

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU**  
**UNIVERZITETA U BEOGRADU- FARMACEUTSKOG FAKULTETA**  
**KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE**

**Predmet:** Izveštaj Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata Vedrane Đurić

Nastavno-naučno Veće Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na sednici održanoj 13.04.2023. godine imenovalo je Komisiju za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata magistra farmacije Vedrane Đurić, pod naslovom:

**„Uticaj hiperaktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda i oksidativnog stresa na učenje i pamćenje: modulatorna uloga suplementacije magnezijumom“**

Komisija u sastavu:

1. Dr Dušanka Stanić, docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet – predsednik Komisije
2. Dr Jelena Petrović, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr Ana Starčević, docent, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet
4. Dr Bojana Pejušković, docent, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta, univerziteta u Beogradu sledeći

**IZVEŠTAJ**

**A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE**

Doktorska disertacija kandidata Vedrane Đurić pod naslovom „**Uticaj hiperaktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda i oksidativnog stresa na učenje i pamćenje: modulatorna uloga suplementacije magnezijumom**“ napisana je na 123 strana teksta, formata A4, fontom *Cambria*, veličine slova 12 i jednostrukim proredom. Disertacija je napisana jasnim i preglednim stilom i sadrži 15 tabela, 40 slika i 329 literaturnih navoda.

Disertacija je organizovana u sedam poglavlja: Uvod (26 strana), Ciljevi rada (2 strane), Materijal i metode (25 strana), Rezultati (26 strana), Diskusija (19 strana), Zaključak (2 strane) i Literatura (23 strane). Na početku disertacije predstavljen je Sažetak rada na srpskom i engleskom jeziku i sadržaj poglavlja/potpoglavlja, dok se na kraju nalazi prilog (Lista skraćena), kratka biografija kandidata, i potpisane izjave kandidata o autorstvu, istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i korišćenju doktorske disertacije.

U **uvodnom poglavlju** predstavljena su dosadašnja naučna saznanja vezana za istraživanja koja su sprovedena u okviru ove doktorske disertacije. U prvom delu uvoda predstavljena su trenutna saznanja o učenju i pamćenju, uz osvrt na hipotezu sinaptičke plastičnosti i memorije, ulogu medijalno temporalnog režnja i hipokampusa u procesima učenja i pamćenja, kao i na poremećaje učenja i pamćenja. U okviru uvodnog dela objašnjena je uloga proteina povezanih sa procesima neurogeneze i sinaptogeneze, a čija je ekspresija praćena u okviru istraživanja ove doktorske disertacije: neurotrofični faktor poreklom iz mozga (eng. *brain-derived neurotrophic factor* – BDNF), protein povezan sa rastom 43 (eng. *Growth-Associated Protein 43*, GAP43) i *Doublecortin* (DCX). Nakon toga su predstavljeni animalni modeli učenja i pamćenja uz detaljno objašnjenje prednosti testa prepoznavanja novog objekta (eng. *Novel object recognition test*, NORT) koji je korišćen u istraživanju koje je sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije. U drugom delu uvodnog poglavlja, objašnjen je oksidativni stres, gde su detaljno prikazani procesi nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i mehanizmi antioksidativne zaštite, uz pregled faktora koji su povezani sa povećanjem nivoa oksidativnog stresa. U trećem delu uvoda, detaljno su predstavljena trenutna saznanja o aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (eng. *hypothalamus-pituitary adrenal axis*, HPA) kao primarnog fiziološkog odgovora na fizički ili emocionalni stres. Potom je objašnjena uloga hormona kortikotropina, adrenokortikotropnog hormona i glukokortikoida u aktivnosti HPA osovine, uz pregled trenutnih saznanja o mehanizmima dejstva ovih hormona, tipovima receptora preko kojih ostvaruju svoje efekte i distribuciji njihovih receptora. Takođe, objašnjena je regulacija aktivnosti HPA osovine putem nervnog i endokrinog sistema. Povezanost aktivnosti HPA osovine i učenja i pamćenja predstavljena je kroz niz literaturnih podataka uključujući prikaz efekata glukokortikoida na nivou hipokampusa, efekata glukokortikoida na dugoročnu potencijaciju i dugoročnu depresiju, efekta stresa na ekspresiju BDNF proteina i efekte aktivnosti HPA osovine na bihevioralne testove kod životinja. Zatim je u ovom delu uvodnog poglavlja predstavljena

povezanost hiperaktivnosti HPA osovine i oksidativnih oštećenja biomolekula. Na kraju ovog dela uvoda predstavljeni su eksperimentalni modeli zasnovani na primeni ACTH hormona, kao i model koji je korišćen u okviru ove doktorske disertacije. U četvrtom delu uvodnog poglavlja, predstavljen je fiziološki značaj magnezijuma, praćen pregledom referentnih vrednosti za preporučeni dnevni unos magnezijuma. Nakon toga predstavljeni su literaturni podaci koji ukazuju na pozitivne efekte magnezijuma, uključujući i istraživanja koja ukazuju na modulatorni efekat magnezijuma na aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda. Potom je napravljen osvrt na ulogu magnezijuma kao alosternog modulatora NMDA receptora, odnosno značaj uloge magnezijum jona u modulaciji neuralne aktivnosti. Zatim je napravljen pregled literaturnih podataka o potencijalno prokognitivnoj ulozi magnezijum jona, uz dostupnost literature koja ukazuje na potencijalno terapijski efekat magnezijuma na smanjenje deficita memorije koje je povezano sa starenjem i povredama mozga. Na kraju uvodnog dela predstavljeni su dostupni podaci o potencijalno antioksidativnom efektu magnezijuma, potencijalu magnezijuma da redukuje oksidativna oštećenja i da poveća aktivnost antioksidativnih enzima.

**Ciljevi istraživanja** ove doktorske disertacije su jasno definisani - ispitivanje efekta farmakološki izazvanog stresa, indukovanjem hiperaktivnosti stres osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda, na učenje i pamćenje, kao i na molekularne promene u hipokampusu i *locus ceruleus*-u, uz praćenje parametara oksidativnog stresa i oksidativnih oštećenja DNK molekula kod eksperimentalnih životinja pacova Wistar soja. Dodatno, cilj predložene disertacije bio je da se ispita efekat akutne i dugoročne suplementacije magnezijumom na učenje i pamćenje u fiziološkim i uslovima hiperaktivnosti HPA osovine. U navedenim animalnim modelima bio je cilj i ispitivanje povezanosti promena parametara memorije sa nivoom oksidativnog stresa i promenama u strukturi hipokampusu, regiona mozga u najvećoj meri odgovornog za formiranje memorije. Ciljevi istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su realizovani kroz dve eksperimentalne faze.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno je opisan dizajn istraživanja i metodologija primenjena u istraživanju. Tokom istraživanja upotrebljeno je 128 eksperimentalnih životinja pacova Wistar soja, 80 eksperimentalnih životinja uključeno je u prvu fazu istraživanja, dok je 48 eksperimentalnih životinja uključeno u drugu fazu istraživanja. Prilikom rada sa

eksperimentalnim životinjama poštovani su propisi Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

