled nedoslednosti u metodološkim pristupima određivanja koncentracije magnezijuma i nemogućnosti preciznog određivanja njegove bioraspoložive forme. Dostupna literatura ukazuje da usled nedostatka magnezijuma dolazi do disregulacije funkcija glutamata i porasta anksioznosti (Derom i sar., 2012). Direktnim dejstvom jona magnezijuma na inhibiciju N-metil-D-aspartatnih receptora (NMDA) i aktivaciju  $\gamma$ -aminobuterne kiseline receptora A (GABA<sub>A</sub>), magnezijum ostvaruje anksiolitički efekat (Poleszak et al., 2008, Zhu et al, 2001; Schvartz et al., 1994).

Na tragu dosadašnjih saznanja o uticaju oksidativnog stresa i inflamacije na nastanak psihičkih bolesti, jedan od ključnih ciljeva ovog istraživanja bazirao se na analizi pokazatelja oksidativnog stresa i faktora zapaljenja i njihovoj povezanosti sa koncentracijama jonizovanog magnezijuma u ispoljavanju anksioznih i depresivnih tegoba. Iz dosadašnjih istraživanja znamo da se oksidativni stres zajedno sa inflamacijom sa kojom je u bliskoj kauzalnoj povezanosti se smatra jednim od najznačajnijih etioloških faktora nastanka poremećaja raspoloženja (van Horssen i sar., 2019) Biomarkeri oksidativnog stresa u perifernoj cirkulaciji pokazuju izmene i kod depresivnih i kod anksioznih poremećaja. Smanjenje antioksidativnih vitamina A, C i E uz povećanje parametara oksidativnog stresa i inflamacije nađeno je kod poremećaja generalizovane anksioznosti (Islam i sar., 2014;

Michopoulos i sar., 2017). Suplementacija vitaminom C kod miševa smanjuje anksioznost (Koizumi i sar. 2016). Povećani nivoi antioksidativnih enzima i MDA nađeni su kod obolelih od opsesivno kompulzivnog poremećaja i paničnog poremećaja (Kuloglu i sar., 2002). Omega tri masne kiseline smanjuju efekte oksidativnog stresa i utiču na prevenciju bolesti (Martins i sar., 2012).

Dosadašnje studije su ukazivale na vezu između nivoa Mg i pokazatelja oksidativnog stresa kod osoba izloženih hroničnom emocionalnom stresu, anksioznih i depresivnih. Kod depresivnih pacijenata se beleže povišene vrednosti MDA i niže vrednosti antioksidativnih enzima GPX (Sarandol i sar., 2007; Ozcan i sar., 2004). Nedostatak magnezijuma prati dvostruko smanjenje redukovano glutaciona u eritrocitima kao posledica povećane aktivnosti glutation transferaze (Zheltova i sar., 2016). Studije na životinjama su pokazale vezu između smanjenja Mg, povećanja MDA i smanjenja antioksidativnih markera (Hans i sar., 2002). Magnezijum učestvuje u smanjenju oksidativnog stresa i prevenciji posledica. Jedan od pretpostavljenih mehanizama kojim hipomagnezijemija utiče na razvoj oksidativnog stresa, je posredstvom uticaja na homeostazu intracelularnog kalcijuma, koja dalje utiče na HPA i RAAS endokrine osovine, posredstvom inflamacije i direktnim dejstvom na mitohondrije (Rayssiguier i sar., 2010; Song i sar., 2007; Zheltova 2016). Između ostalog magnezijum je odgovoran je sa sintezu glutaciona posredstvom ATP-a, a glutation je jedan od značajnijih antioksidanasa.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju izvesna odstupanja od očekivanih nalaza iz dosadašnje literature. Analizom antioksidativnih enzima SOD1, GPX i pokazatelja lipidne peroksidacije MDA, utvrđeno je da se vrednosti SOD1 i MDA nisu statistički značajno razlikovale među ispitivanim grupama. U obe grupe ispitanika (anksiozni i depresivni) vrednosti GPX1 su bile statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti ovog antioksidativnog enzima se nisu razlikove između anksioznih i depresivnih pacijenata što ukazuje da je patogenetski mehanizam, nastanka oba ispitivana poremećaja, bio isti. Koncentracije jonizovanog magnezijuma su bile u obrnutoj korelaciji sa GPX kod depresivnih pacijenata što se može objasniti efektima vitaminske suplementacije korišćene tokom perioda pandemije ili inicijalnim kompenzatornim povećanjem antioksidativnih enzima. Postojanje korelacije koncentracije jonizovanog magnezijuma sa pokazateljima oksidativnog stresa ukazuje na potencijalni zajednički mehanizam nastanka poremećaja.