U prvoj fazi istraživanja sprovedena su tri eksperimenta kako bi se ispitalo da li akutni i dugoročni tretmani utiču na učenje i pamćenje Wistar pacova. U prvom eksperimentu životinje su podeljene u dve grupe, životinje koje su akutno primale Mg i kontrolnu grupu životinja. U drugom eksperimentu životinje su podeljene u četiri grupe: akutno Mg tretiranu grupu životinja (30 mg/kg, per os), akutno ACTH tretiranu grupu životinja (10 µg u 400 µL fiziološkog rastvora), akutno ACTH/Mg tretiranu grupu životinja i kontrolnu grupu životinja. U prvom i drugom eksperimentu kako bi se ispitao efekat akutnih tretmana na memoriju životinja korišćen je NORT test, gde su tretmani primenjeni 30 minuta pre test faze NORT testa. U trećem eksperimentu životinje su podeljene u 4 grupe: Mg rastvoren u vodi za piće (300 mg/L, 28 dana, per os), ACTH (10 µg/dan, 21 dan, s.c.), ACTH/Mg kombinovani tretman (primena ACTH tokom poslednje tri nedelje Mg tretmana) i kontrolna grupa - fiziološki rastvor (400 µL/dan, 21 dan, s.c.). Kao i u prva dva eksperimenta i u trećem eksperimentu korišćen je NORT test kako bi se ispitao efekat tretmana na memoriju životinja. Pored toga, u ovom eksperimentu je praćen i efekat tretmana na koncentracije magnezijuma u mozgu i kortikosterona u plazmi.

U drugoj fazi istraživanja ispitivan je efekat dugoročnih tretmana na molekularne promene u hipokampusu pacova i na oksidativni statusu. Životinje su nasumično podeljene u četiri eksperimentalne grupe (N=12, po eksperimentalnoj grupi): Mg rastvoren u vodi za piće (300 mg/L, 28 dana, per os), ACTH (10 µg/dan, 21 dan, s.c.), ACTH/Mg kombinovani tretman (primena ACTH tokom poslednje tri nedelje Mg tretmana) i kontrolna grupa - fiziološki rastvor (400 µL/dan, 21 dan, s.c.). U ovoj fazi istraživanja ispitivani su efekti dugoročnih tretmana na parametre hipokampalne neurogeneze (BDNF, GAP-43 i DCX), ekspresiju alpha-2A adrenergičkih receptora u *locus ceruleus*-u, markere oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, i stepen oksidativnog oštećenja DNK molekula u perifernim limfocitima.

Prilikom ispitivanja promena u dugotrajnoj memoriji eksperimentalnih životinja korišćen je test prepoznavanja novog objekta (eng. *Novel object recognition test* – NORT). U ovom poglavlju doktorske disertacije detaljno je objašnjen protokol izvođenja ovog testa, uključujući habituaciju, trening fazu i test fazu, kao i vremena koja su merena i parametri koji

su određivani. Koncentracija magnezijuma u prefrontalnom korteksu mozga eksperimentalnih životinja određivana je plamenom atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom (eng. *flame atomic absorption spectrophotometry*, FAAS), dok je nivo kortikosterona u plazmi Wistar pacova određivan korišćenjem sistema tečna hromatografija – elektrosprej jonizacija – tandem masena spektrometrija (eng. *Liquid chromatography – Electrospray Ionisation – Tandem mass spectrometry*, LC-ESI-MS/MS). U okviru ovog poglavlja detaljno je opisan princip, kao i uslovi izvođenja navedenih metoda. Praćenje efekata tretmana na parametre neurogeneze i sinaptogeneze u hipokampusu, proteina BDNF i GAP-43, ispitivano je Western blot metodom. U okviru ovog poglavlja prisutan je detaljan prikaz postupak pripreme tkiva hipokampusu za Western blot analizu, natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza, transfer proteina sa gela na membranu, blokiranje membrane, inkubacija sa primarnim i sekundarnim antitelom (uključujući razblaženja antitela) i detekcija proteina. Imunohistohemijska metoda je korišćena za analizu ekspresije DCX proteina u hipokampusu i  $\alpha 2A$ -adrenergičkih receptora u *locus ceruleus*-u. Postupak pripreme moždanog tkiva uključujući izolaciju moždanog tkiva, fiksaciju, dehidrataciju, kalupljenje u parafin, rehidrataciju, kao i postupak bojenja i kvantifikacije detaljno su prikazani u ovom delu rada. Za određivanje stepena oštećenja DNK molekula perifernih limfocita nakon dugoročnih tretmana korišćen je alkalni *Comet test*, gde se oštećenje DNK određuje na osnovu kretanja oštećene DNK u električnom polju. U ovom delu dat je detaljan prikaz modifikovanog protokola po Singh-u i saradnicima koji je korišćen, kao i klasifikacije stepena oštećenja ćelija. Prilikom određivanja markera oksidativnog stresa (superoksid anjona -  $O_2^-$ , totalnog oksidativnog statusa – TOS i produkata oksidacije proteina – AOPP) i aktivnosti antioksidativne zaštite (superoksid dizmutaze - SOD i paraoksonaze 1 - PON1) u plazmi korišćene su odgovarajuće spektrofotometrijske analize, koje su detaljno prikazane. U delu Statistička analiza rezultata, navedene su sve statističke metode koje su bile korišćene: studentov t-test, t-test parova, jednofaktorska ANOVA, ponovljena ANOVA i dvofaktorska ANOVA, praćene odgovarajućom post-hoc analizom. Statistička analiza podataka je rađena pomoću programa GraphPad Prism Verzija 7 (San Dijego, SAD) i PASW Statistics verzija 18 (Čikago, SAD).

Primenjena metodologija je adekvatna za realizaciju postavljenih ciljeva.

**Rezultati** istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije su detaljno prikazani tekstualno, tablearno i grafički. Rezultati su prikazani kroz 17 slika i 9 tabela.

Poglavlje **Diskusija** sačinjava detaljna analiza dobijenih rezultata ovog istraživanja uz pregled i poređenje sa rezultatima koji su dostupni u literaturi.

Poglavlje **Zaključak** sadrži prikazane relevantne zaključke proistekle iz rezultata i analize rezultata ovog istraživanja.

U poglavlju **Literatura** navedene se reference, 329 literaturnih navoda, korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji.

## **B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA**

Rezultati istraživanja su prikazani u okviru šest celina, gde prve tri celine predstavljaju rezultate prve faze istraživanja a preostale tri celine predstavljaju rezultate druge faze istraživanja.

U okviru prve faze istraživanja, najpre je objašnjen uticaj tretmana ACTH, Mg i kombinacije ACTH i Mg tretmana na memoriju eksperimentalnih životinja. Rezultati bihevioralnog testiranja u okviru tri eksperimenta ukazuju na prokognitivni efekat tretmana Mg uz izostanak prokognitivnog efekta ACTH tretmana. U okviru rezultata bihevioralnog testiranja prvo su izračunati indeks diskriminacije i indeks prepoznavanja, na osnovu vremena provedenih u istraživanju novog i poznatog objekta u test fazi NORT testa, koji su zatim upoređivani sa kontrolnom grupom. Nakon toga je dopunjena statistička analiza rezultata tako što su poređena vremena istraživanja dobijena u test fazi kod svake životinje, kako bi se analiziralo da li životinje unutar grupe prave razliku između dva predmeta. Akutni tretman magnezijumom doveo je do porasta indeksa diskriminacije i indeksa prepoznavanja u drugom eksperimentu, dok je promenom pristupa analizi rezultata prokognitivni efekat akutnog tretmana magnezijumom bio pokazan i u prvom i u drugom eksperimentu. Pored toga, ovaj efekat akutnog tretmana magnezijumom je bio prisutan i kod životinja koje su akutno primale u kombinaciji i ACTH tretman. Životinje dugotrajno tretirane magnezijumom u vodi za piće,

u trećem eksperimentu su pokazale značajno veći indeks diskriminacije i indeks prepoznavanja u odnosu na kontrolnu grupu životinja, a pored toga su i statistički značajno više vremena provele istražujući novi objekat u poređenju sa poznatim objektom. Dodatno, efekat tretmana magnezijumom u trajanju od 28 dana bio je prisutan i u uslovima hiperaktivnosti HPA osovine primenom ACTH hormona. Suprotno, akutni tretman ACTH hormonom i tretman ACTH hormonom u trajanju od 21 dan nisu doveli do statistički značajnih promena u praćenim parametrima u testu prepoznavanja novog objekta, bez značajnih razlika u odnosu na kontrolnu grupu životinja, što ukazuje da ACTH tretman nije pokazao u ovoj dozi na memoriju prepoznavanja. U okviru ove faze istraživanja, praćen je nivo kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja nakon dugotrajnih tretmana. Primena ACTH hormona dovela je do značajnog porasta nivoa kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja, ukazujući na hiperaktivnost HPA osovine. Tretman Mg u ACTH/Mg grupi životinja, doveo je do smanjenja nivoa kortikosterona u plazmi životinja, bez razlike u odnosu na kontrolnu grupu životinja ukazujući na efekat magnezijuma koji dovodi do smanjenja hiperaktivnosti HPA osovine. Poslednji parametar praćen u okviru prve faze istraživanja, koncentracija Mg u prefrontalnom korteksu nije pokazala statističku razliku između grupa životinja.

U nastavku poglavlja Rezultati, predstavljeni su rezultati druge faze istraživanja. Dugotrajna suplementacija magnezijumom delovala je stimulatorno na procese adultne neurogeneze i sinaptogeneze kod zdravih i životinja izloženih stresu. Naime, suplementacija Mg dovela je do porasta količine BDNF proteina u hipokampusu zdravih životinja i životinja tretiranih ACTH hormonom u trajanju od 21 dan. Suprotno efektima suplementacije magnezijumom, ACTH tretman negativno je uticao na proces adultne neurogeneze tako što je doveo do smanjenja gustine ćelija koje ekspresiraju DCX, što ukazuje na smanjenje količine nezrelih neurona u hipokampusu eksperimentalnih životinja. Tretman magnezijumom, pozitivno je modulirao proces adultne neurogeneze kod životinja izloženih ACTH, anuliranjem efekta ACTH tretmana na ekspresiju DCX proteina u hipokampusu. Primena tretmana Mg u kombinaciji sa ACTH tretmanom dovela je i do pozitivnog efekta na količinu GAP43 proteina. U okviru ove faze istraživanja, pokazano je da ACTH i Mg tretmani modulišu aktivnosti *Locus ceruleus*-a povećanjem ekspresije autoinhibitornih alpha-2A adrenergičkih receptora u ovoj moždanoj strukturi. U poslednjem delu rezultata predstavljen je efekat tretmana na oksidativna oštećenja DNK molekula i na oksidativni status. *In vitro* izlaganje

oksidansu pokazalo je da ACTH tretman dovodi do povećanja osetljivosti DNK molekula na oksidanse, odnosno nakon izlaganja vodonik-peroksidu dolazi do povećanog *ex-vivo* oksidativnog oštećenja DNK molekula. Suprotno ACTH tretmanu, magnezijum pokazuje protektivni efekat kako kod zdravih tako i kod životinja izloženih ACTH tretmanu, odnosno tretman magnezijumom smanjuje broj ćelija sa oksidativnim DNK oštećenjem nakon *in vitro* izlaganja oksidansu. Dodatno, ACTH tretman je pokazao prooksidativni potencijal *in vivo*. Naime nakon dugotrajnog ACTH tretmana dolazi do povećanja stvaranja super-oksid anjona i smanjenja antioksidativne aktivnosti SOD enzima u plazmi eksperimentalnih životinja. Pozitivan efekat magnezijuma na oksidativni status izraženiji je u uslovima hiperaktivnosti HPA osovine, naime tretman magnezijumom smanjuje prekomerno stvaranje superoksid-anjona i povećava antioksidativnu aktivnost SOD enzima. Dodatno, dugotrajni tretman magnezijumom dovodi do smanjenja koncentracije produkata oksidacije proteina.

### **C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE**

Dobijeni rezultati istraživanja su detaljno analizirani u kontekstu dostupnih literaturnih podataka u okviru poglavlja Diskusija.

Značajna uloga magnezijum jona u regulaciji glutamatergičke neurotransmisije preko NMDA receptora, uzrok je velikog broja istraživanja potencijalne uloge magnezijuma u redukovanju simptoma migrene, depresije, hroničnog bola, anksioznosti, moždanog udara, Alzheimer-ove i Parkinsonove bolesti (Kirkland et al., 2018; Petrović et al., 2018; Singewald et al., 2004; Li et al., 2014). Dodatno, rezultati određenog broja istraživanja ukazuju na pozitivan efekat tretmana magnezijumom na smanjenje deficita kratkoročne i dugoročne memorije prepoznavanja ispitivano NORT testom (Slutsky et al., 2010; Wang et al., 2013; Li et al., 2014; Zhou et al., 2021). U studiji Slutskog i saradnika pokazano je da kod starih eksperimentalnih životinja dolazi do oštećenja memorije prepoznavanja, dok tretman magnezijumom u obliku Mg-L-treonata u trajanju od 30 dana dovodi do poboljšanja kratkoročne i dugoročne memorije prepoznavanja (Slutsky et al., 2010). Dodatno, Zhou i saradnici su pokazali da tretman magnezijumom u trajanju od 8 dana pokazuje pozitivan efekat na kratkoročnu memoriju prepoznavanja u modelu lekom izazvanog deficita memorije (Zhou et al., 2021), dok su slični efekti dobijeni i u modelima hroničnog neuropatskog bola i



Alzheimer-ove bolesti (Wang et al., 2013; Li et al., 2014). Rezultati dobijeni u okviru istraživanja ove doktorske disertacije koji ukazuju na prokognitivni efekat magnezijuma kod zdravih životinja, u skladu su sa navedenim istraživanjima efekata tretmana magnezijumom na deficit memorije. Pored toga, dostupni su i literaturni podaci o istraživanjima koja su ispitivala efekte tretmana magnezijumom na prostornu memoriju u različitim testovima. Naime, Slutski i saradnici su pokazali da tretman magnezijum-L-treonatom dovodi do poboljšanja prostorne memorije i kod mladih i kod starih životinja (Slutsky et al., 2010). Pored toga, pozitivan efekat tretmana magnezijumom na prostornu memoriju pokazan je i u modelima Alzheimer-ove bolesti, gde je tretman magnezijumom uspeo da smanji deficit memorije (Xu et al., 2014; Li et al., 2014; Xiong et al., 2022). Efekat akutnog Mg tretmana na memoriju eksperimentalnih životinja dobijen u prvom eksperimentu ovog istraživanja, reprodukovan je u drugom eksperimentu. Literaturni podaci o efektima akutnog tretmana magnezijumom na memoriju životinja su jako skromni, i iako ne ukazuju ni na poboljšanje memorije ni na redukciju memorijskog deficita, ukazuju na pozitivan efekat akutne primene magnezijuma na smanjenje progresivnog gubitka tkiva hipokampusa (Browne et al., 2004).