Od početka istraživanja inflamacije kao uzročnika nastanka psihičkih poremećaja postoje oprečna stanovišta po pitanju njene uloge u nastanku poremećaja. Sa jedne strane istraživanja

ukazuju na imunosupresiju praćenu sniženjem odbrambenih snaga (Schleifer i sar., 1984; Irwin i Gillin, 1987), dok sa druge strane noviji nalazi govore o pojačanoj aktivnosti imunog sistema u brojnim psihijatrijskim oboljenjima, od shizofrenije, preko neurotskih poremećaja, do poremećaja ličnosti (Nobis i sar., 2020; Osimo i sar., 2018; Najjar i sar., 2013). Koji je to stepen upale i koliko dugo ona treba da traje da bi izazvala psihičke izmene do danas nije poznato. Kroz jedan broj istraživanja potvrđena je povezanost povišenih interleukina i oboljevanja od depresije (Zhang i sar., 2018; Dowlati i sar., 2010). Nasuprot nalazima pozitivne korelacije zapaljenskih markera kod poremećaja raspoloženja, postoje i istraživanja u kojima nije nađena povezanost, što ukazuje da medijatori zapaljenja nisu pouzdani dijagnostički markeri i da zapljenski mahanizam nije jedini sigurni mehanizam nastanka depresije i anksioznosti (Haapakoski i sar., 2015). Kod ispitanika u okviru ovog istraživanja vrednosti proinflamatornih citokina dobijene analizom uzoraka periferne krvi za najveći broj učesnika istraživanja su bile ispod apsolutnog nultog standarda.

Sve veći broj novijih istraživanja ukazuje na značaj određivanja zapaljenskih markera periferne krvi dobijenih analizom broja krvnih ćelija (leukocitarnih, trombocitnih i eritrocitnih parametara). Određivanje ovih markera iz krvi je jednostavan brz, neinvazivan, jeftin metod koji može biti dobar pokazatelj predviđanja rizika od razvoja sistemskih i psihičkih bolesti. Prethodne studije pokazale su veće vrednosti neutrofila kod maničnih pacijenata u odnosu na depresivne, bez razlike u broju limfocita (Fusar-poli i sar. 2021). Povišene vrednosti NLR su zabeležene kod depresivnih pacijenata (Demircan i sar., 2016). GLR (Granulocitno limfocitni količnik) je prema nalazima dosadašnjih istraživanja, pokazao bolju prediktivnu specifičnost u odnosu na NLR (Gialluisi i sar., 2020b). Trombociti se smatraju sponom između inflamatornog odgovora organizma i psihičkih bolesti (Izzi i sar., 2020). Zapaljenski markeri iz periferne krvi povezani sa trombocitima uključuju: MPV, PDW, PCT, SII, PLR, PAR, RPR, i RDW. Nedavno je PLR predložen i kao marker suicida (Aguglia i sar., 2021).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da kod ispitanika koji činili uzorak ispitivanja nije bilo inflamacije. Srednje vrednosti markera zapaljenja, za koje je definisan referentni opseg ili određena gornja granica, nisu bile povišene. Analizom svih raspoloživih pokazatelja zapaljenja utvrđeno je da zapaljenski mehanizam nije imao značajnu ulogu u nastanku i ispoljavanju ispitivanih poremećaja, depresije i anksioznosti. Koncentracija jonizovanog magnezijuma nije bila u korelaciji sa medijatorima zapaljenja, pa je zaključak da povezanost hipomagnezijemije i ispitivanih psihičkih poremećaja nije ostvaren posredstvom zapaljenskog mehanizma.

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

1. **Opanković A**, Milovanović S, Radosavljević B, Čavić M, Besu Žižak I, Bukumirić Z, Latas M, Medić B, Vučković S, Srebro D, Savić Vujović K. Correlation of Ionized Magnesium with the Parameters of Oxidative Stress as Potential Biomarkers in Patients with Anxiety and Depression: A Pilot Study. Dose Response. 2022; 20 (3): 15593258221116741
2. **Opanković A**, Milovanović S, Savić Vujović K. Uloga magnezijuma i značaj hipomagnezijemije u ljudskom organizmu. Medicinski podmladak, 2023; 74 (3) DOI 10.5937/mp74-43278



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

Doktorska disertacija „ **POVEZANOST NIVOVA JONIZOVANOG MAGNEZIJUMA, POKAZATELJA OKSIDATIVNOG STRESA I SPECIFIČNIH MEDIJATORA ZAPALJENJA KOD PACIJENATA SA ANKSIOZNI I DEPRESIVNI POREMEĆAJIMA** “dr Ane Opanković, je istraživanje koje je po prvi put koristilo određivanje koncentracije jonizovanog magnezijuma direktnim merenjem, na populaciji bolesnih od poremećaja anksioznosti i depresije. Predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju značaja magnezijuma u održavanju homeostaze CNS -a i vezi između nedostatka magnezijuma u organizmu i psihijatrijskih oboljenja. Takođe ukazuje i na značaj određivanja jonizovanog magnezijuma kao potencijalnog biomarkera nepsihotičnih psihijatrijskih poremećaja.

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

U Beogradu, 04.07.2023.

Mentori:

Prof. dr Srđan Milovanović

Prof. dr Katarina Savić Vujović

Članovi Komisije:

Doc. dr Čedo Miljević

Doc. dr Branislava Medić

Prof. dr Dušan Đurić