Model primene ACTH hormona validiran je u prekliničkim studijama kao model hroničnog stresa i depresije. Naime, iako se inicijalno model zasnivao na hroničnoj primeni visokih doza ACTH hormona pokazano je da i niže doze dovode do komparabilnih večernjih nivoa kortikosterona u plazmi životinja (Kitamura et al., 2002; Petrović et al., 2018; Walker et al., 2015; Siswanto et al., 2008). Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije, gde je pokazano da tronedeljni tretman ACTH hormonom u niskim dozama dovodi do povećanja nivoa kortikosterona, u skladu su sa ovim rezultatima. U bihevioralnom istraživanju, Okuda i saradnici su ispitivali efekat akutne primene kortikosterona na konsolidaciju memorije prepoznavanja životinja, gde su pokazali pozitivan efekat akutnog tretmana na memoriju prepoznavanja životinja (Okuda et al., 2004). Međutim ovaj efekat akutnog tretmana bio je prisutan samo u uslovima kada je test bio izvođen bez faze habituacije, odnosno kada je postojala komponenta novog okruženja. Kako je u protokolu istraživanja ove doktorske disertacije postojala faza habituacije, sam izostanak efekta akutnog tretmana na pozivanje memorije prepoznavanja nije u suprotnosti sa ovim istraživanjem. Dodatno, pozitivan efekat primene tretmana kortikosterona nakon trening faze na konsolidaciju memorije pokazan je i u drugim animalnim modelima uključujući ispitivanja prostorne memorije i memorije uslovljavanja strahom (Sandi et al., 1997; Hui et al., 2004). Interesantno je da su u

istraživanju deQuervain i saradnici pokazali da stres primenjen 30min pre retencionog testiranja utiče na pozivanje dugoročne prostorne memorije, dok su primenom različitih doza kortikosterona pokazali da primena kortikosterona pre retencionog testiranja pokazuje doznno zavisni negativni efekat na pozivanje prostorne memorije (deQuervain et al., 1998). Opisani rezultati u skladu su sa rezultatima istraživanja ove doktorske disertacije koji pokazuju da akutno primenjen ACTH hormon 30 minuta pre test faze nema prokognitivni efekat na pozivanje ne-prostorne memorije u testu prepoznavanja novog objekta. Dostupni podaci u literaturi pokazuju oprečne rezultate u slučaju ispitivanja efekata dugotrajnog stresa na memoriju eksperimentalnih životinja, ukazujući na kompleksnost efekata aktivacije HPA osovine na memoriju životinja. Rezultati dostupni u literaturi ukazuju da produžena primena stresa utiče negativno na dugoročnu memoriju prepoznavanja, odnosno dovodi do oštećenja memorije prepoznavanja eksperimentalnih životinja (Bowman et al., 2009; Gomez et al., 2013). Suprotno ovim istraživanjima, dugoročna primena stresa izlaganjem hladnoći u protokolu od pet dana, iako je dovela do povećanja nivoa kortikosterona kod pacova muškog pola, nije imala efekta na kratkoročnu memoriju prepoznavanja niti na prostornu memoriju (El Marzouki et al., 2021). Pored toga i stres izazvan bukom nije pokazao efekte na istraživanje objekata u dva protokola (Beck i Luine, 2002). Međutim u ovom istraživanju tretman ACTH hormonom iako je doveo do povećanja nivoa kortikosterona kod eksperimentalnih životinja nije doveo do pozitivnih efekata na memoriju životinja, dok se potencijalna oštećenja memorije ne mogu detektirati ovim protokolom.

U drugoj fazi istraživanja pokazano je da tretman magnezijumom dovodi do povećanja nivoa BDNF proteina kod zdravih životinja i životinja tretiranih ACTH hormonom, kod kojih dovodi i do povećanja broja nezrelih neurona, DCX+ neurona. Veliki broj studija ukazuje na ulogu neurogeneze i sinaptogeneze u procesima učenja i pamćenja, štaviše BDNF protein se smatra jednim od ključnih molekula u procesima sinaptičke plastičnosti i adultne neurogeneze (Lu et al., 2008; Meng et al., 2011; Bekinschtein et al., 2014; Korte et al., 1998; Cunha et al., 2010). Štaviše, pogoršanje memorije prepoznavanja i prostorne memorije bilo je prisutno kod eksperimentalnih životinja kod kojih je uklonjen BDNF gen u hipokampusu (Heldt et al., 2007). Dostupni literaturni podaci ukazuju na pozitivan efekat magnezijuma na količinu BDNF proteina, ali i na proliferaciju i diferencijaciju neuralne ćelijske linije. Istraživanja koja su se bavila efektom dugoročnog tretmana magnezijum-L-treonatom pokazala su da je tretman doveo do povećanja količine BDNF proteina u hipokampusu i

prefrontalnom korteksu (Slutsky et al., 2010; Abumaria et al., 2011). Pored toga u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive Petrović i saradnici su pokazali pozitivan efekat magnezijum tretmana u obliku magnezijum-sulfata na nivo BDNF proteina u hipokampusu pacova (Petrović et al., 2018). U skladu sa istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije jesu i *in vitro* rezultati koji ukazuju da diferencijacija neuralne ćelijske linije zavisi od ekstracelularnog nivoa magnezijuma, gde povećanje nivoa ekstracelularnog magnezijuma povećava diferencijaciju neuralne ćelijske linije (Jia, Mou et al., 2016; Liao et al., 2017). Takođe, *in vivo* istraživanje je pokazalo da dugotrajni tretman magnezijum-L-treonatom pozitivno deluje na proliferaciju i na diferencijaciju neurona u hipokampusu u mišijem modelu (Jia, Liu et al., 2016). Dodatno, Wu i saradnici su pokazali da transplatacija neuralnih stem ćelija tretiranih magnezijumom *in vitro* povećava neuralnu diferencijaciju *in vivo*, štaviše transplantacija magnezijumom tretiranih ćelija je povezana sa poboljšanjem prostorne memorije životinja (Wu et al., 2019).

Kako je hipokampus struktura u kojoj se proces neurogeneze odvija i u adultnom dobu, a uz činjenicu da sadrži veliki broj glukokortikoidnih i mineralokortikoidnih receptora, efekat aktivacije HPA osovine ispitivan je u svim fazama adultne neurogeneze. U prvim istraživanjima Gould i saradnici su pokazali da u uslovima bez glukokortikoida dolazi do povećanja proliferacija ćelija u *dentate gyrus* regionu odraslih životinja, dok primena kortikosterona prevenira ovaj efekat (Gould et al., 1992). Sličan efekat je dobijen izlaganjem životinja prirodnom stresoru, mirisu predatora (Tanapat et al., 2001). U daljim ispitivanjima praćen je efekat glukokortikoida na diferencijaciju progenitorskih ćelija, gde je pokazano da glukokortikoidi dovodi do smanjenja stvaranja novih neurona u adultnom hipokampusu dok u isto vreme povećavaju stvaranje oligodendrocita (Wong i Herbert, 2006; Chetty et al., 2014).

Dodatno, Workman i saradnici su pokazali da dugoročni tretman kortikosteronom dovodi do smanjenja broja nezrelih DCX + neurona (Workman et al., 2015). Gore navedena istraživanja u skladu su sa rezultatima ovog istraživanja u kome je pokazano da tronedeljni ACTH tretman dovodi do smanjenja DCX + neurona, ukazujući na smanjenju količinu nezrelih neurona u hipokampusu eksperimentalnih životinja. Pored toga rezultati ovog istraživanja koji ukazuju na izostanak efekta ACTH tretmana na količinu BDNF proteina u skladu su sa prethodno dobijenim rezultatima u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive (Petrović et al., 2018). Međutim, rezultati istraživanja u kojima je kao model aktivacije HPA osovine korišćen model stresa imobilizacijom ukazuju na kompleksniju prirodu ovog efekta, ukazujući

na potencijalnu ulogu i drugih moždanih struktura, i potencijalnu ulogu izbora samog protokola. Određeni broj istraživanja ukazuju da stres imobilizacijom dovodi do smanjenja nivoa iRNK za BDNF protein u hipokampusu i nivoa BDNF proteina u hipokampusu eksperimentalnih životinja (Smith et al., 1995; Xu et al., 2006; Radahmadi et al., 2015), dok su sa druge strane prisutni i rezultati koji ukazuju da stres imobilizacijom dovodi do inicijalno povećane ekspresije BDNF gena, dok sam produženi stres dovodi do normalizacije ekspresije BDNF gena (Nooshinfara et al., 2011). Sličan efekat dobijen je i u prekliničkoj studiji u kojoj stres imobilizacijom nije doveo do poboljšanja memorije prepoznavanja novog objekta, uz izostanak efekta na ekspresiju gena za BDNF protein u hipokampusu (Roustazade et al., 2022).

U velikom broju istraživanja sprovedenih *in vitro* i *in vivo* rezultati ukazuju da su hormoni stresa povezani sa povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (Iuchi et al., 2003; Flint et al., 2007; Zafir i Banu, 2009; Flaherty et al., 2017). Dodatno prekliničke studije ukazuju da izlaganje stresu u različitim animalnim modelima dovodi do redukcije aktivnosti antioksidativnih enzima, uključujući SOD, glutantion-S-transferazu, glutantion reduktazu i katalazu (Zafir i Banu, 2009; Patki et al., 2013; Stanić et al., 2016). Štaviše, Stanić i saradnici su pokazali da hronična primena kortikosterona dovodi do redukcije SOD aktivnosti u plazmi Wistar pacova (Stanić et al., 2016). Opisani rezultati su u skladu sa nalazima doktorske disertacije, koji ukazuju da dugotrajno izlaganje ACTH hormonu kod pacova dovodi do povećanja nivoa superoksid anjona i smanjenja antioksidativne aktivnosti SOD enzima u plazmi eksperimentalnih životinja. Dodatno u skladu sa ovim istraživanjem, Zhang i saradnici su pokazali da u ACTH modelu hipertenzije dolazi do povećanja lipidne peroksidacije u plazmi i povećanja aortne produkcije superoksid anjon (Zhang et al., 2005). U daljim istraživanjima pokazano je da stres dovodi do povećanja oksidativnih oštećenja proteina i povećanja lipidne peroksidacije (Liu et al., 1996; Zafir i Banu, 2009; de Munter et al., 2021). Možda najinteresantnije istraživanje su sproveli Sato i saradnici koji su pokazali da povećanje aktivnosti HPA osovine dovodi do oksidativnih oštećenja u hipokampusu što može da se poveže sa oštećenjem prostorne memorije (Sato et al., 2010). U ovom istraživanju tretman kortikosteronom u trajanju od dve nedelje doveo je do povećanja lipidne peroksidacije i oksidacije proteina, i smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, katalaze i glutantion peroksidaze, uz značajano pogoršanje prostorne memorije (Sato et al., 2010). Pored toga, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da povećan nivo glukokortikoida, aktivacijom

HPA osovine, utiče na oksidativna oštećenja DNK molekula, što je u skladu sa dostupnim rezultatima *in vitro* i *in vivo* studija (Flaherty et al., 2017; Liu et al., 1996; Consiglio et al., 2010; Aschbacher et al., 2013; Black et al., 2017; Joergensen et al., 2011). Štaviše u skladu sa rezultatima istraživanja ove doktorske disertacije, Stanić i saradnici su pokazali da produžena primena kortikosterona utiče na integritet DNK molekula. Pozitivan efekat magnezijuma na osetljivost DNK molekula na oksidativna oštećenja u uslovima hiperaktivnosti HPA osovine, u skladu je sa kliničkom studijom u kojoj je pokazan protektivni efekat magnezijuma na oksidativna DNK oštećenja (Petrović et al., 2016).

Kako je magnezijum jon uključen u skoro sve anaboličke i kataboličke reakcije, sproveden je veliki broj studija sa ciljem ispitivanja potencijala magnezijuma da redukuje oksidativna oštećenja i poveća aktivnost antioksidativnih enzima. U *in vitro* ispitivanju pokazan je efekat magnezijuma na redukciju UV zračenjem nastalih oksidativnih oštećenja, povećanjem antioksidativne aktivnosti enzima SOD i katalaze (Chen et al., 2019). Protektivan efekat magnezijuma pokazan je i u studijama koje su ispitivale efekte deficita magnezijuma u ishrani životinja, gde je deficit magnezijuma doveo do povećanja oksidativnog stresa (Chaudhary et al., 2007; Kuzniar et al., 2003). Pored toga u modelu dijabetesa suplementacija magnezijumom je pokazala povećanje aktivnosti SOD enzima i glutation-S-transferaze, povećava nivo vitamina C, uz smanjenje lipidne peroksidacije (Hans et al., 2003). Iako je u istraživanju ove doktorske disertacije izostao efekat magnezijuma kod zdravih životinja, trebalo bi napomenuti da je u pomenutim studijama ispitivan efekat magnezijuma u uslovima smanjenog nivoa magnezijuma. Takođe, u studiji sprovedenoj od strane Orhana i saradnika pokazano je da tretman magnezijumom smanjuju oksidativni stres, dok je efekat izraženiji kod životinja hranjenih visoko masnom ishranom, koja je pokazala negativan efekat na koncentraciju magnezijuma (Orhan et al., 2022). Rezultati ovog istraživanja, koji ukazuju da u uslovima hiperaktivnosti HPA osovine kada je pokazano da je aktivnost SOD enzima smanjena, tretman magnezijumom vratio je aktivnost SOD enzima na normalan nivo. Pored toga rezultati ovog istraživanja ukazuju da dugoročni tretman magnezijumom smanjuje osetljivost DNK perifernih limfocita na oksidativna oštećenja izazvana *in vitro* izlaganjem oksidansu. U skladu sa ovim rezultatima, u kliničkoj studiji Petrović i saradnici pokazali su da četvoronedeljna suplementacija magnezijumom pokazuje preventivni efekat na *ex-vivo* oksidativna DNK oštećenja perifernih limfocita (Petrović et al., 2016).

## Literatura:

- Abumaria, N., Yin, B., Zhang, L., Li, X.Y., Chen, T., Descalzi, G., Zhao, L., Ahn, M., Luo, L., Ran, C., Zhuo, M., Liu, G., 2011. Effects of elevation of brain magnesium on fear conditioning, fear extinction, and synaptic plasticity in the infralimbic prefrontal cortex and lateral amygdala. *J Neurosci* 31, 14871-14881.
- Aschbacher, K., O'Donovan, A., Wolkowitz, O.M., Dhabhar, F.S., Su, Y., Epel, E., 2013. Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1698-1708.
- Beck, K.D., Luine, V.N., 2002. Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: role of housing conditions. *Physiol Behav* 75, 661-673.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Medina, J.H., 2014. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76 Pt C, 677-683.
- Black, C.N., Bot, M., Révész, D., Scheffer, P.G., Penninx, B., 2017. The association between three major physiological stress systems and oxidative DNA and lipid damage. *Psychoneuroendocrinology* 80, 56-66.
- Bowman, R.E., Micik, R., Gautreaux, C., Fernandez, L., Luine, V.N., 2009. Sex-dependent changes in anxiety, memory, and monoamines following one week of stress. *Physiol Behav* 97, 21-29.
- Browne, K.D., Leoni, M.J., Iwata, A., Chen, X.H., Smith, D.H., 2004. Acute treatment with MgSO<sub>4</sub> attenuates long-term hippocampal tissue loss after brain trauma in the rat. *J Neurosci Res* 77, 878-883.
- Chaudhary, D.P., Boparai, R.K., Bansal, D.D., 2007. Implications of oxidative stress in high sucrose low magnesium diet fed rats. *Eur J Nutr* 46, 383-390.
- Chen, Y., Xiong, S., Zhao, F., Lu, X., Wu, B., Yang, B., 2019. Effect of magnesium on reducing the UV-induced oxidative damage in marrow mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 107, 1253-1263.
- Chetty, S., Friedman, A.R., Taravosh-Lahn, K., Kirby, E.D., Mirescu, C., Guo, F., Krupik, D., Nicholas, A., Geraghty, A., Krishnamurthy, A., Tsai, M.K., Covarrubias, D., Wong, A., Francis, D., Sapolsky, R.M., Palmer, T.D., Pleasure, D., Kaufer, D., 2014. Stress and glucocorticoids promote oligodendrogenesis in the adult hippocampus. *Mol Psychiatry* 19, 1275-1283.
- Consiglio, A.R., Ramos, A.L., Henriques, J.A., Picada, J.N., 2010. DNA brain damage after stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34, 652-656.
- Cunha, C., Brambilla, R., Thomas, K.L., 2010. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3, 1.
- de Munter, J., Pavlov, D., Gorlova, A., Sicker, M., Proshin, A., Kalueff, A.V., Svistunov, A., Kiselev, D., Nedorubov, A., Morozov, S., Umriukhin, A., Lesch, K.P., Strelakova, T., Schroeter, C.A., 2021. Increased Oxidative Stress in the Prefrontal Cortex as a Shared Feature of Depressive- and PTSD-Like Syndromes: Effects of a Standardized Herbal Antioxidant. *Front Nutr* 8, 661455.

- de Quervain, D.J., Roozendaal, B., McGaugh, J.L., 1998. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.
- El Marzouki, H., Aboussaleh, Y., Najimi, M., Chigr, F., Ahami, A., 2021. Effect of Cold Stress on Neurobehavioral and Physiological Parameters in Rats. *Front Physiol* 12, 660124.
- Flaherty, R.L., Owen, M., Fagan-Murphy, A., Intabli, H., Healy, D., Patel, A., Allen, M.C., Patel, B.A., Flint, M.S., 2017. Glucocorticoids induce production of reactive oxygen species/reactive nitrogen species and DNA damage through an iNOS mediated pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 19, 35.
- Flint, M.S., Baum, A., Chambers, W.H., Jenkins, F.J., 2007. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology* 32, 470-479.
- Gomez, J.L., Lewis, M.J., Sebastian, V., Serrano, P., Luine, V.N., 2013. Alcohol administration blocks stress-induced impairments in memory and anxiety, and alters hippocampal neurotransmitter receptor expression in male rats. *Horm Behav* 63, 659-666.
- Gould, E., Cameron, H.A., Daniels, D.C., Woolley, C.S., McEwen, B.S., 1992. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 12, 3642-3650.
- Hans, C.P., Chaudhary, D.P., Bansal, D.D., 2003. Effect of magnesium supplementation on oxidative stress in alloxanic diabetic rats. *Magnes Res* 16, 13-19.
- Heldt, S.A., Stanek, L., Chhatwal, J.P., Ressler, K.J., 2007. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 12, 656-670.
- Hui, G.K., Figueroa, I.R., Poytress, B.S., Roozendaal, B., McGaugh, J.L., Weinberger, N.M., 2004. Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiol Learn Mem* 81, 67-74.
- Iuchi, T., Akaike, M., Mitsui, T., Ohshima, Y., Shintani, Y., Azuma, H., Matsumoto, T., 2003. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92, 81-87.
- Jia, S., Liu, Y., Shi, Y., Ma, Y., Hu, Y., Wang, M., Li, X., 2016. Elevation of Brain Magnesium Potentiates Neural Stem Cell Proliferation in the Hippocampus of Young and Aged Mice. *J Cell Physiol* 231, 1903-1912.
- Jia, S., Mou, C., Ma, Y., Han, R., Li, X., 2016. Magnesium regulates neural stem cell proliferation in the mouse hippocampus by altering mitochondrial function. *Cell Biol Int* 40, 465-471.
- Joergensen, A., Broedbaek, K., Weimann, A., Semba, R.D., Ferrucci, L., Joergensen, M.B., Poulsen, H.E., 2011. Association between urinary excretion of cortisol and markers of oxidatively damaged DNA and RNA in humans. *PLoS One* 6, e20795.
- Kirkland, A.E., Sarlo, G.L., Holton, K.F., 2018. The Role of Magnesium in Neurological Disorders. *Nutrients* 10.

- Kitamura, Y., Araki, H., Gomita, Y., 2002. Influence of ACTH on the effects of imipramine, desipramine and lithium on duration of immobility of rats in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 63-69.
- Korte, M., Kang, H., Bonhoeffer, T., Schuman, E., 1998. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 37, 553-559.
- Kuzniar, A., Mitura, P., Kurys, P., Szymonik-Lesiuk, S., Florianczyk, B., Stryjecka-Zimmer, M., 2003. The influence of hypomagnesemia on erythrocyte antioxidant enzyme defence system in mice. *Biometals* 16, 349-357.
- Li, W., Yu, J., Liu, Y., Huang, X., Abumaria, N., Zhu, Y., Huang, X., Xiong, W., Ren, C., Liu, X.G., Chui, D., Liu, G., 2014. Elevation of brain magnesium prevents synaptic loss and reverses cognitive deficits in Alzheimer's disease mouse model. *Mol Brain* 7, 65.
- Liao, W., Jiang, M., Li, M., Jin, C., Xiao, S., Fan, S., Fang, W., Zheng, Y., Liu, J., 2017. Magnesium Elevation Promotes Neuronal Differentiation While Suppressing Glial Differentiation of Primary Cultured Adult Mouse Neural Progenitor Cells through ERK/CREB Activation. *Front Neurosci* 11, 87.
- Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M.K., Yeo, H.C., Mori, A., Ames, B.N., 1996. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *Faseb j* 10, 1532-1538.
- Lu, Y., Christian, K., Lu, B., 2008. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* 89, 312-323.
- Meng, Q., Li, N., Han, X., Shao, F., Wang, W., 2011. Effects of adolescent social isolation on the expression of brain-derived neurotrophic factors in the forebrain. *Eur J Pharmacol* 650, 229-232.
- Nooshinfar, E., Akbarzadeh-Baghban, A., Meisami, E., 2011. Effects of increasing durations of immobilization stress on plasma corticosterone level, learning and memory and hippocampal BDNF gene expression in rats. *Neurosci Lett* 500, 63-66.
- Okuda, S., Roozendaal, B., McGaugh, J.L., 2004. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 853-858.
- Orhan, C., Tuzcu, M., Deeh Defo, P.B., Sahin, N., Ojalvo, S.P., Sylla, S., Komorowski, J.R., Sahin, K., 2022. Effects of a Novel Magnesium Complex on Metabolic and Cognitive Functions and the Expression of Synapse-Associated Proteins in Rats Fed a High-Fat Diet. *Biol Trace Elem Res* 200, 247-260.
- Patki, G., Solanki, N., Atrooz, F., Allam, F., Salim, S., 2013. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res* 1539, 73-86.
- Petrović, J., Stanić, D., Bulat, Z., Puškaš, N., Labudović-Borović, M., Batinić, B., Mirković, D., Ignjatović, S., Pešić, V., 2018. Acth-induced model of depression resistant to tricyclic antidepressants: Neuroendocrine and behavioral changes and influence of long-term magnesium administration. *Horm Behav* 105, 1-10.



- Petrović, J., Stanić, D., Dmitrašinović, G., Plećaš-Solarović, B., Ignjatović, S., Batinić, B., Popović, D., Pešić, V., 2016. Magnesium Supplementation Diminishes Peripheral Blood Lymphocyte DNA Oxidative Damage in Athletes and Sedentary Young Man. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2019643.
- Radahmadi, M., Alaei, H., Sharifi, M.R., Hosseini, N., 2015. Effects of different timing of stress on corticosterone, BDNF and memory in male rats. *Physiol Behav* 139, 459-467.
- Roustazade, R., Radahmadi, M., Yazdani, Y., 2022. Therapeutic effects of saffron extract on different memory types, anxiety, and hippocampal BDNF and TNF- $\alpha$  gene expressions in sub-chronically stressed rats. *Nutr Neurosci* 25, 192-206.
- Sandi, C., Loscertales, M., Guaza, C., 1997. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci* 9, 637-642.
- Sato, H., Takahashi, T., Sumitani, K., Takatsu, H., Urano, S., 2010. Glucocorticoid Generates ROS to Induce Oxidative Injury in the Hippocampus, Leading to Impairment of Cognitive Function of Rats. *J Clin Biochem Nutr* 47, 224-232.
- Singewald, N., Sinner, C., Hetzenauer, A., Sartori, S.B., Murck, H., 2004. Magnesium-deficient diet alters depression- and anxiety-related behavior in mice--influence of desipramine and *Hypericum perforatum* extract. *Neuropharmacology* 47, 1189-1197.
- Siswanto, H., Hau, J., Carlsson, H.E., Goldkuhl, R., Abelson, K.S., 2008. Corticosterone concentrations in blood and excretion in faeces after ACTH administration in male Sprague-Dawley rats. *In Vivo* 22, 435-440.
- Slutsky, I., Abumaria, N., Wu, L.J., Huang, C., Zhang, L., Li, B., Zhao, X., Govindarajan, A., Zhao, M.G., Zhuo, M., Tonegawa, S., Liu, G., 2010. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron* 65, 165-177.
- Smith, M.A., Makino, S., Kvetnanský, R., Post, R.M., 1995. Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 771, 234-239.
- Stanić, D., Plećaš-Solarović, B., Petrović, J., Bogavac-Stanojević, N., Sopić, M., Kotur-Stevuljević, J., Ignjatović, S., Pešić, V., 2016. Hydrogen peroxide-induced oxidative damage in peripheral blood lymphocytes from rats chronically treated with corticosterone: The protective effect of oxytocin treatment. *Chem Biol Interact* 256, 134-141.
- Tanapat, P., Hastings, N.B., Rydel, T.A., Galea, L.A., Gould, E., 2001. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437, 496-504.
- Walker, J.J., Spiga, F., Gupta, R., Zhao, Z., Lightman, S.L., Terry, J.R., 2015. Rapid intra-adrenal feedback regulation of glucocorticoid synthesis. *J R Soc Interface* 12, 20140875.
- Wang, J., Liu, Y., Zhou, L.J., Wu, Y., Li, F., Shen, K.F., Pang, R.P., Wei, X.H., Li, Y.Y., Liu, X.G., 2013. Magnesium L-threonate prevents and restores memory deficits associated with neuropathic pain by inhibition of TNF- $\alpha$ . *Pain Physician* 16, E563-575.
- Wong, E.Y., Herbert, J., 2004. The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus. *Eur J Neurosci* 20, 2491-2498.

- Workman, J.L., Chan, M.Y., Galea, L.A., 2015. Prior high corticosterone exposure reduces activation of immature neurons in the ventral hippocampus in response to spatial and nonspatial memory. *Hippocampus* 25, 329-344.
- Wu, C., Xue, L.D., Su, L.W., Xie, J.L., Jiang, H., Yu, X.J., Liu, H.M., 2019. Magnesium promotes the viability and induces differentiation of neural stem cells both in vitro and in vivo. *Neurol Res* 41, 208-215.
- Xiong, Y., Ruan, Y.T., Zhao, J., Yang, Y.W., Chen, L.P., Mai, Y.R., Yu, Q., Cao, Z.Y., Liu, F.F., Liao, W., Liu, J., 2022. Magnesium-L-threonate exhibited a neuroprotective effect against oxidative stress damage in HT22 cells and Alzheimer's disease mouse model. *World J Psychiatry* 12, 410-424.
- Xu, H., Chen, Z., He, J., Haimanot, S., Li, X., Dyck, L., Li, X.M., 2006. Synergetic effects of quetiapine and venlafaxine in preventing the chronic restraint stress-induced decrease in cell proliferation and BDNF expression in rat hippocampus. *Hippocampus* 16, 551-559.
- Xu, Z.P., Li, L., Bao, J., Wang, Z.H., Zeng, J., Liu, E.J., Li, X.G., Huang, R.X., Gao, D., Li, M.Z., Zhang, Y., Liu, G.P., Wang, J.Z., 2014. Magnesium protects cognitive functions and synaptic plasticity in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's model. *PLoS One* 9, e108645.
- Zafir, A., Banu, N., 2009. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 12, 167-177.
- Zhang, Y., Chan, M.M., Andrews, M.C., Mori, T.A., Croft, K.D., McKenzie, K.U., Schyvens, C.G., Whitworth, J.A., 2005. Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. *Am J Hypertens* 18, 910-916.
- Zhou, X., Huang, Z., Zhang, J., Chen, J.L., Yao, P.W., Mai, C.L., Mai, J.Z., Zhang, H., Liu, X.G., 2021. Chronic Oral Administration of Magnesium-L-Threonate Prevents Oxaliplatin-Induced Memory and Emotional Deficits by Normalization of TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Signaling in Rats. *Neurosci Bull* 37, 55-69.

## D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

### Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M23):

1. Đurić V, Batinić B, Petrović J, Stanić D, Bulat Z, Pešić V. A single dose of magnesium, as well as chronic administration, enhances long-term memory in novel object recognition test, in healthy and ACTH-treated rats. *Magnesium research*, 2018; 31 (1): 24-32 doi:10.1684/mrh.2018.0435

**Naziv časopisa:** Magnesium Research

**Impakt faktor (2021):** 2.125

2. Đurić V, Petrović J, Stanić D, Ivanović A, Kotur-Stevuljević J, Pešić V. Magnesium suppresses in vivo oxidative stress and ex vivo DNA damage induced by protracted ACTH treatment in rats. *Magnesium research*, 2023; doi: 10.1684/mrh.2023.510

**Naziv časopisa:** Magnesium Research

**Impakt faktor (2021):** 2.125

## E. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija kandidata magistra farmacije Vedrane Đurić zasniva se na ispitivanju efekata farmakološki izazvanog stresa i modulatorne uloge suplementacije magnezijumom na učenje i pamćenje, kao i na molekularne promene u hipokampusu i *locus ceruleus*-u, uz praćenje parametara oksidativnog stresa i oksidativnih oštećenja DNK molekula kod eksperimentalnih životinja pacova Wistar soja.

Detaljnou analizom priložene doktorske disertacije Komisija je konstatovala da je disertacija prikazana na jasan i pregledan način i da su svi postavljeni ciljevi u potpunosti realizovani. Eksperimenti su organizovani i sprovedeni u skladu sa savremenim standardima istraživanja u oblasti neuronauka. Na kraju doktorske disertacije prikazani su zaključci izvedeni na osnovu dobijenih rezultata i dostupnih literaturnih podataka. Podaci predstavljeni u disertaciji daju

originalan doprinos boljem razumevanju sagledavanog problema. Svemu navedenom u prilog ide činjenica da su rezultati ove doktorske disertacije do sada publikovani u okviru dva rada u međunarodnim časopisima kategorije M23.

Na osnovu rezultata istraživanja u sklopu doktorske disertacije, mogu se doneti sledeći zaključci:

- Aktivacija HPA osovine dugoročnom primenom ACTH hormona, koja je prethodno validirana kao model hroničnog stresa i aktivacija HPA osovine akutnom primenom ACTH hormona, nisu dovele do poboljšanja memorije prepoznavanja kod Wistar pacova korišćenjem testa prepoznavanja novog objekta, ali se ne može se isključiti potencijalno negativni efekat aktivacije HPA osovine na memoriju životinja.
- Suplementacija magnezijumom pokazala je prokognitivni efekat, kako kod zdravih životinja tako i uslovima hiperaktivnosti HPA osovine, iako nije dovela do povećanja koncentracije magnezijuma u prefrontalnom korteksu. Prokognitivni efekat magnezijuma bio je prisutan i nakon akutne i nakon dugoročne peroralne primene magnezijum-sulfata ispitivano testom prepoznavanja novog objekta.
- U modelu hroničnog stresa dugoročna suplementacija magnezijumom suprimirala je hiperaktivnost HPA osovine, što je pokazano smanjenjem nivoa kortikosterona u plazmi životinja.
- Hiperaktivnost HPA osovine negativno je modulisao proces neurogeneze u *dentate gyrus* regionu hipokampusa, što se manifestovalo smanjenjem gustine nezrelih neurona, iako je ekspresija BDNF i GAP43 proteina ostala nepromenjena. Ovaj efekat bi mogao ukazati na negativni uticaj hiperaktivnosti HPA osovine na memoriju životinja.
- Primena magnezijuma imala je stimulatorni efekat na proces adultne neurogeneze, koji se ogledao u povećanju gustine nezrelih neurona u hipokampusu, kao i povećanju količine proteina koji podržavaju neurogenezu, BDNF i GAP43, u hipokampusu eksperimentalnih životinja.

- Dugoročni tretmani ACTH hormonom i suplementacija magnezijumom modulišu aktivnost noradrenergičkog sistema u *Locus ceruleus*-u tako što su doveli do povećanja ekspresije autoinhibitornih alpha-2A adrenergičkih receptora.
- Tretman ACTH hormonom pokazao je prooksidativni potencijal koji se manifestuovao povećanjem nivoa superoksid anjona i smanjenjem aktivnosti antioksidativnog enzima SOD u plazmi Wistar pacova. ACTH tretman dovodi do povećanja osetljivosti DNK molekula životinja na *ex-vivo* oksidativna DNK oštećenja, koja se manifestuju povećanjem broja ćelija sa DNK oštećenjem nakon *in vitro* izlaganja vodonik peroksidu.
- Tretman magnezijumom pokazao je antioksidativni potencijal i kod zdravih životinja i u modelu hroničnog stresa. Tretman magnezijumom smanjio je nivo produkata oksidacije proteina u plazmi životinja i osetljivost DNK molekula na *ex-vivo* izazvana oksidativna DNK oštećenja, gde se efekat manifestuje smanjenjem broja ćelija sa oksidativnim DNK oštećenjem nakon *in vitro* izlaganja oksidansu. Protektivan efekat magnezijuma u uslovima aktivacije HPA osovine manifestuje se vraćanjem balansa oksidativnog statusa smanjenjem nivoa superoksid anjona i povećanjem aktivnosti antioksidativnog enzima SOD, uz smanjenje osetljivosti DNK molekula na *in vitro* oksidativna DNK oštećenja.

Uzimajući u obzir rezultate ovog istraživanja, može se zaključiti da je opravdano dalje ispitivanje primene magnezijuma u kliničkim ispitivanjima kod pacijenta kod kojih su prisutna kognitivna oštećenja, različitog stepena, a koja eventualno mogu biti povezana sa promenama strukture i funkcije hipokampusa i povećanim oksidativnim stresom uključujući pacijente sa Alchajmerovom bolešću, pacijente koji pate od hroničnog stresa i depresije.

## **F. PROVERA ORIGINALNOSTI DOKTORSKE DISERTACIJE**

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetskoj biblioteci Svetozar Marković, Beograd izvršena je provera originalnosti doktorske disertacije. Dobijena vrednost za *Similarity index* iznosi 8% i ovaj stepen podudaranja posledica je podudarnosti ličnih imena, citata, reči korišćenih u opisu metodologije, uobičajenih fraza koje se koriste u opisu rezultata istraživanja i statističke obrade, kao i publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz rezultata ove doktorske disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika. Shodno tome, može se izvesti zaključak da je priložena doktorska disertacija kandidata mag. farm. Vedrane Đurić originalno naučno delo.

**Mentor:**

---

Dr Vesna Pešić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

## G. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu pregleda doktorske disertacije mag. farm. **Vedrane Đurić** pod nazivom „**Uticaj hiperaktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda i oksidativnog stresa na učenje i pamćenje: modulatorna uloga suplementacije magnezijumom**“ može se zaključiti da je kandidat ispunio postavljene ciljeve i da rezultati prikazani u disertaciji predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos, što je potvrđeno njihovim objavljivanjem u obliku dva rada u međunarodnim časopisima.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivan Izveštaj i omogući kandidatu mag. farm. Vedrani Đurić odbranu doktorske disertacije.

Beograd, 11.05.2023

### Članovi Komisije:

---

Dr Dušanka Stanić, docent  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Jelena Petrović, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Ana Starčević, docent  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

---

Dr Bojana Pejušković, docent  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet