

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Vedrana R. Đurić

**UTICAJ HIPERAKTIVNOSTI OSOVINE
HIPOTALAMUS-HIPOFIZA-NADBUBREŽNA ŽLEZDA
I OKSIDATIVNOG STRESA NA UČENJE I PAMĆENJE:
MODULATORNA ULOGA SUPLEMENTACIJE
MAGNEZIJUMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Vedrana R. Đurić

**UTICAJ HIPERAKTIVNOSTI OSOVINE
HIPOTALAMUS-HIPOFIZA-NADBUBREŽNA ŽLEZDA
I OKSIDATIVNOG STRESA NA UČENJE I PAMĆENJE:
MODULATORNA ULOGA SUPLEMENTACIJE
MAGNEZIJUMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Vedrana R. Djuric

**EFFECTS OF HYPERACTIVITY OF THE
HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AXIS AND
OXIDATIVE STRESS ON LEARNING AND MEMORY:
MODULATORY ROLE OF MAGNESIUM
SUPPLEMENTATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

MENTOR:

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

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

Datum odbrane: _____

IZJAVE ZAHVALNOSTI

Izrada ove doktorske disertacije realizovana je na Katedri za Fiziologiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Vesne Pešić.

Zahvaljujem se mentorki profesorki dr Vesni Pešić na stručnim savetima i neizmernoj pomoći u svim fazama izrade ove doktorske disertacije, počevši od inicijalne ideje, dizajna istraživanja, sprovođenja samog istraživanja, do samog završetka izrade ove doktorske disertacije. Profesorki Pešić se posebno zahvaljujem na velikoj podršci, motivaciji i razumevanju tokom ovog putovanja, i nadam se da sam opravdala njeno poverenje. Iskreno zadovoljstvo je bilo saradivati sa profesorkom i njenim kolektivom.

Uz posebnu zahvalnost kolegama i prijateljima Dušanki, Jeleni, Bojanu i Ani na odličnoj saradnji, velikoj pomoći i podršci u svim fazama izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svim članovima Komisije na savetima i sugestijama koje su značajno doprineli konačnoj verziji doktorske disertacije.

Posvećeno Leli i Ogiju, uz vas je sve moguće!

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

Sažetak:

Hronični stres, neadekvatan način ishrane kao i oksidativni stres mogu se dovesti u vezu sa kognitivnim poremećajima i poremećajima ponašanja. Za Mg je pokazano da smanjuje hiperaktivnost stres osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda, a uključen je i u regulaciju ekscitatorne sinaptičke transmisije, sinaptičke plastičnosti i neurogeneze putem modulacije aktivnosti NMDA receptora u mozgu.

Cilj istraživanja doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj hiperaktivnosti stres osovine, izazvane primenom ACTH, na učenje i pamćenje, parametre neurogeneze i parametre oksidativnog stresa Wistar pacova. Takođe, cilj je bio da se ispita modulatorni efekat akutne i dugoročne (300 mg Mg/L, 28 dana) primene Mg kod Wistar pacova u fiziološkim i uslovima hiperaktivnosti HPA osovine.

Rezultati istraživanja ukazuju da suplementacija Mg pokazuje pozitivan efekat na memoriju i stimulatorni efekat na proces adultne neurogeneze u hipokampusu eksperimentalnih životinja, dok tretmani ACTH hormonom nisu doveli do poboljšanja memorije. Naime, hiperaktivnost HPA osovine negativno je modulisala proces neurogeneze u hipokampusu, povećala osetljivost DNK molekula na *ex-vivo* izazvana oksidativna oštećenja i povećala oksidativni stres u plazmi Wistar pacova. Mg je suprimirao hiperaktivnost HPA osovine smanjenjem nivoa kortikosterona i vraćanjem balansa oksidativnog statusa, uz smanjenje osetljivosti DNK na *in vitro* oksidativna oštećenja.

S obzirom da je u ovoj disertaciji pokazan prokognitivni i uticaj Mg na redukciju efekata farmakološki izazvanog stresa kod eksperimentalnih životinja, opravdano bi bilo ispitivanje primene Mg kod pacijenata kod kojih su prisutna kognitivna oštećenja različitog stepena povezana sa promenama u strukturi i funkciji hipokampusa i sa povećanim oksidativnim stresom.

Ključne reči: magnezijum, adenokortikotropni hormon/ACTH, hiperaktivnost HPA osovine, memorija, neurogeneza, oksidativni stres, DNK oštećenje

Naučna oblast: Farmakologija

Uža naučna oblast: Neurofarmakologija

Effects of hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and oxidative stress on learning and memory: modulatory role of magnesium supplementation

Abstract:

Chronic stress, inadequate diet as well as oxidative stress can be linked with cognitive and behavioral disorders. It has been shown that Mg reduces hyperactivity of stress axis, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, whereas it is involved in regulation of excitatory synaptic transmission, synaptic plasticity, and neurogenesis via modulation of NMDA receptor activity in brain.

The aim of doctoral dissertation research was to investigate effect of stress axis hyperactivity, via ACTH application, on learning and memory, on parameters of neurogenesis and on parameters of oxidative stress in Wistar rats. Also, aim was to evaluate modulatory effect of acute and chronic (300 mg Mg/L, for 28 days) Mg supplementation in Wistar rats in physiological conditions and during HPA axis hyperactivity.

The results indicate that Mg supplementation shows positive effect on memory and stimulatory effect on adult neurogenesis in hippocampus of experimental animals, while ACTH treatment did not show memory improvement. Namely, hyperactivity of HPA axis has negatively modulated neurogenesis in hippocampus, has increased DNA sensitivity to *ex-vivo* induced oxidative damage and has increased oxidative stress in Wistar rats' plasma. Mg has suppressed HPA axis hyperactivity via decreasing corticosterone levels and via restoring the balance of oxidative status, while decreasing DNA sensitivity to *in vitro* induced oxidative damage.

Considering that procognitive and influence of magnesium on reduction of pharmacological induced stress effects in experimental animals has been shown in this dissertation, it would be justified further investigation of magnesium supplementation in patients with different levels of cognitive dysfunction, linked with changes in structure and function of hippocampus and with increased oxidative stress.

Keywords: magnesium, adrenocorticotrophic hormone/ACTH, hyperactivity of HPA axis, memory, neurogenesis, oxidative stress, DNA damage

Scientific field: Pharmacology

Specific scientific field: Neuropharmacology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Učenje i pamćenje.....	1
1.1.1. Hipoteza sinaptičke plastičnosti i memorije.....	1
1.1.2. Medijalno temporalni režanj.....	3
1.1.3. Hipokampus.....	4
1.1.4. Poremećaji učenja i pamćenja	6
1.1.5. Animalni modeli učenja i pamćenja.....	7
1.1.5.1. Test prepoznavanja novog objekta.....	8
1.2. Oksidativni stres.....	9
1.3. Hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlezda osovina.....	11
1.3.1. Kortikotropin, adrenokortikotropni hormon i glukokortikoidi.....	13
1.3.2. Regulacija aktivnosti hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlezda osovine.....	16
1.3.3. Uticaj aktivnosti HPA osovine na učenje i pamćenje.....	17
1.3.4. Hiperaktivnost HPA osovine i oksidativna oštećenja biomolekula.....	20
1.3.5. Eksperimentalni modeli zasnovani na primeni ACTH	20
1.4. Magnezijum.....	21
1.4.1. Uloga magnezijuma u učenju i pamćenju.....	22
1.4.2. Magnezijum i oksidativni status.....	25
2. CILJEVI RADA	27
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1 Eksperimentalne životinje.....	29
3.2. Eksperimentalni dizajn.....	29
3.2.1. Eksperimentalni dizajn – prva faza istraživanja.....	29
3.2.2. Eksperimentalni dizajn – druga faza istraživanja.....	32
3.2.3. Supstance korišćene kao tretmani: magnezijum i ACTH analog.....	33

3.3. Test prepoznavanja novog objekta – NORT.....	33
3.3.1. NORT protokol.....	33
3.3.2. NORT parametri.....	36
3.4. Određivanje koncentracije magnezijuma u prefrontalnom korteksu mozga eksperimentalnih životinja.....	37
3.5. Određivanje koncentracije kortikosterona u plazmi Wistar pacova.....	37
3.6. Izolovanje i određivanje količine proteina u hipokampusu Western blot metodom.....	38
3.6.1. Priprema tkiva hipokampusu za Western blot analizu.....	38
3.6.2. Natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (eng. <i>Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel electrophoresis</i> - SDS-PAGE).....	40
3.6.3. Transfer proteina sa gela na membranu.....	41
3.6.4. Detekcija proteina.....	42
3.7. Imunohistohemijska analiza ekspresije DCX proteina u hipokampusu i α 2A-adrenergičkih receptora u <i>locus ceruleus</i> -u.....	43
3.7.1. Određivanje ekspresije DCX proteina u hipokampusu imunohistohemijskom metodom.....	44
3.7.2. Određivanje ekspresije α 2A-AR u <i>locus ceruleus</i> -u imunohistohemijskom metodom.....	46
3.8. Određivanje stepena oštećenja DNK molekula perifernih limfocita nakon dugoročnih tretmana.....	47
3.9. Određivanje markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi Wistar pacova.....	50
3.9.1. Određivanje nivoa superoksid anjona - $O_2^{\cdot-}$	50
3.9.2. Određivanje totalnog oksidativnog statusa – TOS.....	51
3.9.3. Određivanje koncentracije AOPP.....	51
3.9.4. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dizmutaze – SOD.....	52
3.9.5. Određivanje aktivnosti paraoksonaze 1 – PON1.....	52
3.10. Statistička analiza rezultata.....	52
4. REZULTATI.....	54

4.1. Uticaji akutne i dugoročne aktivacije HPA osovine na memoriju eksperimentalnih životinja, modulatorna uloga magnezijum.....	54
4.1.1. NORT test – indeks diskriminacije i indeks prepoznavanja.....	54
4.1.1.1. Promene u D indeksu i R indeksu – eksperiment 1.....	54
4.1.1.2. Promene u D indeksu i R indeksu – eksperiment 2.....	55
4.1.1.3. Promene u D indeksu i R indeksu – eksperiment 3.....	57
4.1.2. NORT test – vremena istraživanja objekata u test fazi.....	58
4.1.2.1. Promene u vremenu istraživanja objekata – eksperiment 1.....	58
4.1.2.2. Promene u vremenu istraživanja objekata – eksperiment 2.....	60
4.1.2.3. Promene u vremenu istraživanja objekata – eksperiment 3.....	61
4.2. Efekat dugoročnih tretmana na koncentraciju magnezijuma u prefrontalnom korteksu.....	62
4.3. Uticaj dugoročnih tretmana na koncentraciju kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja.....	62
4.4. Uticaj dugoročnih tretmana na ekspresiju parametara neurogeneze i sinaptogeneze u hipokampusu.....	63
4.4.1. Količina BDNF proteina u hipokampusu.....	64
4.4.2. Količina GAP43 proteina u hipokampusu.....	65
4.4.3. Ekspresija DCX proteina u <i>dentate gyrus</i> regionu hipokampusu.....	66
4.5. Efekat dugoročnih tretmana na ekspesiju alpha-2A adrenergičkih receptora u <i>Locus ceruleus</i> -u.....	68
4.6. Uticaj tretmana na oksidativna oštećenja DNK molekula, na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	69
4.6.1. Oštećenja DNK molekula perifernih limfocita.....	69
4.6.1.1. Ukupni broj perifernih limfocita sa DNK oštećenjem.....	69
4.6.1.2. Stepen DNK oštećenja perifernih limfocita: ćelije sa umerenim i ćelije sa visokim oštećenjem DNK molekula.....	70
4.6.1.3. Promene nivoa totalnog komet skora (TCS), komet skora umereno oštećenih ćelija (MDCS) i komet skora visoko oštećenih ćelija (HDCS).....	72

4.6.2. Efekti dugoročnih tretmana magnezijumom, adrenokortikotropnim hormonom i kombinacije tretmana na markere oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi Wistar pacova.....	75
4.6.2.1. Promene vrednosti nivoa superoksid anjona - O ₂ ⁻	75
4.6.2.2. Promene vrednosti totalnog oksidativnog status – TOS.....	76
4.6.2.3. Promene koncentracije produkata oksidacije proteina – AOPP.....	77
4.6.2.4. Promene aktivnosti enzima superoksid dizmutaze – SOD u plazmi.....	77
4.6.2.5. Promene aktivnosti enzima paraoksonaze 1 – PON1 u plazmi.....	79
5. DISKUSIJA.....	80
5.1. Uticaj magnezijuma na memoriju u fiziološkim i uslovima aktivacije HPA osovine.....	80
5.1.1. Prokognitivni efekat magnezijuma.....	80
5.2. Izostanak prokognitivnog efekta ACTH hormona.....	83
5.3. Uticaj magnezijuma na parametre neurogeneze i sinaptogeneze u hipokampusu pacova.....	85
5.4. Uticaj aktivacije HPA osovine na parametre neurogeneze i sinaptogeneze u hipokampusu pacova.....	89
5.5. Uticaj dugoročnih tretmana na ekspresiju α 2A-adrenergičkih receptora u <i>Locus ceruleus</i> -u.....	91
5.6. Promene nivoa parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite nakon ACTH tretmana, protektivni efekat magnezijuma.....	92
5.7. <i>ex-vivo</i> oksidativno oštećenje DNK nakon ACTH tretmana, protektivni efekat magnezijuma.....	94
5.8. Uticaj magnezijuma na oksidativni status i oksidativno oštećenje DNK.....	96
6. ZAKLJUČAK.....	99
7. LITERATURA.....	101
8. PRILOZI.....	124
Lista skraćenica.....	124
9. BIOGRAFIJA.....	129
10. IZJAVE.....	129
Изјава о ауторству.....	130

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	131
Изјава о коришћењу	132

1. UVOD

1.1. Učenje i pamćenje

Učenje i pamćenje spadaju u osnovne moždane funkcije, a zajedno sa egzekutivnim funkcijama čine kognitivne funkcije čoveka. Takeuchi i saradnici su jednostavno objasnili svakodnevnu percepciju memorije kao događaj koji se dogodio nekome, koji je zabeležen u mozgu te osobe, i nakon toga osoba može da se priseti samog događaja (Takeuchi et al., 2014). Najčešća podela memorije jeste na kratkoročnu memoriju (eng. *short-term memory*) i dugoročnu memoriju (eng. *long-term memory*), na osnovu dve fundamentalne razlike koje leže u činjenicama da kratkoročna memorija pokazuje opadanje vremenom i nizak kapacitet skladištenja (Milner et al., 1998; Raslau et al., 2014; Cowan, 2008). Kratkoročna memorija, uključujući i radnu memoriju (eng. *working memory*), traje između nekoliko sekundi i nekoliko sati, dok dugoročna memorija traje između nekoliko sati i nekoliko meseci, međutim neke memorije mogu da traju do kraja života te se smatraju dugotrajnim memorijama (eng. *long-lasting memory*) (McGaugh, 2000; Robertson, 2002; Cowan, 2008). Daljom podelom, dugoročna memorija se može podeliti na deklarativnu memoriju, kao najčešće podrazumevanu memoriju u svakodnevnom životu, i nedeklarativnu memoriju (Milner et al., 1998; Raslau et al., 2014).

Na važnost uloga hipokampusa i celog medijalno temporalnog režnja (eng. *Medial temporal lobe*, MTL) na formiranje nove memorije ukazali su Scoville i Milner još 1957. godine. Scoville i Milner su pokazali postojanost retrogradne amnezije kod pacijenta kod koga je bilateralno hirurški uklonjen MLT, međutim retrogradna amnezija je postojala samo za novija sećanja, dok je pacijent zadržao sećanja iz najranijeg detinjstva. Rezultati ove studije ukazali su na to da hipokampus nije struktura u kojoj se sećanja skladište do kraja života, te da su u sam proces trajne konsolidacije memorije uključene i određene kortikalne strukture (Scoville i Milner, 1957; Frankland i Bontempi, 2005; Raslau et al., 2015). Dodatno veliki broj istraživanja ukazuje da i lateralna jedra amigdale učestvuju u procesima učenja i pamćenja, odnosno da predstavljaju ključnu komponentu nervnog sistema u procesima emocionalnog učenja i pamćenja (Rodrigues et al., 2004).

1.1.1. Hipoteza sinaptičke plastičnosti i memorije

Pretpostavljeni mehanizam kodiranja i čuvanja memorijskih informacija u centralnom nervnom sistemu uključuje promene u jačini konekcija između samih neurona (Martin et al., 2000; Takeuchi et al., 2014). Široko prihvaćena hipoteza sinaptičke plastičnosti i memorije definisana je kao: „Sinaptička plastičnost zavisna od aktivacije koja je indukovana u odgovarajućim sinapsama u toku formiranja memorije je neophodna i dovoljna za skladištenje informacija za tip memorije za koji je odgovoran moždani region gde je sama plastičnost uočena“ (Martin et al., 2000). Martin i saradnici su dalje predložili četiri kriterijuma po kojima bi sama hipoteza trebalo dalje da se ispituje i testira, gde su detektabilnost, anterogradne izmene i retrogradne izmene odolele vremenu i istraživanjima, dok će neke nove tehnike možda omogućiti i ispunjavanje kriterijuma mimikrije (Martin et al., 2000; Takeuchi et al., 2014). S tim u vezi, Takeuchi i saradnici predstavili su sumirane dokaze detektabilnosti, odnosno da ukoliko učenje dovodi do sinaptičke plastičnosti, ova promena u sinaptičkoj efikasnosti bi trebalo da bude

detektabilna. Zatim sumirane dokaze anterogradnih i retrogradnih izmena, odnosno efekata tretmana primenjenih pre ili nakon učenja na sinaptičku plastičnost (Takeuchi et al., 2014).

Ispitivanje uloge sinaptičke plastičnosti zavisne od aktivacije u procesima učenja i pamćenja uključujući dugoročnu potencijaciju (eng. *long-term potentiation* - LTP) i njen pandan dugoročnu depresiju (eng. *long-term depression* - LTD), odnosno ispitivanje dugoročnih promena koje nastaju na nivou pojedinačnih sinapsi predstavlja jedan od glavnih fokusa neuronauke (Martin et al., 2000; Takeuchi et al., 2014). Istraživanja same sinaptičke plastičnosti sprovode se sa ciljem identifikovanja dugoročnih promena u efikasnosti samih sinapsi, koje uključuje izmene u oslobađanju samih neurotransmitera iz presinaptičkog nervnog završetka, izmene na nivou postsinaptičkih receptora, izmene samog signalnog puta unutar sinapsi, kao i promene koje mogu nastati u samoj ekspresiji gena (Takeuchi et al., 2014; Ho et al., 2011).

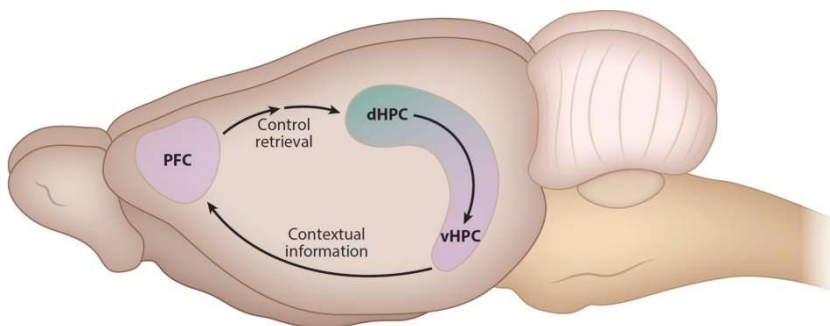
Najviše ispitivani tipovi sinaptičke plastičnosti su LTP, koja je najčešće glutamatergičke prirode i uključuje aktivaciju NMDA-R (N-metil-D-aspartat receptor), iako postoji i NMDA-R nezavisna LTP. Takođe, LTD kao i LTP može biti NMDA-R zavisna i nezavisna. Trebalo bi napomenuti da je uvaženo mišljenje da LTP i LTD ne odgovaraju suprotnim funkcijama, odnosno ne odgovaravaju pamćenju i zaboravljanju, već se smatra da se LTP i LTD dopunjuju, te da to zavisi od samog signala i pozadinskog šuma (eng. *to signal-to-noise ratio*) i kapaciteta skladištenja informacija (Martin et al., 2000). Pored navedenih sinaptičkih plastičnosti, i kratkoročna potencijacija (eng. *short-term potentiation*, STP) se po nekim autorima može smatrati odvojenom formom sinaptičke plastičnosti (Park et al., 2013; Bliss i Collingridge, 2013).

Sinaptička plastičnost se smatra mehanizmom učenja i pamćenja, dok postoji uverenje da kasna faza dugoročne potencijacije i dugoročna memorija zahtevaju sintezu novih proteina (Lu et al., 2008). Niz dokaza ukazuje na ključnu ulogu koju ima protein pripadnik familije neutrofina, neurotrofičnog faktora poreklom iz mozga (eng. *brain-derived neurotrophic factor* - BDNF) u hipokampusu kao medijatora sinaptičke plastičnosti, odnosno njegove značajne uloge u procesima učenja i pamćenja (Korte et al., 1998; Lu et al., 2008; Meng et al., 2011; Smith et al., 1995; Bekinschtein et al., 2014). BDNF je mali protein dimer koji svoj efekat ostvaruje putem receptora tipa tirozin kinaze, za koji se vezuje visokim afinitetom (eng. *tropomyosin-related kinase B* - TrkB), dok su BDNF i receptori za koje se vezuje - TrkB široko rasprostranjeni u subregionima hipokampusa i u prednjem mozgu (Lu et al., 2008).

Protein povezan sa rastom 43 (eng. *Growth-Associated Protein 43*, GAP43) ima značajnu ulogu u sinaptogenezi, regulaciji rasta aksonskih završetaka i regulaciji organizacije citoskeleta u nervnim završetcima (Benowitz i Routtenberg, 1997), te se smatra markerom sinaptičke plastičnosti. GAP43, protein koji je vezan za unutrašnju stranu presinaptičke membrane, je presinaptički supstrat za protein kinazu C, a sama fosforilacija proteina povezana je sa LTP i grananjem nervnih završetaka (Benowitz i Routtenberg, 1997). Dodatno, pokazano je da fosforilacija GAP43 proteina korelira sa oslobađanjem neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini (Dekker et al., 1989), pa potencijalno povećanje u fosforilaciji GAP43 proteina može dovesti do modifikacije u oslobađanju neurotransmitera. Kako reakcija na nove signale u toku LTP, učenja i pamćenja u adultnom dobu, može imati potrebu za oslobađanjem neurotransmitera i potrebu za stvaranjem novih neuralnih grana, novih sinaptičkih konekcija, sama ekspresiju GAP43 proteina je neophodna (Denny, 2006).

1.1.2. Medijalno temporalni režanj

Prvi dokazi o esencijalnoj ulozi hipokampusa i ostalih struktura medijalno temporalnog režnja postali su dostupni sredinom prošlog veka (Scoville i Milner, 1957), nakon čega se interesovanje za strukture uključene u formiranje memorije ne smanjuje. Veliki broj dokaza ukazuje na centralnu ulogu medijalno temporalnog režanja (eng. *Medial temporal lobe*, MTL) u formiranju deklarativne memorije, memorije koja ukazuje na sposobnost pamćenja događaja i činjenica (Preston i Eichenbaum, 2013; Eichenbaum et al., 2007; Eichenbaum, 2017). MTL pored hipokampusa uključuje i parahipokampusni region ili parahipokampusni girus, koji je smešten inferiorno od hipokampusa i sačinjavaju ga entorinalni korteks, peririnalni korteks i parahipokampusni korteks ili postrinalni korteks kod glodara (Raslau et al., 2015; Eichenbaum et al., 2007). Preston i Eichenbaum su na jednom mestu sumirali trenutna saznanja o načinu obrade informacija u ovim regionima (za pregled: Preston i Eichenbaum, 2013). Neokortikalne informacije iz asocijativnih kortikalnih regiona o objektima i događajima, koji se odnose na davanje odgovora na pitanje „šta“, projektuju se u peririnalnom korteksu i lateralnom entorinalnom korteksu, dok se informacije iz drugih kortikalnih regiona koje daju informacije o lokaciji ili koje se odnose na davanje odgovora na pitanje „gde“, projektuju u parahipokampusni korteks i medijalni entorinalni korteks (Preston i Eichenbaum, 2013; Eichenbaum et al., 2007). Dorzalni hipokampus predstavlja strukturu MTL-a u kojoj se ove struje informacija „šta“ i „gde“ inicijalno spajaju, odnosno događaj se kodira u kontekstu u kome se dogodio, dok reverzibilne projekcije iz hipokampusa idu preko parahipokampusnog regiona do neokortikalnih regiona. Neuronu u ventralnom hipokampusu, povezuju događaje sa kontekstom i prave razliku između različitih prostornih konteksta (Komorowski et al., 2013). Nakon toga, informacija se prosleđuje direktnim projekcijama u medijalni prefrontalni korteks (eng. *medial prefrontal cortex*, mPFC). mPFC zatim indirektno šalje informacije u hipokampus putem projekcija u peririnalnom korteksu i lateralnom entorinalnom korteksu (Preston i Eichenbaum, 2013). Dodatno, mPFC se pored hipokampusa smatra strukturom koja je neophodna za aktivnu kontrolu kodiranja i pozivanja memorije, gde se upravo interakcija između ove dve strukture smatra esencijalnom za selektivno pozivanje memorije (Slika 1)(Eichenbaum, 2017).

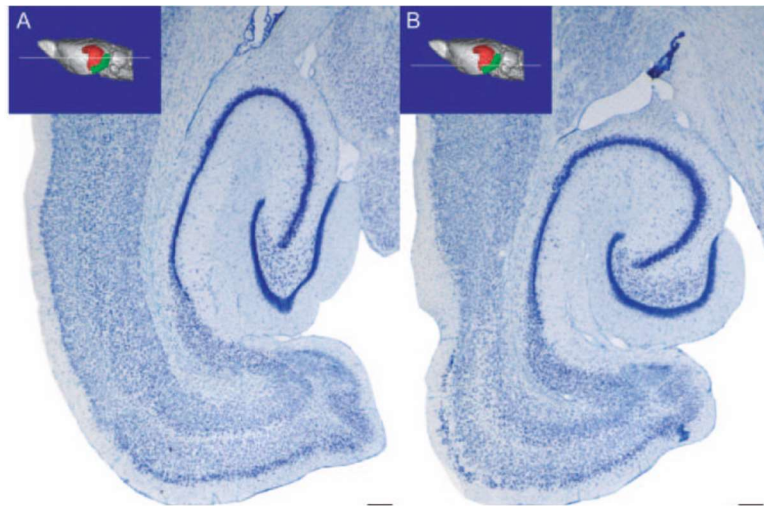


Slika 1. Model veza prefrontalnog korteksa (PFC) i hipokampusa (HPC) koje učestvuju u formiranju memorije. PFC prima informacije iz hipokampusa putem direktnih projekcije iz ventralnog hipokampusa (vHPC) i šalje indirektno projekcije preko peririnalnog i lateralnog entorinalnog korteksa do hipokampusa, do dorzalnog hipokampusa (dHPC). Kada odođeni znak konteksta podstakne pozivanje memorije, kontekstualni znaci se obrađuju u vHPC i informacija se prosleđuje u PFC, koji zatim utiče na dHPC, gde podstiče pozivanje pogodne memorije (preuzeto iz reference: Eichenbaum, 2017).

1.1.3. Hipokampus

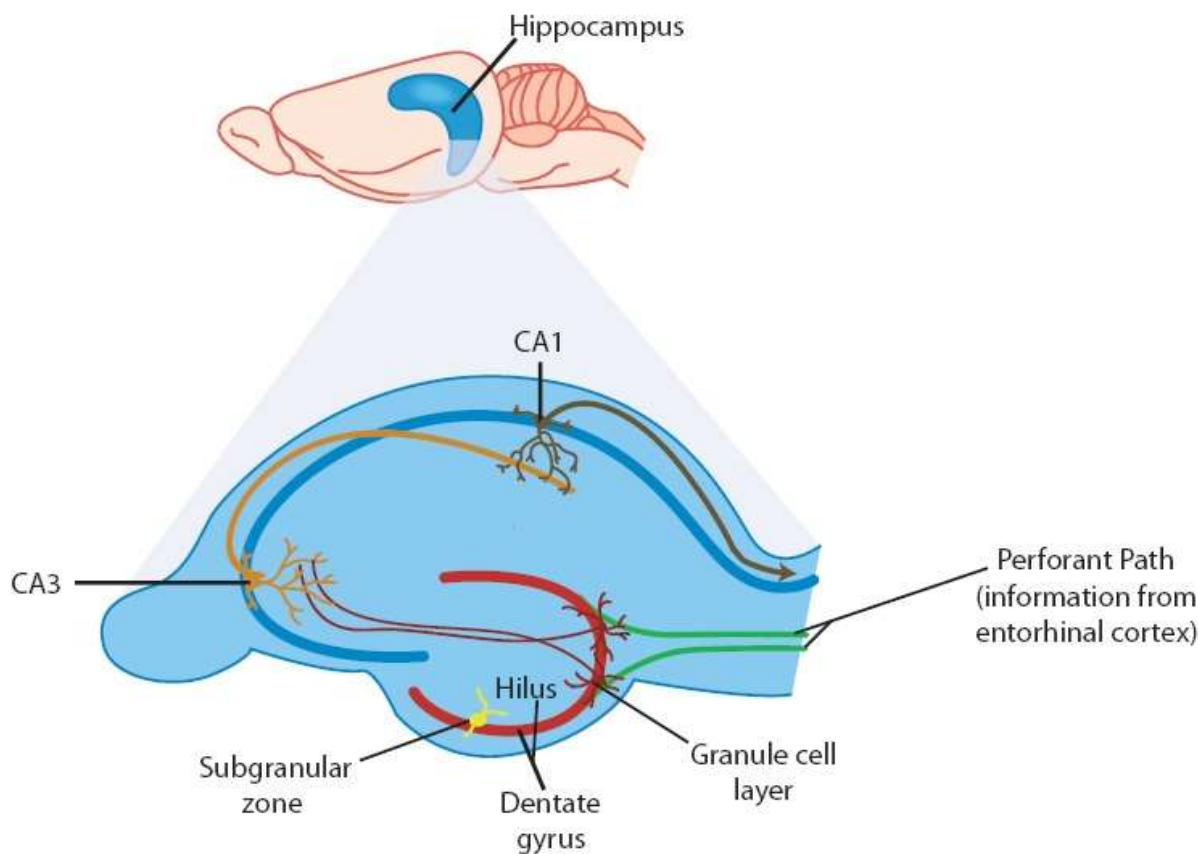
Hipokampus ili hipokampusnu formaciju sačinjavaju *cornu ammonis* (CA) i *dentate gyrus* (DG) (Slike 2 i 3). Region *cornu ammonis* izdelažen je na CA1, CA2, CA3 i CA4, gde je postojanost regiona CA4 po nekim autorima upitna (Amaral et al., 2007). Regioni su raspoređeni tako da se poslednji region nastavlja na *dentate gyrus* dok se na drugoj strani CA1 region nastavlja na subiculum. *Dentate gyrus* sačinjavaju:

- molekularni sloj koji većinom ne sadrži ćelije i koga sačinjavaju dendriti granularnih ćelija i vlakna;
- glavni ćelijski ili granularni sloj koji sačinjavaju gusto pakovane granularne ćelije;
- polimorfni sloj ili hilus uključujući i subgranularni sloj sa prekusurima granularnih ćelija, sačinjen od različitih tipova ćelija uz najveću zastupljenost Mossy ćelija (Amaral et al., 2007).



Slika 2. Horizontalni presek hipokampusa pacova. (A) dorzalno i (B) ventralno postavljen presek hipokampusa, gde su preseci otprilike na nivo 3D ilustracije (preuzeto iz reference: Amaral et al., 2007).

Hipokampus, tačnije region *dentate gyrus* hipokampusa, predstavlja moždanu strukturu za koju je pokazano da tokom čitavog života učestvuje u procesima neurogeneze (Cameron i Gould, 1996), gde progenitorske ćelije prolaze kroz tri faze neurogeneze: proliferaciju, preživljavanje i diferencijaciju (Wong i Herbert, 2006). Pored toga hipokampus je struktura koja je uključena u formiranje, konsolidaciju i pozivanje memorije gde bi upravo proces neurogeneze mogao imati značajnu ulogu. Smatra se da mnogo faktora utiče na proces neurogeneze, tako što stimuliše ili inhibira ovaj proces, a glukokortikoidni hormoni smatraju se jednim od najpotentnijih inhibitornih faktora procesa neurogeneze (Wong i Herbert, 2004; Tanapat et al., 2001).



Slika 3. Hipokampus u šematskom prikazu mozga pacova i regioni *cornu ammonis* (CA) i *dentate gyrus*, sa osnovnim projekcijama. Projekcije iz entorinalnog korteksa (obeleženo zelenom bojom) prave konekcije sa granularnim ćelijama. Novi neuroni se generalno stvaraju u subgranularnoj zoni *dentate gyrus*-a (jedan je prikazan žutom bojom), koji predstavlja granicu između granularnog sloja i *hilus*-a. Projekcije iz granularnih ćelija idu ka ostatku hipokampusa, ka CA3 regionu i onda ka CA1 regionu, pre nego što se informacije vrate nazad u neokortikalne strukture (preuzeto iz reference: Bizon i Gallagher, 2005).

Proces adultne neurogeneze u *dentate gyrus* regionu hipokampusa odvija se tokom čitavog života (Cameron i Gould, 1996), tačnije hipokampalne granularne ćelije koje predstavljaju primarne ekscitatorne neurone *dentate gyrus* regiona nastavljaju da se stvaraju tokom života (Cameron i Glover, 2015) (Slika 3). Sa ciljem ispitivanja potencijalne uloge adultne neurogeneze pre svega u učenju i pamćenju, razvijeni su modeli inhibicije i poboljšanja adultne neurogeneze koji se zasnivaju na primeni zračenja, hemoterapije ili primene farmakogenetskih metoda (Shors et al., 2001). U prvim istraživanjima Shorts i saradnici su pokazali ulogu adultne neurogeneze u uspostavljanju hipokampalno zavisne memorije traga uslovljenog strahom (eng. *Trace Fear Conditioning*), međutim sama inhibicija neurogeneze nije dovela do sprečavanja učenja u potpunosti (Shors et al., 2001). U daljim istraživanjima značajna redukcija novih neurona dovela je do negativnog efekta na ponašanje u testu memorije traga uslovljenog strahom, međutim efekat je izostao u testovima prostorne memorije, kontekstom uslovljenog straha, istraživanja novog konteksta i ankisioznog ponašanja (Shors et al., 2002). Navedeni eksperimenti upućuju na pretpostavku da je za različite memorijske zadatke neophodna različita količina novih neurona ili da ipak za neke memorijske zadatke nisu potrebni novi neuroni. Pored toga, efekat nedostatka

novih neurona uticao je na jednostavan test usmeravanja pažnje na novi zvuk kod naivnih životinja bez primene prethodnog stresa ili specifičnog učenja zadatka (Weeden et al., 2019). Korišćenjem genetski modifikovanih miševa, Vuković i saradnici su uspeli da pokažu da su nezreli neuroni koji ispoljavaju protein *doublecortin* neophodni za sticanje prostornog učenja, međutim nisu neophodni za pozivanje prethodno skladištene dugoročne memorije (Vuković et al., 2013). Veliki broj istraživanja sproveden je kako bi se ukazalo na vezu između neurogeneze i učenja i pamćenja sa oprečnim rezultatima, stoga definitivna veza između adultne neurogeneze i učenja i pamćenja tek treba da se dokaže (Cameron i Glover, 2015; Leuner et al., 2006). Koliko još ima prostora za istraživanje složene veze između memorije i neurogeneze, može da nam ukaže i primer gde je kod miševa kod kojih je inhibirana adultna neurogeneza pokazano bolje razlikovanje novog objekta u odnosu na kontrolnu grupu, šest nedelja nakon inhibicije, a suprotno je pokazano oštećenje memorije kontekstom uslovljenog straha (eng. *contextual fear conditioning*), što ukazuje na specifični značaj šest nedelja starih neurona u oba slučaja (Denny et al., 2012).

Značajno je pomenuti da se *Doublecortin* (DCX), protein povezan sa mikrotubulima koji ima ulogu u migraciji neuroblasta tokom razvoja centralnog nervnog sistema, eksprimira i u adultnom dobu pre svega u regionima *dentate gyrus* i lateralnim ventrikulama (Brown et al., 2003). Brown i saradnici su pokazali da se DCX protein nalazi u sastavu progenitorskih ćelija i nezrelih ćelija, dok je nedetektabilan u sastavu zrelih ćelija, te se može koristiti kao marker adultne neurogeneze (Brown et al., 2003).

1.1.4. Poremećaji učenja i pamćenja

U slučaju da u svakodnevnom životu zaboravimo neku kritičnu informaciju, ime neke osobe ili mesta, šala koja će uslediti sigurno će podrazumevati Alzheimer-ovu bolest (AD), bolest koju karakteriše gubitak memorije i kognitivnih kapaciteta. Nekoliko miliona ljudi širom sveta boluje od Alzheimer-ovu bolesti, a uključivanjem i sindroma blagog kognitivnog oštećenja (eng. *mild cognitive impairment*, MCI) koje ima veliku verovatnoću progresije u AD ovaj broj je daleko veći (Lane et al., 2018; Baldeiras et al., 2008; DeCarli, 2003). S tim u vezi, svetska zdravstvena organizacija prepoznala je AD kao jedan od prioriteta globalnog javnog zdravlja (Lane et al., 2018).

U velikom broju studija ispitivana je povezanost između incidence AD kao i opadanja kognitivnih sposobnosti sa načinom ishrane i svakodnevnom unošenjem izvesnih nutrijenta (Dominguez i Barbagallo, 2018). U literaturi dosta studija ispituje nivo magnezijuma kod pacijenta sa AD (Varonese et al., 2016; Balmuş et al., 2017). U kliničkim studijama kod pacijenta sa AD pokazan je nizak nivo magnezijuma u serumu (Lemke, 1995), nizak nivo jonizujućeg slobodnog magnezijuma u plazmi koji je u korelaciji sa kognitivnim funkcijama (Barbagallo et al., 2011), te da nivo serumskog magnezijuma pokazuje povezanost sa stepenom AD (Cilliler et al., 2007), što sve ukazuje na terapijski potencijal magnezijuma.

Značajan broj studije ukazuju i na vezu između oksidativnog stresa i neurodegenerativnih bolesti (Singh et al., 2019; Chiurchiù et al., 2016), a sve je više dokaza koja ukazuje da oksidativna oštećenja biomolekula počinju još u ranim fazama AD (Lovell i Markesbery, 2007). Shodno tome, potencijal antioksidativne terapije u redukciji kognitivnih oštećenja uveliko se istražuje (Mecocci et al., 2004). Dodatno smanjenje antioksidativne aktivnosti i povećanje markera lipidne

peroksidacije u serumu pokazano je kod pacijenta sa AD i MCI, gde slične vrednosti parametara kod pacijenta sa AD i MCI ukazuju na potencijalnu ulogu oksidativnog stresa u ranim fazama razvoja AD (Padurariu et al., 2010). Pored toga oštećenje DNK se istražuje kao jedan od potencijalno važnih faktora u patologiji AD (Lin et al., 2020), gde su periferni limfociti pacijenta sa AD pokazali drugačiju kinetiku reparacije oštećenja DNK, što je praćeno komet testom (Leandro et al., 2013). U istraživanju kod pacijenta sa AD i MCI, Balmus i saradnici su pokazali povećan nivo lipidne peroksidacije, smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima i smanjen nivo magnezijuma u serumu (Balmuş et al., 2017). U skladu sa podacima iz kliničkih studija, u animalnom modelu AD kod životinja sa izazvanom AD pokazan je porast nivoa proinflammatoryh citokina i smanjenje nivoa antiinflammatoryh citokina u serumu, dok je u mozgu životinja primećen porast lipidne peroksidacije, smanjenje antoksidativnih markera i neuralnih faktora rasta – BDNF i NGF (Medhat et al., 2020). Pored ovih studija, sve više istraživanja ide u smeru potvrde da je izmenjena neurogeneza u adultnom hipokampusu jedan od ranih kritičnih događaja u toku razvoja AD (Mu i Gage, 2011). U skladu sa tim, Tobin i saradnici su pokazali da proces neurogeneze postoji i u zreлом adultnom dobu kod ljudi, i kod pacijenata sa blagim kognitivnim oštećenjima (eng. *mild cognitive impairment*, MCI) i sa Alzheimer-ovom bolešću, te da se kod pacijenata sa MCI javlja smanjenje broja neuroblasta, dok veći broj neuroblasta (DCX+PCNA+) korelira sa boljim kognitivnim skorom, što dalje ukazuje na potencijalnu vezu između adultne neurogeneze i kognicije (Tobin et al., 2019).

1.1.5. Animalni modeli učenja i pamćenja

Veliki broj animalnih modela razvijen je sa ciljem ispitivanja načina na koji se informacije skladište u procesima učenja i pamćenja, te sa ciljem ispitivanja efekata eksperimentalnih tretmana i eksperimentalnih intervencija na ove procese. Najčešće korišćene paradigme jesu učenje uslovljeno strahom, vodeni lavirint, različiti tipovi lavirinata i prepoznavanje novog objekta (Savage i Ma, 2014), međutim i veliki broj drugih testova ili izmenjenih verzija pomenutih testova mogu se naći u literaturi.

Učenje uslovljeno strahom (eng. *Fear conditioning*) koristi se za ispitivanje odbojnih memorija povezanih sa emocijama gde najčešće jedan neutralni stimulus (eng. *conditioned stimulus*), poput svetla ili zvuka, dobija negativne emocionalne osobine kada je primenjen u kombinaciji sa negativnim stimulusom (eng. *unconditioned stimulus*), npr. električnim udarom (Rodrigues et al., 2004). Stoga se ovaj test često koristi za ispitivanje promena na nivou lateralnog jedra amigdale, strukture za koju se smatra da je ključna komponenta nervnog sistema u procesima emocionalnog učenja i pamćenja (Rodrigues et al., 2004). Morisov vodeni lavirint (eng. *Morris water maze*) predstavlja jedan od najčešće korišćenih testova za ispitivanje prostorne memorije gde se voda koristi kao poluodbojan stimulus koji životinje stimuliše da traže izlaz što je brže moguće (Slutsky et al., 2010; Savage i Ma, 2014). U Morisovom vodenom lavirintu životinje prolaze kroz trening fazu, koja najčešće podrazumeva nekoliko dana treninga prilikom kojih životinje traže platformu koja se nalazi iznad vode. Nakon čega se u test fazi uklanja sama platforma i prati se koliko su vremena životinje provele u ciljnom delu bazena gde je platforma bila postavljena tokom trening faza (Slutsky et al., 2010). Međutim, u slučajevima kada se ispituje efekat tretmana ili intervencija koji utiču na podložnosti stresu, navedeni modeli vodenog lavirinta i uslovljenosti strahom nisu idealni izbor animalnog modela za ispitivanje memorije.

Različiti tipovi lavirint testova, poput T-lavirinta (eng. *T-maze*) i radijalnog lavirinta (eng. *Radial maze*), koncipirani su tako da se učenje životinja stimuliše hranom, odnosno pozitivan izbor životinja nagrađuje se hranom. Negativna strana ovih testova jeste što se u ovim testovima sa ciljem postizanja efekta pozitivnog stimulusa životinje podvrgavaju restrikcija hrane, te ovaj tip testova nije pogodan u slučajevima kada tretmani mogu da utiču na apetit same životinje.

1.1.5.1. Test prepoznavanja novog objekta

Poznata činjenica da pacovi i miševi imaju urođenu preferenciju za novim, te da mogu da prave razliku između poznatog i novog iskorišćena je za široko primenjivani test prepoznavanja novog objekta (eng. *Novel object recognition test*, NORT). Prednosti ovog testa su pre svega u činjenicama da ne zahteva obimne treninge i nije stresan za životinje, ne podrazumeva primenu hrane kao nagrade ili električne šokove kao deo trening ili test faze, što ga čini sličnim testovima prepoznavanja koji se koriste u kliničkim ispitivanjima (Dere et al., 2007; Brodziak et al., 2014). Treba napomenuti da NORT test prati memoriju jednog događaja, odnosno učenje jedne trening faze, za razliku od drugih animalnih modela koji uključuju učenje kroz više trening faza (Dere et al., 2007), uz izuzetak u studijama ispitivanja retrogradne amnezije kada se trening faza može ponavljati (Gaskin et al., 2003).

U toku izvođenja samog NORT testa (osnovni tip testa), životinjama se u prvoj fazi omogućava da istraže ili upoznaju dva identična objekta dodirivanjem ili mirisanje samih objekata, dok se u samoj test fazi jedan već poznati objekat menja novim objektom (Ennaceur i Delacour, 1988). U skladu sa urođenom preferencijom za novim, pokazano je da zdrave životinje provode više vremena istražujući novi objekat u odnosu na poznati u samoj test fazi, pri čemu ovo zavisi od vremena koje prođe između trening i test faze (Ennaceur i Delacour, 1988). U NORT testu intervali između dve faze kreću se od nekoliko minuta do 24h, kada je pokazano da zdravi pacovi ne prave razliku između novog i poznatog objekta (Bertaina-Anglade et al., 2006), te zavisno od protokola, NORT test može da se koristi za ispitivanje i anamnestičkih i promnestičkih efekata tretmana (Bertaina-Anglade et al., 2006; Ennaceur i Meliani, 1992; Ennaceur et al, 1989). NORT test široko je primenjivan i za ispitivanje deficita memorije, pa se protokoli sa kratkim intervalima, najčešće sa 10 min intervalom između faza koriste za ispitivanje deficita kratkoročne memorije, dok se protokoli sa 12h ili 24h intervalom između faza koriste za ispitivanje deficita dugoročne memorije (Wang et al., 2013; Zhou et al., 2021; Li et al., 2014). Dodatno, ponavljanjem više trening faza pokazano je da memorija prepoznavanja objekta može da traje nekoliko nedelje pa se može koristiti za ispitivanje retrogradne amnezije, kada se nakon primene tretmana čiji se efekat ispituje sprovodi test faza NORT testa (Gaskin et al., 2003). NORT test može se uspešno koristiti za ispitivanje uticaja tretmana na različite faze formiranja memorije i na samo pamćenje, gde se primenom tretmana pre ili odmah nakon test faze ispituje uticaj na konsolidaciju memorije, a primenom tretmana pre same test faze ispituje se uticaj na pozivanje memorije (Dere et al., 2007). Prilikom postavljanja NORT protokola, posebna pažnja se pored interintervala između faza, dužine trening faze i vremena praćenja životinja u test fazi, daje izboru samih objekata kako bi se izbegla urođena preferencija za oblikom ili materijalom objekta, odnosno uticaj prirode objekta na samu preferenciju za novim (Dere et al., 2007).

Veliki broj studija koje su uključivale lezije hipokampusa, sprovedene su sa ciljem reprodukcije humanog deficita prepoznavanja, međutim rezultati ovih ispitivanja su oprečni, te su samo maksimalne lezije hipokampusa pokazivale efekte na prepoznavanje objekata (Dere et

al., 2007). Postoji nekoliko studija sprovedenih na pacovima čiji su rezultati pokazali da lezije hipokampusa utiču na pojavu retrogradne amnezije, sa oprečnim podacima efekta na anterogradno prepoznavanje objekata (Gaskin et al., 2003; Mumby et al., 2005; Broadbent et al., 2010). Međutim, pokazano je da hipokampalni NMDA-R najverovatnije imaju značajnu ulogu u dugoročnoj sinaptičkoj plastičnosti i memoriji prepoznavanja (Dere et al., 2007), odnosno primena NMDA-R antagoniste pokazala je negativan uticaj na memoriju prepoznavanja pri inter-intervalu od 3h (Baker i Kim, 2002).

Pored testa prepoznavanja novog objekta, NORT testa i modifikacija osnovnog NORT testa (Slutsky et al., 2010; Li et al., 2014), urođena preferencija za novim kod životinja može se koristiti i za ispitivanje prostorne memorije (eng. *object-place recognition test*), memorije povezane sa vremenom (eng. *temporal order memory test*) i epizodne memorije (eng. *episodic-like memory task*) (Ennaceur et al., 2005; de Bruin et al., 2011; Barbosa et al., 2010; Dere et al., 2007).

1.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres, koji je kao koncept prvi put pomenut u slobodno radikalskoj teoriji starenja kod ljudi (eng. *Free radical theory of human ageing*), predstavlja disbalans između reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) i antioksidativne zaštite u korist oksidanasa (Beckman i Ames, 1998; Liu et al., 2017; Lushchak, 2014).

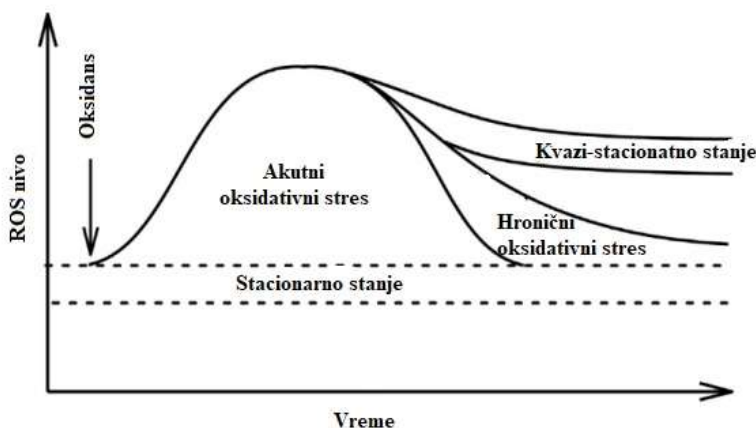
U aerobnom metabolizmu oko 90% kiseonika koji se koristi redukuje se do molekula vode, sistemom transporta elektrona na unutrašnjoj membrani mitohondrija, sistemom 4 elektrona pri čemu ne dolazi do oslobađanja ROS-a (Slika 4), a ovaj sistem spregnut je sa oksidativnom fosforilacijom i nastankom energije u vidu ATP-a (Lushchak, 2014). Mnogo manja količina kiseonika se redukuje sistemom jednog elektrona do superoksid anjona ($O_2^{\cdot-}$) koji se zatim redukuje do vodonik-peroksida (H_2O_2) što je praćeno prihvatanjem 2 protona (Slika 4) (Lushchak, 2014). Nakon toga, vodonik-peroksid se kao veoma reaktivan molekul primanjem jednog elektrona razlaže na hidroksilni anjon (OH^-) i hidroksilni radikal ($OH\cdot$). Superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$), vodonik-peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($OH\cdot$) predstavljaju reaktivne kiseonične vrste, ali iako se ROS često izjednačava sa slobodnim radikalima, treba napomenuti da su samo superoksid anjon i hidroksilni radikal slobodni radikali, odnosno imaju jedan ili više nesparenih elektrona u orbiti. Dodatno izuzev pomenutih reaktivnih kiseoničnih vrsta, ROS predstavljaju i druga jedinjenja uključujući perokside lipida, proteina i nuklearnih kiselina (Lushchak, 2014; Marrocco et al., 2017). Osim u mitohondrijalnom respiratornom ciklusu, reaktivne kiseonične vrste mogu nastati i u procesu lipidne peroksidacije, aktivacije citohrom 450 i u procesu fagocitoze od strane ćelija imunog sistema (Beckman i Ames, 1998).

ROS su veoma reaktivne vrste, slabe stabilnosti, koje mogu da reaguju sa ćelijskim biomolekulima, dok je nizak nivo ROS-a kontrolisan neenzimskom i enzimskom antioksidativnom zaštitom (Marrocco et al., 2017; Valko et al., 2007; Lushchak, 2014). Pored reaktivnih kiseoničnih vrsta i reaktivne azotne vrste (eng. *Reactive nitrogen species*, RNS) mogu da reaguju i izmene biomolekule, uključujući proteine, lipide, šećere i nukleotide. Reaktivne azotne vrste predstavljaju azot monooksid radikal ($NO\cdot$) i peroksidnitril ($ONOO\cdot$), veoma reaktivan molekul koji nastaje u reakciji azot monooksid radikal ($NO\cdot$) i superoksid anjona ($O_2^{\cdot-}$) (Beckman i Ames, 1998; Marrocco et al., 2017).

Suprotno, ukoliko antioksidativni sistem nije dovoljno efikasan, odnosno povećanje ekspresije antioksidativnih enzima ne može da vrati nivo ROS-a u normalni opseg vrednosti, nivo ROS-a ostaće povišen što je karakteristično u „hroničnom oksidativnom stresu“, pa će posledično doći do modifikacija ćelijskih molekula i narušavanja homeostaze. Pored toga, u nekim situacijama nivo ROS-a neće se uopšte vratiti u fiziološki opseg, već će se stabilizovati na novom nivou – kvazi stacionarnom nivou, što će rezultovati nizom promena u samoj homeostazi (Lushchak, 2014).

Egzogeni faktori kao što su pušenje, konzumiranje alkohola, neadekvatna ishrana, nejonska radijacija i psihološki stres mogu da dovedu do povećanja oksidativnog stresa (Moller et al., 1996). Pokazano je da je oksidativni stres uključen u patologiju kancera, neuroloških oboljenja kao što su Alzheimer-ova (AD) i Parkinsonova (PD) bolest, kadiovaskularne bolesti, dijabetes melitusa, reumatoidniog artritisa i procesa starenja (Valko et al., 2007).

Za procenu oksidativnog statusa pored nivoa pojedinačnih oksidanasa i neenzimskih antioksidansa, odnosno aktivnosti antioksidativnih enzima, najčešće se određuju i totalni oksidativni status (TOS) za procenu totalne oksidacije u organizmu, i totalni antioksidativni status (TAS) za procenu sveukupnog antioksidativnog statusa organizma (Marroco et al., 2017).

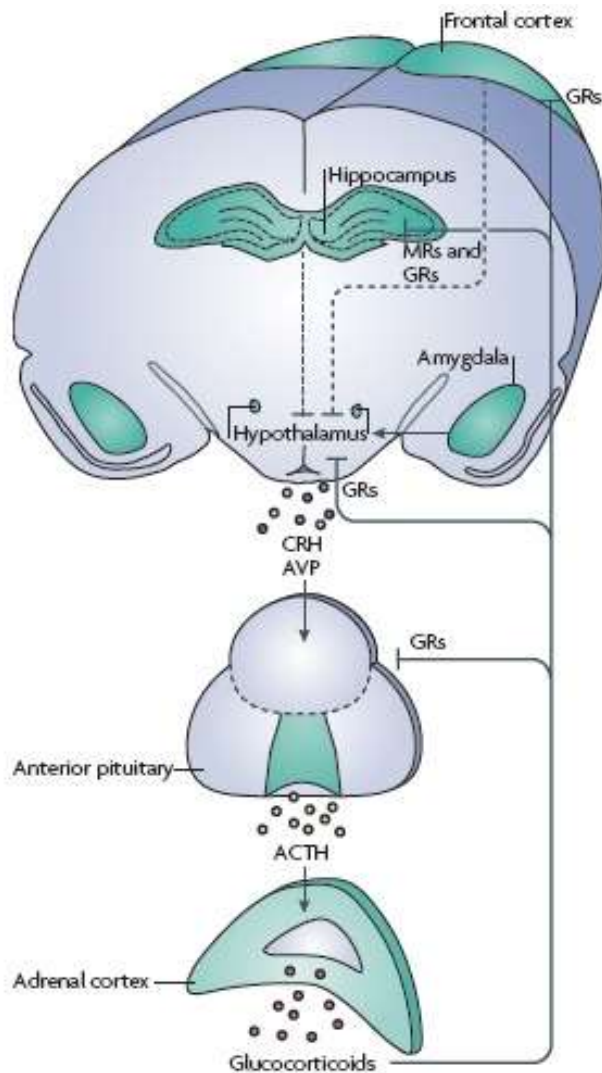


Slika 5. Promene ROS nivoa u organizmu. Stacionarno stanje predstavlja nivo ROS-a u normalnim uslovima sa određenim fiziološkim fluktuacijama. U prisustvu velike količine oksidansa nivo ROS-a može da se poveća, u akutnom i hroničnom oksidativnom stresu, koji će se pomoću antioksidativnih mehanizama vremenom vratiti u stacionarno stanje. Međutim, nivo ROS-a se u nekim situacijama neće vratiti na normalan nivo, već će se stabilizovati na novom kvazi-stacionarnom stanju (modifikovano prema referenci: Lushchak, 2014).

1.3. Hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlezda osovina

Aktiviranje osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (eng. *hypothalamus-pituitary adrenal axis*, HPA) predstavlja primarni fiziološki odgovor na fizički ili emocionalni stres, sa ciljem uspostavljanja ponovne homeostaze i povećavanja mogućnosti za preživljavanjem (Chrousos i Gold, 1992; Smith i Vale, 2006; Yegen, 2010). U uslovima stresa iz paraventrikularnog jedra (eng. *paraventricular nucleus*, PVN) hipotalamusa sintetišu se i oslobađaju kortikotropin (eng. *corticotropin releasing hormone*, CRH) i arginin vazopresin, koji putem portalne cirkulacije

deluju na adenohipofizu i stimulišu lučenje adrenokortikotropnog hormona (eng. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) u sistemska cirkulaciju. ACTH potom utiče na ćelije kore nadbubrežne žlezde, gde stimuliše sintezu i lučenje glukokortikoida u cirkulaciju (Slika 6).



Slika 6. Hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (HPA) osovina i pridružene strukture – frontalni korteks i hipokampus. HPA osovina je aktivirana neuronima medijalno paracelularnog regiona paraventricularnog jedra hipotalamusa koji oslobađaju kortikotropin (CRH) i arginin vazopresin (AVP), koji pojačava efekat CRH. Adenohipofiza oslobađa adrenokortikotropni hormon (ACTH) u cirkulaciju, koji deluje na nadbubrežnu žlezdu i stimuliše oslobađanje glukokortikoida (GC). Nakon uklanjanja stimulusa, HPA osovina se vraća u početno stanje pomoću negativne povratne sprege. GC direktno utiču na hipotalamus i hipofizu, gde smanjuju oslobađanje CRH i ACTH hormona. Dodatno, GC indirektno aktivacijom receptora u hipokampusu i prefrontalnom korteksu, deluju na hipotalamus. GR – glukokortikoidni receptori, MR – mineralokortikoidni receptori (preuzeto iz reference: Lupien et al., 2009).

Smatra se da je prvu definiciju šta je to stres, postavio Hans Selye koji je naveo da „Stres predstavlja nespecifičan odgovor organizma na bilo koji zahtev” (eng. *Stress is the nonspecific response of the body to any demand*). Nakon toga, Walter Bradford Cannon je uveo pojam homeostaze, za kordinisane fiziološke procese uključene u održavanju stabilnog stanje (eng. *steady state*) i uveo pojam „bori se i beži” kao opis odgovora životinja na pretnju, koji je kasnije definisan kao odgovor pri akutnom stresu (Fink, 2010). Stres predstavlja stanje narušene homeostaze organizma ili način na koji organizam reaguje kako bi se održala homeostaza (Chrousos i Gold, 1992; Tapp et al., 2019), dok alostaza predstavlja procese kojim organizam reaguje na stresore kako bi se ponovo uspostavila homeostaza (Tapp et al., 2019). Uz napomenu da iako stres nosi negativnu konotaciju, u određenim uslovima stres može da ima pozitivan efekat, odnosno može da dovede do poboljšanja performansi organizma (Aschbecher et al., 2013).

Kao odgovor na fizičke ili emocionalne stresore, averzivne stimuluse, organizam aktivira dva sistema, hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda osovinu i simpato-adrenalni sistem. Aktivacija ovih sistema dovodi do lučenje glukokortikoida, ACTH i kateholamina u cirkulaciju, što dalje rezultuje bihejvioralnim i perifernim promenama sa ciljem ponovnog uspostavljanja homeostaze (Chrousos i Gold, 1992; Tapp et al., 2019). Aktivacijom simpato-adrenalnog sistema noradrenergički neuroni u *locus coeruleus-u* svojim projekcija deluju na srž nabubrega i dovode do oslobađanja kateholamina, adrenalina i noradrenalina iz hromafinih ćelija, čime učestvuju u brzom odgovoru na stres „bori se i beži” (Smith i Vale, 2006; Jaggi et al., 2011).

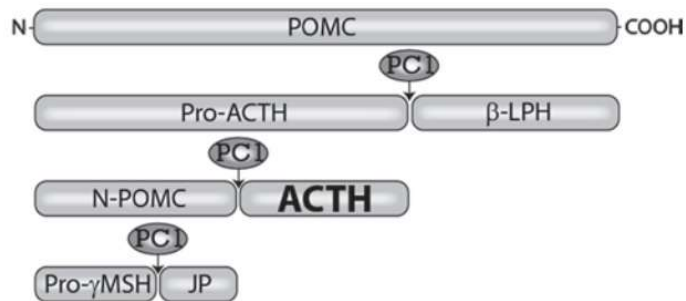
Sa ciljem ispitivanja akutnog i hroničnog stresa i potencijalne antistres terapije razvijen je niz animalnih modela, koju uključuju imobilizacijom izazvan stres, stres izazvan potapanjem životinja u hladnu vodu, stres izazvan električnim šokom, stres izazvan prisilnim plivanjem (eng. *forced swimming-induced stress*), stres izazvan lišavanjem hrane, stres izazvan neonatalnom izolacijom itd (Jaggi et al., 2011). Dodatno, animalni modeli dugoročne stimulacije HPA osovine, dugoročnom primenom kortikosterona ili ACTH hormona sve se češće koriste kao modeli hroničnog stresa i depresivnog ponašanja (Stanić et al., 2016; Petrović et al., 2018; Donner et al., 2012; Zhao et al., 2008; Du et al., 2009; Ding et al., 2018; Xie et al., 2018).

1.3.1. Kortikotropin, adrenokortikotropni hormon i glukokortikoidi

Kortikotropin (eng. *corticotropin releasing hormone*, CRH) je peptid koji se sastoji iz 41 aminokiseline (Vale et al., 1981) i koji se u odgovoru na stres oslobađa iz PVN hipotalamusa u portalnu cirkulaciju, nakon čega ostvaruje efekat na adenohipofizi. CRH je primarni regulator oslobađanja ACTH hormona iz adenohipofize u sistemsku cirkulaciju (Rivier i Vale, 1983). Svoj efekat CRH ostvaruje putem dva tipa receptora - CRH-R1 i CRH-R2 (CRH-R2 α i CRH-R2 β), G-protein receptora, čija aktivnost se ostvaruje aktivacijom adenilat-ciklaze (Potter et al., 1994; Chalmers et al., 1995; Perrin i Vale, 1999). Pored toga, kortikotropin svoj efekat na adenohipofizu najverovatnije ostvaruje posredstvom CRH-R1 receptora lociranih u više regiona mozga životinja, uključujući i anteriorni i središnji deo hipofize (Perrin i Vale, 1999).

Proopiomelanokortin (eng. *pro-opiomelanocortin*, POMC) je polipeptid visoko rasprostranjen u hipofizi, koji je prekusur za bioaktivne proteine ACTH, β -endorfin, β -lipotropni hormon i melanotropine - α -melanotropin, β -melanotropin i γ -melanotropin (Chang et al., 1980; Smith i

Vale, 2006). Pored toga što je prisutan u brojnim tkivima, sinteza i obrada proopiomelanokortina najčešće se vezuje za hipofizu i nastanak ACTH hormona (Slika 7)(Stevens i White, 2010). Adrenokortikotropni hormon, ACTH (1-39), jedini je derivat proopiomelanokortina za koji je pokazano da ostvaruje efekat na nivou nabubrežne žlezde (Paytremann et al., 1973). Niz studija ukazuje da je ekspresija proopiomelanokortinskog gena pod pozitivnom regulacijom kortikotropinom oslobođenim iz hipotalamusa, dok je negativno regulisana, negativnom povratnom spregom, sistemskim glukokortikoidima (Stevens i White, 2010). Peptidi nastali proteolizom proopiomelanokortina svoj efekat ostvaruju posredstvom melanokortinskih receptora (MCR), MC1R, MC2R, MC3R, MC4R i MC5R, za koje se vezuju različitim afinitetima (Mountjoy et al., 1992; Cooray i Clark, 2011). Ekspresija melanokortinskih receptora, afinitet fizioloških liganda za tip melanokortinskog receptora i fiziološki efekti aktivacije receptora predstavljeni su u tabeli 1. U toku aktivacija HPA osovine ACTH hormon se vezuje za MC2 receptore u zoni fascikulati nadbubrežne žlezde, nakon čega dolazi do aktivacije cAMP puta, što konačno dovodi do stimulacije steroidogeneze i povećanog oslobađanja glukokortikoida, mineralokortikoida i androgenih steroida u cirkulaciju (Paytremann et al., 1973; Smith i Vale, 2006).



Slika 7. Sinteza adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz proopiomelanokortina (POMC) u adenohipofizi. Uz pomoć enzima prohormon konvertaze 1 u adenohipofizi nastaje ACTH. PC1 - prohormon konvertaze 1; β-LPH - β-lipotropin hormon; γ-MSH - melanotropin (preuzeto iz reference: Stevens i White, 2010).

Opšte je poznato da je nadbubrežna žlezda podeljena u dve zone unutrašnji deo ili medulu, koja sintetiše kateholamine, i spoljašnji deo ili korteks koji sintetiše steroidne hormone. Korteks nadbubrežne žlezde čine tri zone: zona glomerulosa, koja sintetiše mineralokortikoide; zona fasciculata, koja sintetiše glukokortikoide i zona reticularis, koja sintetiše androgene androstendion i dihidroepiandrosteron. Steroidogeneza je stimulisana ACTH hormonom, koji posredstvom MC2 receptora utiče na mobilizaciju holesterola na unutrašnju membranu mitohondrija (Busada i Cidlowski, 2017). Glukokortikoidi, kortizol kod ljudi i kortikosteron kod glodara, pripadaju grupi steroidnih hormona i imaju ulogu u regulaciji velikog broja metaboličkih, kardiovaskularnih, imunoloških i bihevioralnih funkcija (Smith i Vale, 2006). Opšte poznata činjenica je da se glukokortikoidi oslobađaju iz kore nadbubrežne žlezde cirkadijalno, te utiču na održavanje bazalne homeostaze, dok do povećanog oslobađanja dolazi prilikom aktivacije HPA osovine, tokom fiziološkog odgovora na stres.

Tabela 1. Distribucija melanokortinskih receptora, afinitet fizioloških liganda i fiziološki efekti aktivacije receptora. MCxR – melanokortinski receptori, MSH – melanotropin, ACTH – adrenokortikotropni hormon (modifikovano prema referenci: Cooray i Clark, 2011).

Melanokortinski receptori	Ekspresija receptora	Ligand preferencija	Glavna fiziološka funkcija
MC1R	Melanociti, melanom, makrofage, mozak	$\alpha\text{MSH}=\beta\text{MSH}=\text{ACTH}<<\gamma\text{MSH}$	Pigmentacija, antiinflamatorni efekat
MC2R	Kora nadbubrežne žlezde	ACTH	Steroidogeneze
MC3R	Mozak, placenta, pankreas, stomak	$\gamma\text{MSH}=\alpha\text{MSH}=\beta\text{MSH}=\text{ACTH}$	Homeostaza energije, zapaljenje
MC4R	Mozak, kičmena moždina	$\alpha\text{MSH}=\beta\text{MSH}=\text{ACTH}>\gamma\text{MSH}$	Apetit, homeostaza energije, erekciona funkcija
MC5R	Limfociti, egzokrine žlezde	$\alpha\text{MSH}>\beta\text{MSH}=\text{ACTH}>\gamma\text{MSH}$	Sekrecija egzokrine žlezde

Svoj efekat glukokortikoidi ostvaruju vezivanjem za glukokortikoidne receptore (GR) široko rasprostranjene u mozgu i perifernim tkivima. GR prisutni su u različitim regionima mozga uključujući cerebralni korteks, srednji mozak, hipokampus i amigdale. Pokazano je međutim da starenjem broj receptora opada pre svega u hipokampusu u CA3 regionu (Sapolsky et al., 1983). U neaktivnoj formi GR predstavljaju multiproteinski kompleks lociran u citoplazmi, a nakon vezivanja glukokortikoida dolazi do disocijacije GR iz kompleksa i translokacije u jedro ćelije. Osnovni mehanizam delovanja aktiviranih GR predstavlja vezivanje GR za DNK promotorski region, deo zadužen za glukokortikoidni odgovor (eng. *Glucocorticoid response elements* – GREs), dok regulacija samih gena može biti pozitivna ili negativna (Bamberger et al., 1996; Chamanderi et al., 2005). Drugi mehanizam delovanja GR je nezavisan od GRE vezivanja i predstavlja protein-protein interakciju sa drugim transkripcionim faktorima (Bamberger et al., 1996; Chamanderi et al., 2005; Heitzer et al., 2007). Pored toga, glukokortikoidi svoj efekat ostvaruju i vezivanjem za mineralokortikoidne receptore koji imaju visoki afinitet za glukokortikoide, za razliku od GR za koje je pokazano da imaju nizak afinitet za glukokortikoide (Meijer et al., 2018). Pokazano je da je aktivacija mineralokortikoidnih receptora između ostalog i deo negativne povratne sprege koja utiče na bazalnu sekreciju glukokortikoida (Tapp et al., 2019). Dodatno, sve je više dokaza da glukokortikoidi svoj efekat ostvaruju i mehanizmom koji je različit od genomskog, negenomskim mehanizmom, a koji je uključen u pre svega rane faze odgovora u akutnom stresu, a koji još uvek nije tačno definisan (Jiang et al., 2014).

Sintetski glukokortikoidi su široko propisivani lekovi pre svega zbog antiinflamatornog i imunosupresivnog efekta, kao terapija za veliki broj bolesti, uključujući astmu, reumatoidni artritis, ulcerativni kolitis, alergijski rinitis i kao deo hemioterapijskih režima (Necela i Cidlowski, 2004). U sintetske glukokortikoidi ubrajaju se moderni GC kao što su prednizolon, budesonid i deksametazon, ali i dalje popularni hidrokortizon (Adcock i Mumby, 2017; Timmermans et al., 2019). Međutim, primena glukokortikoida praćena je velikim brojem neželjenih efekata,

uključujući neželjene efekte na kardiovaskularni, mišićno-skeletni, imunološki i endokrinološki sistem (Timmermans et al., 2019).

1.3.2. Regulacija aktivnosti hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda osovine

Aktivnost HPA osovine pod uticajem je i nervnog i endokrinog sistema, međutim jačina i dužina HPA aktivacije pre svega zavise od negativne povratne sprege glukokortikoidima (Keller-Wood i Dallman, 1984). Povišen nivo glukokortikoida u cirkulaciji koji nastaje kao odgovor na stres, dovodi do inhibicije aktivnosti HPA osovine negativnom povratnom spregom, odnosno glukokortikoidi vezivanjem za glukokortikoidne receptore deluju inhibitorno na hipotalamus i hipofizu (Slika 6)(Tapp et al., 2019; Smith i Vale, 2006). Lokalnom primenom glukokortikoida u uslovima adrenaletomije pokazan je inhibitorni efekat glukokortikoida na neuralnu aktivnost PVN putem velikog broja glukokortikoidnih receptora prisutnih u PVN hipotalamusa (Sawchenko, 1987). Dodatno, u ćelijskoj kulturi adenohipofize pokazano je da kortikosteron inhibira oslobađanje ACTH hormona (Deng et al., 2015), dok je u kliničkoj studiji pokazano da primena prednizona inhibira oslobađanje ACTH i kortizol, kao odgovor na egzogenu CRH stimulaciju, te da se inhibicija odvija na nivou adenohipofize uz najverovatnije posredovanje GR (Russell et al., 2010). Pored toga kombinacija eksperimentalnog i matematičkog modela ukazuje da u nadbubrežnoj žlezdi sinteza glukokortikoida nije linearna sa nivoom ACTH hormona, te da je moguće da sinteza glukokortikoida zavisi i od glukokortikoidima posredovane inhibicije steroidogeneze (Walker et al., 2015).

Pored toga HPA osovina regulisana je i aferentnim projekcijama iz moždanog stabla, *lamina terminalis*, extra-PVN hipotalamusa i limbičkih struktura prednjeg mozga, koje primarno utiču na ekspresiju i oslobađanje CRH (Smith i Vale, 2006). Limbičke strukture, hipokampus, prefrontalni korteks i amigdale, predstavljaju moždane strukture uključene u formiranje memorije i emocionalni odgovor, međutim uključene su i u aktivnost HPA osovine i u bihevioralni odgovor na stres (Forsay i Gysling, 2004; Smith i Vale, 2006). Limbičke strukture imaju mali broj direktnih konekcija sa PVN, te se informacije u vezi sa aktivnošću HPA osovine prenose putem neurona BNST (eng. *Bed nucleus of the stria terminalis*, BNST), hipotalamusa i moždanog stabla (Herman et al., 2005). BNST se smatraju intermitentnim neuronima koji informacije iz limbičkog i autonomnog nervnog sistema integrišu i prenose kao deo odgovora na stres do PVN (Forsay i Gysling, 2004). Štaviše, strukture limbičkog sistema ekspimiraju i glukokortikoidne i mineralokortikoidne receptore, te je sama aktivnost limbičkog sistema podložna glukokortikoidnoj regulaciji (Herman et al., 2005). *In vivo*, lezije hipokampusa dovele su do povećanja sekrecije glukokortikoida u odgovoru na stres i povećanja biosinteze CRH što ukazuje na inhibitornu ulogu hipokampusa (Herman et al., 1998). Inhibitorna uloga hipokampusa na aktivnost HPA osovine ispitivana je u nizu studija, te je elektrostimulacija hipokampusa dovela do smanjenja oslobađanja CRH iz PVN (Saphier i Feldman, 1987), dok su hipokampalne lezije dovele do hipersekrecije glukokortikoida, povećanja sekrecije ACTH i CRH, i posledično produženog odgovora na stres (Sapolsky et al., 1991; Herman et al., 1992; Herman et al., 1995). U hipokampusu se nalazi veliki broj glukokortikoidnih i mineralokortikoidnih receptora, a veliki broj studija ukazuje na ulogu upravo ovih receptora u inhibiciji HPA aktivnosti, pošto je pokazano da infuzija glukokortikoida u hipokampusu redukuje oslobađanja glukokortikoida i bazalno i tokom odgovora na stres (Jacobson i Sapolsky, 1991). Dodatno pokazano je da nedostatak

glukokortikoidnih receptora u hipokampusu dovodi do povećanja sekrecije kortikosterona, što dodatno ukazuje na to da je regulacija aktivnosti HPA osovine od strane hipokampusa zavisna od same aktivacije glukokortikoidnih receptora hipokampusa (Sapolsky et al., 1984). U skladu sa tim, smatra se da hipokampus ima značajnu ulogu u samom završetku odgovora na stres, suprotno amigdali za koju se smatra da dovodi do pojačavanja sekrecije glukokortikoida (Sapolsky et al., 1984; Jacobson i Sapolsky, 1991; Herman et al., 2005).

Moždano stablo, preciznije kateholaminski centri u moždanom stablu imaju značajnu ulogu u regulaciji aktivnosti HPA osovine. Ekscitatorni efekat kateholaminski neurona ostvaruju se preko α 1-adrenergičkih receptora, koji dovode do povećanja sekrecije CRH i povećanja aktivnosti HPA osovine. S tim u vezi brojne studije pokazale su da oštećenje kateholaminske regulacije dovodi do izostanka HPA odgovora na neke somatske i psihogene stresore (Plotsky et al., 1989). Noradrenergični sistem lociran u ponsu - *Locus coeruleus*, ima široki spektar projekcija u moždanim regionima, uključujući i projekcije u PVN hipotalamusa, gde ima značajnu ulogu u odgovoru organizma na stres, i projekcije u moždanim regionima uključenim u formiranje memorije (Wang et al., 2017; Benarroch, 2018; Gibbs et al., 2010). Značajnu ulogu u regulaciji noradrenergičkog sistema lociranog u *Locus coeruleus* imaju presinaptički autoinhibitorni receptori, podtip adrenergičkih receptora α 2A adrenergički receptori (α 2A-AR) (Wang et al., 2017). Samo odsustvo gena za α 2A-AR kod miševa dovodi do značajno izmenjene aktivnosti simpatikusnog nervnog sistema, odnosno dovodi do poremećaja presinaptičke inhibicije noradrenalinom (Altman et al., 1999). Dodatno, pokazana je pozitivna uloga glukagenu-sličnog peptid 1 (eng. *Glucogen-like peptide 1*, GLP-1) neurona u *nucleus solitarius*, koji u uslovima stresa delovanjem na PVN povećavaju oslobađanje CRH i dovode do povećanja koncentracije ACTH i kortikosterona u cirkulaciji životinja (Kinzig et al., 2003). Uloga *lamina terminalis* u aktivnosti HPA osovine jeste da prenosi informacije u vezi sa osmotskim sastavom krvi, tako što angiotenzinski neuroni deluju na PVN i povećavaju sekreciju CRH i na taj način aktiviraju HPA osovinu (Johnson et al., 1996; Plotsky et al., 1988). Dodatno HPA aktivnost regulisana je i lokalnim projekcijama u samom hipotalamus, medijalni parvocelularni region PVN regulisan je aferentnim projekcijama γ -aminobuternom kiselinom - GABA (Roland i Sawchenko, 1993; Boundaba et al., 1996).

Modulatori aktivnosti kortikotropina, te posledično i HPA osovine, jesu proteini koji vezuju kortikotropin (eng. *corticotropin-releasing hormone - binding protein*, CRH-BP) koji su visoko ekspimirani u hipofizi i koji vezivanjem za kortikotropin dovode do modulacije oslobađanja ACTH hormona. Veliki broj studija ukazuje da je ekspresija informacione RNK, stoga i sinteze CRH-BP, povećana u uslovima stresa, dok je smanjena u uslovima adrenalektomije, što ukazuje na potencijalnu ulogu CRH-BP kao regulatora HPA aktivnosti (Westphal i Seasholtz, 2006).

1.3.3. Uticaj aktivnosti HPA osovine na učenje i pamćenje

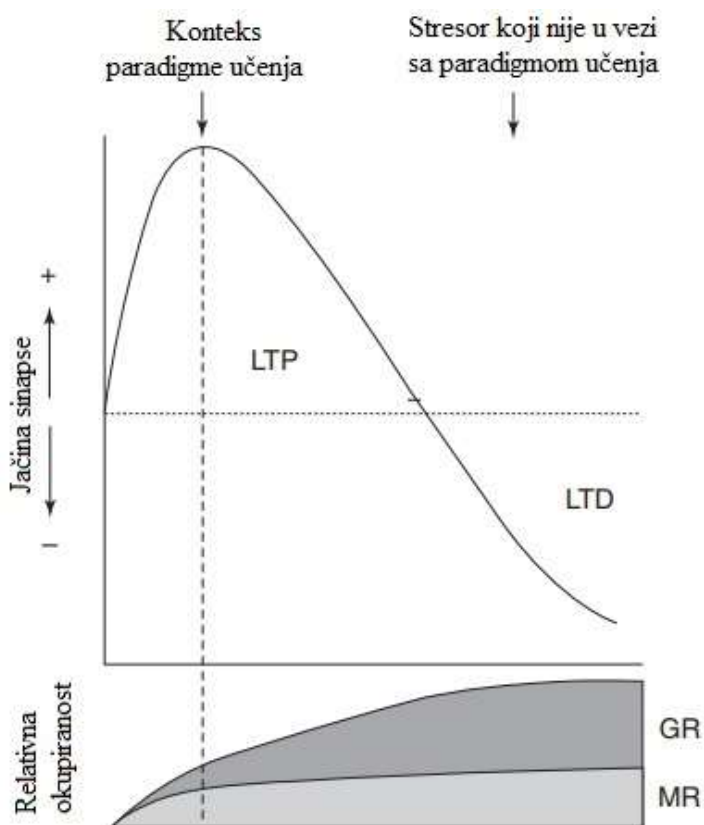
Sve veći broj istraživanja pokazuje da hronični stres i povećani nivoi ACTH hormona i adrenalnih glukokortikoida mogu potencijalno da dovedu do kognitivnih poremećaja i poremećaja ponašanja, kao što su Alzheimer-ova (AD) i Parkinsonova (PD) bolest (Vyas et al., 2016; Burtscher et al., 2019; Munshi et al., 2020). Treba naglasiti da su hipokampus, prefrontalni korteks i amigdale deo limbičkog sistema, strukture koja je važna za formiranje memorije i

emocija, koja pored toga utiče na regulaciju aktivnosti HPA osovine, te predstavljaju potencijalnu vezu između HPA osovine i neuropsihijatrijskih oboljenja (Smith i Vale, 2006).

Hipokampus, kao što je već rečeno, sadrži veliki broj glukokortikoidnih i mineralokortikoidnih receptora i učestvuje u regulaciji aktivnosti HPA osovine, međutim sve više studija ukazuje da i glukokortikoidni hormoni ostvaruju efekat na nivou hipokampusa tačnije da imaju inhibitornu ulogu u procesima neurogeneze (Wong i Herbert 2004; Tanapat et al., 2001). Efekat glukokortikoida na sve tri faze neurogeneze, proliferaciju, preživljavanje i diferencijaciju, ispitan je u brojnim studijama (Cameron i Gould, 1996; Gould et al., 1992; Wong i Herbert, 2004; Wong i Herbert, 2006). Wong i Herbert su pokazali da povećan nivo kortikosterona kod eksperimentalnih životinja dovodi do značajnog smanjenja stvaranja neurona, dok adenektomija (odstranjivanje nadbubrežne žlezde) dovodi do povećanja diferencijacije novih neurona u hipokampusu (Wong i Herbert, 2006). Pored toga pokazano je da adenektomija, odnosno uslovi bez glukokortikoida, stimuliše proliferaciju progenitorskih ćelija u *dentate gyrus* regionu, dok povećan nivo glukokortikoida suprimira proliferaciju (Cameron i Gould, 1996; Gould et al., 1992). Dodatno, visok nivo glukokortikoida smanjuje i preživljavanje progenitorskih ćelija, dok uslovi bez glukokortikoida stimulišu ovaj proces (Wong i Herbert, 2004). U skladu sa pomenutim istraživanjima, *in vitro* eksperimenti su pokazali da aplikacija glukokortikoida povećava stvaranje glija ćelija a smanjuju neurogenezu iz progenitorskih stem ćelija hipokampusa, dok blokadom GR ovaj efekat može da se prevenira (Chetty et al., 2014). Isti efekat smanjenja neurogeneze postignut je i *in vivo*, izlaganjem životinja stresu imobilizacijom i aplikacijom glukokortikoida u trajanju od 7 dana (Chetty et al., 2014). Pored toga pokazano je da dugoročni tretman kortikosteronom redukuje neurogenezu i aktivnost nezrelih neurona u ventralnom *dentate gyrus* regionu, ali da ne dovodi do značajnog smanjenja generalne aktivnosti *dentate gyrus*-a kod odraslih životinja (Workman et al., 2015). U modelu nepredviđenog blagog hroničnog stresa, kod životinja je pokazano smanjenje parametra neurogeneze i opadanje gustine GAP43 pozitivnih ćelija u CA3 regionu hipokampusa, što je koreliralo sa depresivnim ponašanjem (Zavvari et al., 2020).

Međutim, rezultati ispitivanja efekata aktivacije HPA osovine na ekspresiju BDNF proteina u hipokampusu nisu konzistentni. Smith i saradnici su pokazali da se nivo iRNK za BDNF protein u hipokampusu, pre svega u delu *dentate gyrus*, značajno smanjuje već nakon jednog sata kod pacova podvrgnutih stresu imobilizacije, što je potvrđeno i primenom visokih doza kortikosterona (Smith et al., 1995). Dodatno, izolacije u adolescentnom periodu kod životinja dovodi do promena u ekspresiji BDNF proteina u različitim moždanim regionima (Meng et al., 2011). Međutim, efekat dugoročne aktivacije HPA osovine primenom ACTH hormona u trajanju od 21 dan na nivo BDNF proteina u hipokampusu je izostao (Petrović et al., 2018).

U mnogobrojnim studijama pokazano je da glukokortikoidi utiču na formiranje memorije, odnosno da utiču na dugoročnu potencijaciju i dugoročnu depresiju, i da se uticaj može objasniti obrnutom U krivom ili zvono krivom (Slika 8) (de Kloet et al., 1999; Lupien et al., 2007). Smatra se da optimalna LTP zahteva blago povišen nivo glukokortikoida, odnosno aktivaciju mineralokortikoidnih receptora i nekih glukokortikoidnih receptora, gde se aktivacija mineralokortikoidnih receptora smatra preduslovom za LTP (de Kloet et al., 1999). Suprotno, u uslovima jako povišenog nivoa glukokortikoida dolazi do aktivacije svih mineralokortikoidnih i svih glukokortikoidnih receptora, odnosno dolazi do snažne LTD, uz negativan uticaj na LTP (de Kloet et al., 1999).



Slika 8. Jačina sinapse i okupiranost glukokortikoidnih (GR) i mineralokortikoidnih (MR) receptori. LTP - dugoročna potencijacija; LTD - dugoročna depresija (modifikovano prema referenci: de Kloet et al., 1999).

U prekliničkim studijama ispitivan je efekat aktivacije HPA osovine u standardnim animalnim modelima za ispitivanje memorije. Baker i Kim su pokazali da stres utiče na memoriju prepoznavanja, odnosno da dovodi do reverzibilnog oštećenja dugoročne memorije (Baker i Kim, 2002), dok su Sato i saradnici pokazali da tretman kortikosteronom u trajanju od 14 dana dovodi do oksidativnih oštećenja u hipokampusu i do postepenog oštećenja memorije (Sato et al., 2010). Ispitivanja efekata ACTH analoga na učenje i pamćenje u različitim animalnim modelima ukazuju i na potencijalne pozitivne efekte ovog neuropeptida. U ispitivanju koje su sproveli Hock i saradnici, aplikacija ACTH₍₄₋₉₎ analoga dovela je do smanjenja anamnestičkog efekta elektrokonvulzivnog šoka posle trening faze i primene skopolamina pre trening faze u testu pasivnog izbegavanja (eng. *passive avoidance test*). Nadalje, došlo je do poboljšanja performanse u testu aktivnog izbegavanja i u kružnom lavirintu (eng. *radial maze test*), što ukazuje na poboljšanje retencije memorije kod miševa i pacova (Hock et al., 1988). Dodatno, ispitivanje efekata dva ACTH₍₄₋₉₎ analoga ukazuje i na pozitivan efekat na skladištenja olfaktornih informacija (Roman et al., 1989). Antianamnestički efekat još jednog ACTH analoga, ACTH₍₄₋₇₎, dobijen je i nakon ishemijskih lezija u prefrontalnom korteksu ispitivano Morisovim vodenim lavirintom (Silachev et al., 2009).

1.3.4. Hiperaktivnost HPA osovine i oksidativna oštećenja biomolekula

Glukokortikoidni hormoni oslobođeni u stresnim uslovima povećavaju nivo glukoze u cirkulaciji putem stimulacije glukoneogeneze, glikogenolize i lipolize, a ovo povećanje metabolizma indirektno može da dovode do povećanog stvaranja ROS-a (Spiers et al., 2014; Teague et al., 2007). Stoga ne čudi zainteresovanost istraživačkih timova za ispitivanja povezanosti između aktivnosti HPA osovine i oksidativnih oštećenja biomolekula.

Rezultati *in vitro* studije pokazuju da je mitohondrijalna funkcija uključujući mitohondrijalnu oksidaciju, mitohondrijalni membranski potencijal i kapacitet za zadržavanjem kalcijuma, regulisana dugoročnim tretmanom kortikosteronom (Du et al., 2009). Pored toga *in vitro* studija pokazala je da hormoni stresa kortizol, adrenalin i noradrenalin mogu da dovedu do oštećenja DNK, da mogu da utiču na reparaciju DNK i da mogu da doprinesu ćelijskoj transformaciji (Flint et al., 2007). U prekliničkim studijama pokazano je da stres može da dovede do oksidativnih oštećenja DNK u moždanim regionima hipokampusu, amigdale i prefrontalnom korteksu (Consiglio et al., 2010). Stres imobilizacijom kod životinja, pored oksidativnih DNK oštećenja u moždanim regionima, doveo je i do povećanja lipidne peroksidacije i oksidacije proteina u moždanim regionima, plazmi i jetri (Liu et al., 1996). U kliničkim ispitivanjima hroničnih psihopatoloških stanja pokazana je veza između parametara oksidativnih oštećenja DNK i nivoa kortizola (Aschbacher et al., 2013; Joergensen et al., 2011), dok je veza između oksidativnih oštećenja DNK i HPA aktivnosti pokazana i u studiji velikih razmera (Black et al., 2017). Navedeni rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu oksidativnog stresa u genotoksičnom efektu glukokortikoida (Bali et al., 1990; Singh et al., 1994; Flint et al., 2007).

U prekliničkoj studiji pokazano je da egzogena primena kortikosterona u trajanju od 21 dan, kao i stres izazvan ograničenjem (eng. *restraint stress*) povećavaju oksidativni stres u moždanom tkivu životinja, odnosno dolazi do smanjenja nivoa enzimske i neenzimske antioksidativne zaštite, i dolazi do povećanja lipidne peroksidacije i oksidacije proteina (Zafir i Banu, 2009). Pored toga, pokazano je da dugoročni tretman kortikosteronom smanjuje kapacitet DNK molekula u perifernim limfocitima da se *in vitro* suprotstave visokoreaktivnom oksidativnom agensu, da dovodi do smanjenja antioksidativne aktivnosti u plazmi pacova, bez efekta na lipidnu peroksidaciju (Stanić et al., 2016). Dodatno pokazano je da je ACTH hormonom indukovana hipertenzija povezana sa povećanim oksidativnim stresom, koji reaguje na antoksidativni tretman tempolom, dok vitamin C i vitamin E nemaju efekat na ovu promenu (Zhang et al., 2003; Schyvens et al., 2007).

U skladu sa navedenim, može se očekivati da hronična aktivacija HPA osovine i posledično oslobađanje glukokortikoida mogu da dovedu do štetnih uticaja na biomolekule, što je verovatno povezano sa stvaranjem ROS-a.

1.3.5. Eksperimentalni modeli zasnovani na primeni ACTH

U poslednje tri decenije primenom ACTH hormona razvijen je model hroničkog stresa i depresije. Prve studije ispitivanja efekata primene ACTH tretmana kod Wistar pacova pokazale su da i akutna i hronična primena ACTH hormona dovode do povećanja krvnog pritiska i nivoa kortikosterona u plazmi pacova (Gamallo et al., 1988; Gamallo et al., 1992). Promene su bile kompatibilne sa promenama koje su primećene kod životinja izloženih stresu akutne i hronične

buke (Gamallo et al., 1988; Gamallo et al., 1992), što je ukazalo da ACTH primena imitira fiziološki stres. Štaviše ponovljena primena ACTH hormona je kasnije validirana kao preklinički model depresije rezistentne na antidepresive kod pacova u testu forsiranog plivanja (eng. *forced swimming-induced stress*, FST) (Kitamura et al., 2002).

1.4. Magnezijum

Magnezijum (Mg) je drugi najzastupljeniji intracelularni katjon koji je uključen u skoro sve anaboličke i kataboličke reakcije, kao kofaktor u preko 300 enzimskih reakcija. Važnost uloge magnezijuma ogleda se i u činjenici da je magnezijum uključen u sve reakcije formiranja i potrošnje adenozin-trifosfata (ATP). Pored toga magnezijum ima fiziološki fundamentalnu ulogu u regulaciji strukture, propustljivosti i integriteta ćelijske membrane, aktiviranju sinteze fosfolipida membrane, u regulaciji ćelijskog rasta i reprodukciji, kao i u u transportu i akumulaciji kalcijuma (Ścibior, 2016; Hartwig, 2001). Dodatno, Mg utiče i na metabolizam ugljenih hidrata i lipida, ima ulogu u transportu glukoze u skeletne mišiće, jetru i masno tkivo, utiče na glukozni transporter 4 i tirozin kinaze povezane sa insulinskim receptorima (Ścibior, 2016). Pokazano je da pored uloge u enzimskim reakcijama uključenim u obradu DNK, DNK replikaciji i reparaciji, Mg utiče i na stabilnost DNK i hromatina, odnosno ima ulogu u održavanju genomske stabilnosti (Hartwig, 2001). Kako magnezijum ima ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa i apoptoze, intracelularna koncentracija magnezijuma je veoma dobro regulisana.

Uzimajući u obzir važnost uloge magnezijuma u fiziološkim procesima i patološkim stanjima zabrinjavajući su podaci iz epidemioloških studija sprovedenih u zapadnoj Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama, a koje su pokazale da je unos magnezijuma u populaciji daleko ispod preporučenog dnevnog unosa, odnosno da hrana koja se konzumira ima nizak sadržaj magnezijuma u proseku između 30% i 50% preporučenog dnevnog unosa (Grober et al., 2015; Costello et al., 2016). Preporučeni dnevni unos magnezijuma po američkom vodiču za ishranu je bliže definisan u zavisnosti od pola i godina (Dietary Guidelines for Americans, 2015-2020) i u skladu je sa informacijama dostupnim od strane američkog Nacionalnog instituta za zdravlje za 2021.godinu (eng. *National Institutes of Health*)(Tabela 2).

Uzimajući u obzir ulogu magnezijuma u neurotransmisiji, veliki broj istraživanja sprovodi se kako bi se ispitali potencijalno pozitivni efekti magnezijuma, uključujući i ispitivanja neuroloških bolesti kao što su migrena, depresija, hronični bol, anksioznost, moždani udar, AD i PD (Kirkland et al., 2018; Petrović et al., 2018; Singewald et al., 2004; Li et al., 2014). U prekliničkoj studiji Petrović i saradnici pokazali su da suplementacija magnezijumom u trajanju od četiri nedelje poništava stanje očaja u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive (Petrović et al., 2018). U skladu sa ovim rezultatima, miševi hranjeni dijetom sa smanjenim unosom magnezijuma pokazali su depresivno i anksiozno ponašanje u bihevioralnim testovima, a efekti su bili reverzibilni primenom antidepresiva i anksiolitika (Singewald et al., 2004). Pored toga Li i saradnici su pokazali protektivni efekat magnezijuma na sinapse u modelu AD kod miševa (Li et al., 2014), što je u skladu sa rezultatima iz sistemskog pregleda gde je predstavljeno da je kod većine pacijenta sa AD smanjen nivo magnezijuma u cerebrospinalnoj tečnosti (Varonese et al., 2016). U kliničkim studijama sprovedenim na zdravim dobrovoljcima pokazano je da oralna suplementacija Mg može da smanji efekte hiperaktivnosti HPA osovine (Zogović et al., 2014; Dmitrašinović et al., 2016). Pokazano je da četvoronedeljna suplementacija Mg smanjuje aktivnost HPA osovine kod studenata, pre svega smanjenjem kortizola i posledično

IL-6 (Zogović et al., 2014), što je pokazano i kod rekreativnih sportista (Dmitrašinović et al., 2016). Pored toga, suprimiranje hiperaktivnosti HPA osovine doprinelo je i potencijalnom antidepressivnom efektu Mg kod životinja koje su tretirane ACTH hormonom (Petrović et al., 2018).

Tabela 2. Preporučeni dnevni unos magnezijuma u miligramima (mg) po američkom vodiču za ishranu (modifikovano po referenci: Dietary Guidelines for Americans, 2015-2020).

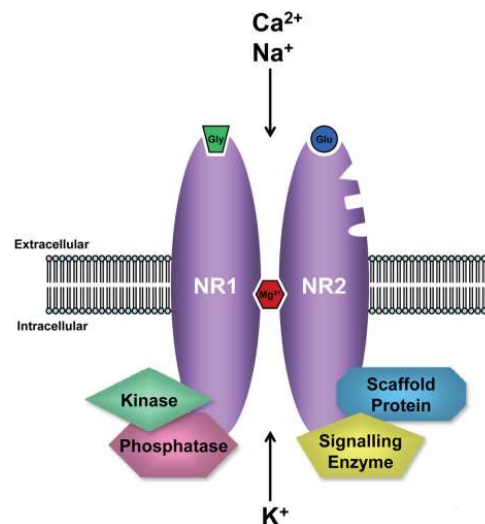
Uzrast	Pol	Ženski	Muški
Deca: 1-3 godine		80 mg	80 mg
Deca: 4-8 godine		130 mg	130 mg
Deca: 9-13 godine		240 mg	240 mg
14-18 godina		360 mg	410 mg
>18 godina		310 – 320 mg	400 - 420 mg

1.4.1. Uloga magnezijuma u učenju i pamćenju

Magnezijum kao alosterni modulator NMDA receptora neophodan je za regularnu aktivnost ovog receptora, što ukazuju na značajnu ulogu magnezijum jona u modulaciji neuralne aktivnosti (Vargas-Caballero i Robinson, 2004; Ruppertsberg et al., 1994). Kako su NMDA receptori uključeni u dugoročnu potencijaciju i sinaptičku plastičnost, može se pretpostaviti da je uloga magnezijuma u značajnoj meri povezana sa kognitivnim procesima. Nedostatak magnezijumom posredovane blokade NMDA receptora, dovodi do preterane depolarizacije i ekcitatokstičnosti što potencijalno može da dovede do AD i drugih neurodegenerativnih poremećaja koji uključuju gubitak memorije (Zhang et al., 2016). Do sada je u prekliničkim studijama terapijskih efekata magnezijuma najviše ispitivane sa ciljem umanjivanja samog memorijskog deficita nastalog starenjem ili usled traumatskih povreda mozga (Billard, 2006; Sen i Gulati, 2010; Hoane, 2007).

Glutamat kao glavni ekscitatorni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu svoj efekat ostvaruje preko metabotropnih i jonotropnih receptora, NMDA-R (N-metil-D-aspartat receptor), AMPA-R (α -amino-3-hidroksi-5-metilizoksazolpropionat receptor) i kainatnih receptora, na presinaptičkoj i postsinaptičkoj membrani. NMDA receptor je heterotetramerni proteinski kompleks koji se sastoji iz više subjedinica najčešće NR1 i NR2 subjedinica, dok se NR3 subjedinica ređe javlja (Slika 9). Proteinski kompleks gradi jonski kanal koji je propustljiv za jednovalentne i dvovalentne katjone, pre svega kalcijum, natrijum i kalijum. Specifičnost ovog receptora je u tome što se aktivira vezivanjem dva molekula, i to agonistima receptora

glutamatom (mesto vezivanja na NR2 subjedinici) i glicinom (mesto vezivanja na NR1 subjedinici). Pored toga pokazano je da se D-serin takođe vezuje za glicinskom mesto vezivanja, te da je bar podjednako potentan kao glicin (Kalia et al., 2008). Međutim i pored visokog afiniteta za glutamat, individualni ekscitatorni input ne dovodi do aktiviranja NMDA-R i otvaranja kanala, pre svega zbog voltažno zavisne blokade receptora magnezijumom (Nowak et al., 1984). Pri normalnoj polarizaciji ćelija ekstracelularni Mg jon snažno se vezuje za mesto unutar samog kanala i dovodi do blokiranja kanal (Slika 9), dok prilikom depolarizacije dovoljnog intenziteta Mg napušta vezujuće mesto u samom NMDA-R, oslobađa se pora kanala i omogućava se prolazak jona (Kalia et al., 2008). Sve ovo ukazuje da je za maksimalnu aktivnost ekscitatorne glutamatergičke sinapse, pored oslobađanja glutamata iz presinaptičkog završetka neophodna i dovoljno jaka depolarizacije postsinaptičke membrane koja će rezultovati disocijacijom Mg i otvaranjem kanala. Stoga, u centralnom nervnom sistemu magnezijum kao alosterni modulator pokazuje supresivan efekat na glutamatergičku neurotransmisiju, voltažno zavisnom blokadom NMDA-R. Pri niskim nivoima ekstracelularnog magnezijuma u centralnom nervnom sistemu blokada NMDA-R izostaje i dolazi do hiperekscitabilnosti NMDA-R, povećane propustljivosti jonotropnog kanala i produženog ulaska katjona, pre svega kalcijuma, i produžene depolarizacije. Na ovaj način pospešuje se kalcijumom-izazvana ekscitotoksičnost, što se može povezati sa razvojem AD i drugih neurodegenerativnih poremećaja (de Baaij et al., 2015; Zhang et al., 2016). Dodatno, povećan nivo intracelularnog kalcijuma u neuronima može da dovede do povećanog stvaranja ROS-a i do ćelijske smrti (de Baaij et al., 2015).



Slika 9. NMDA receptor i mesta vezivanja za glutamat, glicin i magnezijum. NMDA receptor se sastoji iz NR1 i NR2 subjedinica, koje formiraju jonski kanal za kalijum, natrijum i kalcijum. Agonisti NMDA-R su glicin (Gly) – vezujuće mesto na NR1 subjedinica i glutamat (Glu) – vezujuće mesto na NR2 subjedinica, dok je magnezijum (Mg) alosterni modulator. Intracelularni targeti same aktivacije receptora uključuju kinaze, fosfataze, druge enzime i proteini (eng. *scaffold proteins*). K⁺ - kalijum; Ca²⁺ - kalcijum; Na⁺ - natrijum (modifikovano po referenci: Kalia et al., 2008).

NMDA receptori su esencijalni za ekscitatornu sinaptičku transmisiju i sinaptičku plastičnost, dugoročnu potencijaciju i dugoročnu depresiju i sve je više dokaza o njihovoj ulozi u procesima učenja i pamćenja (Paoletti et al., 2013; Zhang et al., 2016; Blanke i VanDongen, 2009). Veliki broj prekliničkih istraživanja spoveden je kako bi se definisala uloga NMDA receptora u memoriji prepoznavanja u tri ključna moždana regiona, hipokampusu, peririnalnom korteksu i medijalnom prefrontalnom korteksu, sa oprečnim rezultatima o ulozi pojediničanih regiona u prepoznavanju objekta, mesta i povezanosti objekata i mesta, odnosno ulozi u formiranju dugoročne i kratkoročne memorije (Warburton et al., 2013). Međutim, pokazano je da učenje u okviru NORT testa dovodi do povećanja jačine sinapsi u samom hipokampusu, što je potvrđeno i elektrofiziološkim testovima, te da su NMDA-R uključeni u adaptivni proces (Clarke et al., 2010). Dodatno, uloga NMDA-R posredovane LTP u učenju potvrđeno je smanjenjem LTP i oštećenjem prostornog učenja primenom NMDA-R antagoniste i genetskom izmenom NMDA-R u hipokampusu (Morris et al., 1986; Sakimura et al., 1995).

Pregledom literature može se naći veliki broj studija koje se bave ispitivanjima upravo efekata nedostatka magnezijuma ili suplementacije magnezijuma na memoriju životinja. U prekliničkim studijama najviše je ispitivan efekat magnezijuma u nosintetisanom formi magnezijum-L-treonata (MgT). Slutski i saradnici su pokazali da hronična suplementacija magnezijumom u formi MgT dovodi do značajnog povećanja koncentracije magnezijuma u mozgu, što je uticalo na poboljšanje učenja i memorije (Slutsky et al., 2010). MgT tretman u trajanju od meseca dana doveo je do poboljšanja parametara kratkoročne i dugoročne memorije, ispitivano kod mladih i starih životinja (Slutsky et al., 2010). Dodatno, MgT tretman je doveo do povećanja sinaptičke gustine u hipokampusu, ushodne regulacije NMDA-R i povećanja sinaptičke plastičnosti, kao i do povećanja nivoa BDNF proteina (Slutsky et al., 2010). Štaviše ovi rezultati su u skladu sa *in vitro* rezultatima koji su pokazali da povećanje koncentracije magnezijuma dovodi do povećanja sinaptičke plastičnosti u kulturi ćelija hipokampalnih neurona, te ukazali da je magnezijum pozitivni regulator sinaptičke plastičnosti (Slutsky et al., 2004). Wang i saradnici su pokazali da tretman magnezijumom u trajanju od dve nedelje može da prevenira i obnovi deficit kratkoročne memorije i dugoročne potencijacije u CA3-CA1 sinapsama hipokampusa u modelu hroničnog neuropatskog bola (Wang et al., 2013). MgT primenjivan preventivno i terapijski doveo je do inhibicije prekomerne ekspresije TNF- α , pro-inflamatornog citokina koji je ushodno regulisan u modelu neuropatskog bola. Nadalje, MgT pokazao je efekat na NMDA-R, gde je smanjio negativni efekat neuropatskog bola na NMDA receptorima posredovanu struju (Wang et al., 2013). U skladu sa ovim rezultatima, Zhao i saradnici su pokazali da deficit memorije izazvan antikancerskim lekom oksaliplatinom, koji je povezan sa ushodnom regulacijom TNF- α i aktivne forme nuklearnog faktora kapa B (eng. *nuclear factor kappa-B*, NF- κ B) i deficitom magnezijuma, može da se prevenira suplementacijom magnezijumom (Zhou et al., 2021). Desetodnevni tretman magnezijumom doveo je do anuliranja efekta antikancerske terapije na indeks prepoznavanja u NORT testu kratkoročne memorije, kao i do anuliranja efekta na nivo TNF- α i aktivne forme NF- κ B u hipokampusu i medijalnom prefrontalnom korteksu kod životinja tretiranih antikancerskom terapijom u kombinaciji sa MgT (Zhou et al., 2021). Interesantno je da desetodnevni tretman MgT nije imao efekta na indeksa prepoznavanja u NORT testu u odnosu na kontrolnu grupu (Zhou et al., 2021). Dodatno, u prekliničkoj studiji sa ciljem ispitivanja memorije straha pokazano je da hronični tretman MgT deluje na nivou prefrontalnog korteksa, te da dovodi do povećanja NMDA-R signalnog puta, ekspresije BDNF proteina, gustine presinaptičkih punktova i sinaptičke plastičnosti u prefrontalnom korteksu (Abumaria et al., 2011). Pored toga, Sadir i saradnici su pokazali pozitivan efekat dugoročnog tretmana MgT na retenciju memorije u uzdignutom plus

lavirintu (eng. *Elevated plus maze*, EPM), međutim i tretmani sa $MgCl_2$ i $MgSO_4$ su pokazali trend ka povećanju retencije memorije (Sadir et al., 2019).

Interesantno je da je potencijalno pozitivan efekat suplementacije magnezijumom ispitivan i u animalnim modelima AD. Xu i saradnici su pokazali da u streptozotocin modelu AD, najčešćem obliku demencije koju između ostalog karakteriše progresivan gubitak neurona i sinapsi, dolazi do opadanja nivoa magnezijuma u hipokampusu i dolazi do oštećenja učenja i pamćenja (Xu et al., 2014). U istom eksperimentu *i.p.* administracija magnezijuma u vidu $MgSO_4$ u trajanju od 7 dana dovela je do povećanja koncentracije magnezijuma u mozgu, zaštitila je kapacitete za učenje i pamćenje, smanjila je efekat AD na LTP, abnormalnosti dendrita i sinaptičke proteine (Xu et al., 2014). Pored toga, u transgenom mišjem modelu AD pokazano je da je *per os* tretman MgT sinaptoprotektivan, odnosno da prevenira gubitak sinapsi i opadanje memorije koje se javlja u netretiranoj grupi transgenih miševa (Li et al., 2014).

Može se zaključiti da je mnogo više ispitivan terapijski efekat magnezijuma na smanjenje deficita memorije koje je povezano sa starenjem i povredama mozga u odnosu na studije u kojima se ispituje prokognitivni efekat magnezijuma kod zdravih životinja i životinja izloženih stresu (Billard, 2006; Sen i Gulati, 2010; Hoane, 2007).

1.4.2. Magnezijum i oksidativni status

Literaturni podaci ukazuju na potencijalne antioksidativne efekte magnezijuma. Pokazano je da deficit magnezijuma stimuliše sistemsku inflamaciju, odnosno oslobađanje inflamatornih citokina, što posledično aktivira ćelije imunog sistema i dovodi do produkcije ROS-a (Weglicki et al., 1992). U *in vitro* studijama pokazano je da magnezijum ima potencijal da redukuje oksidativna oštećenja i da poveća aktivnost antioksidativnih enzima. Chen i saradnici su pokazali u studiji na kulturi ćelija koštane srži da magnezijum može da poveća aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dizmutaze i katalaze i da tako smanji oksidativna oštećenja nastala UV zračenjem, te da potencijalno redukuje UV indukovanu apoptozu ćelija (Chen et al., 2019). Suplementacija magnezijumom i selenom u kombinaciji u trajanju od osam nedelja je u studiji sprovedenoj na pacovima hranjenim visoko masnom ishranom povećala aktivnost antioksidativnih enzima u serumu, pre svega SOD enzima, i smanjila koncentracija markera lipidne peroksidacije malondialdehida (MDA) (Zhang et al., 2018). Kod životinja kojima je alokasonom izazvan dijabetes, četvonedeljna suplementacija Mg je delimično obnovila antioksidativne parametre i smanjila oksidativni stres izazvan dijabetesom, povećana je aktivnost SOD enzima, glutantion-S-transferaze i nivoa vitamina C, a smanjena je lipidna peroksidacija (Hans et al., 2003). Nasuprot ovim rezultatima, Scibior i saradnici, koji su pratili efekte suplementacije magnezijumom u trajanju od 12 nedelja na koštano tkivo pacova, pokazali su da suplementacija Mg ($MgSO_4$) smanjuje lipidnu peroksidaciju u koštanom tkivu. Pored toga suplementacija Mg smanjuje i aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid-dizmutaze, glutantion peroksidaze i glutantion reduktaze, dok nema efekat na aktivnost katalaze (Ścibior et al., 2018). Takođe, pokazano je da deficit Mg u ishrani kod eksperimentalnih životinja dovodi do povećanja oksidativnog stresa, odnosno da prilikom deficita magnezijuma u ishrani dolazi do smanjenja aktivnosti enzimskih antioksidanasa u jetri i smanjenja nivo neenzimskih antioksidanasa u plazmi, dok dolazi do povećanja lipidne peroksidacije (Chaudhary et al., 2007). Kuzniar i saradnici su takođe pokazali da deficit Mg u ishrani kod eksperimentalnih životinja dovodi do promena u antioksidativnom sistemu zaštite gde je pokazano da pored smanjene

aktivnosti antioksidativnih enzima - SOD, glutantion peroksidaze i glutantion-S-transferaze, dolazi do smanjenja i nivoa glutantiona (Kuzniar et al., 2003). Ispitivanjem efekata magnezijuma na lipidnu peroksidaciju, Sadir i saradnici su pokazali da magnezijum tretman u trajanju od 28 dana smanjuje nivo MDA enzima u mozgu životinja tretiranih magnezijumom u vidu $MgCl_2$, $MgSO_4$ i MgT (Sadir et al., 2019).

Rezultati kliničke studije pokazali su da magnezijum ima potencijal da umanjuje oksidativna oštećenja DNK u perifernim limfocitima nezavisno od stila života, ispitivano komet testom (Petrović et al., 2016), dok je nedostatak magnezijuma kod gojaznih ljudi povezan sa povećanim oksidativnim stresom (Morais et al., 2017).

2. CILJEVI RADA

Istraživanje obuhvaćeno ovom disertacijom imalo je za cilj da se ispita efekat 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 hipokampusa, regiona mozga u najvećoj meri odgovornog za formiranje memorije.

Da bi se realizovali postavljeni ciljevi istraživanje se odvijalo u dve faze:

- I. U prvoj fazi istraživanja ispitivano je na koji način akutna i dugoročna primena ACTH hormona utiču na memoriju životinja, kao i kakav je efekat suplementacije magnezijumom na učenje i pamćenje Wistar pacova. Cilj prve faze istraživanja bio je da se istraže:
 - Promene u pozivanju memorije, nakon akutno izazvanog stresa primenom ACTH hormona 30 minuta pre testa, kao i promene nakon akutne primene magnezijuma korišćenjem testa prepoznavanja novog objekta (eng. *Novel object recognition test – NORT*);
 - Promene u pozivanju memorije nakon dugotrajne primene ACTH hormona u trajanju od 21 dan, kao i da li primena magnezijuma u trajanju od 28 dana utiče na promene u učenju i pamćenju, korišćenjem testa prepoznavanja novog objekta, NORT testa;
 - Promene u koncentraciji glavnog hormona stresa kod glodara – kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja, kao i nivoa magnezijuma u mozgu eksperimentalnih životinja.
- II. U drugoj fazi istraživanja ispitivan je efekat povećane aktivnosti HPA osovine na promene u oksidativnom statusu i na molekularne promene u hipokampusu i *locus ceruleus*-u pacova, uz praćenje efekata suplementacije magnezijumom na ove parametre. Cilj druge faze istraživanja bio je da se nakon dugotrajne primene ACTH hormona i magnezijuma istraže:
 - Promene nivoa markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi životinja, korišćenjem standardnih biohemijskih metoda;
 - Step en oksidativnog oštećenja DNK molekula u perifernim limfocitima korišćenjem *Comet* testa;

- Promene u parametrima neurogeneze u hipokampusu eksperimentalnih životinja: *doublecortin* (DCX), neurotrofični faktor poreklom iz mozga (eng. *Brain-derived neurotrophic factor* - BDNF) i protein povezan sa rastom 43 (eng. *Growth-associated protein* - GAP-43);
- Promene u nivou ekspresiju alpha-2A adrenergičkih receptora (α 2A-AR) u *locus ceruleus*-u (LC).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U eksperimentalnom istraživanju korišćene su eksperimentalne životinje, pacovi Wistar soja, muškog pola, starosti 8 nedelja u trenutku preuzimanja sa farme instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije. Prosečna telesna masa životinja iznosila je 200-250 g.

Životinje su čuvane u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta pri standardnim uslovima koji su podrazumevali temperaturu od 22 ± 1 °C, relativnu vlažnost vazduhu 40% - 70% i ciklus 12h svetlo - 12h mrak, pri čemu se svetlo palilo u 06:00h. Dodatno, životinje su bile smeštene u grupama od tri do četiri životinje u kavezu od pleksiglasa (dimenzija 25 cm × 41 cm × 15 cm). Čišćenje kaveza, koje je podrazumevalo i promenu šuške, obavljano je tri puta nedeljno.

Prilikom rada sa eksperimentalnim životinjama poštovani su propisi Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, broj dozvole: 323-07-4826/2021-05. Životinje su redovno praćene od strane veterinara, praćeno je stanje kože i krzna pre svega zbog supkutane primene tretmana i konzistencija fekalija zbog tretmana magnezijumom, kao i bihejvioralni indikatori kao što su socijalna interakcija, držanje tela i hod. Sve aktivnosti i testiranja životinja odvijala su se tokom dnevne faze. Tokom samih eksperimenata nisu zabeleženi neželjeni događaji.

3.2. Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalni dizajn obuhvatao je dve faze istraživanja:

U **prvoj fazi** istraživanja ispitivan je način na koji akutni i dugoročni ACTH tretmani utiču na memoriju životinja, kao i efekat akutne i dugoročne suplementacije magnezijumom na učenje i pamćenje Wistar pacova.

U **drugoj fazi** istraživanja ispitivan je efekat povećane aktivnosti HPA osovine na molekularne promene u hipokampusu pacova i uticaj povećane aktivnosti HPA osovine na oksidativni status, uz praćenje efekata dugoročne suplementacije magnezijumom na ove parametre.

U istraživanju je uključeno 128 eksperimentalnih životinja. U prvoj fazi istraživanja uključeno je 80 eksperimentalnih životinja, a u drugoj fazi 48 eksperimentalnih životinja.

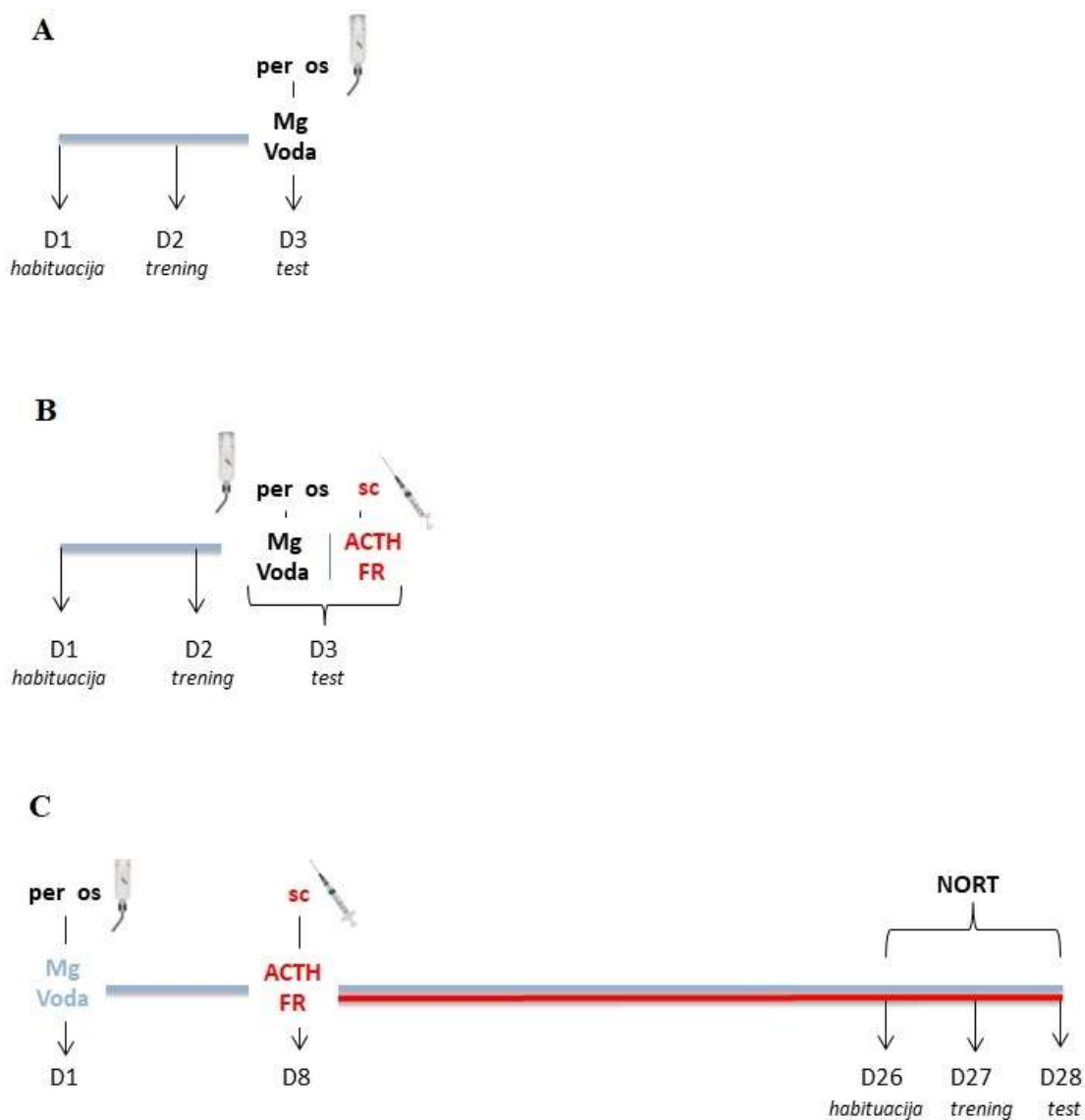
3.2.1. Eksperimentalni dizajn – prva faza istraživanja

U sklopu **prve faze** istraživanja sprovedena su 3 eksperimenata (Slika 10):

1. U prvom eksperimentu životinje su bile podeljene u dve eksperimentalne grupe (N=8, po eksperimentalnoj grupi), grupu koja je akutno primala Mg rastvoren u vodi za piće, putem

gastrične sonde u dozi od 30 mg/kg (0,5 ml na 100 g telesne težine) i kontrolnu grupu koja je primala vodu za piće na isti način (Slika 10A). Tretmani, Mg i voda za piće primenjeni su 30 minuta pre test faze NORT testa.

2. U drugom eksperimentu životinje su bile nasumično podeljene u četiri eksperimentalne grupe (N=8, po eksperimentalnoj grupi) koje su primale akutne tretmane (Slika 10B). Prva grupa životinja primala je Mg u dozi od 30 mg/kg (0,5 ml na 100g telesne težine), putem gastrične sonde, i fiziološki rastvor *s.c.* (400 μ L). Druga grupa životinja primala je akutno 10 μ g ACTH *s.c.* (10 μ g u 400 μ L fiziološkog rastvora) i vodu za piće putem gastrične sonde. Treća grupa životinja je primala akutne tretmane Mg i ACTH, dok je kontrolna grupa životinja primala fiziološki rastvor *s.c.* (400 μ L) i vodu putem gastrične sonde. Svi tretmani primenjeni su 30 minuta pre test faze NORT testa.
3. U trećem eksperimentu ispitivan je efekat dugoročnih tretmana i životinje su nasumično podeljene u četiri eksperimentalne grupe (N=8, po eksperimentalnoj grupi). Prva grupa životinja primala je Mg, rastvoren u vodi za piće (300 mg/L) u trajanju od 28 dana, druga grupa životinja primala je od osmog dana ACTH hormon *s.c.* (10 μ g u 400 μ L fiziološkog rastvora, dnevno) u trajanju od 21 dan, dok je treća grupa životinja primala kombinaciju tretmana Mg, u trajanju od 28 dana kroz vodu za piće, i od osmog dana ACTH tretman *s.c.* (10 μ g u 400 μ L fiziološkog rastvora, dnevno) u trajanju od 21 dan. Kontrolna grupa životinja primala je supkutano fiziološki rastvor (400 μ L) od osmog dana eksperimenta dok je voda za piće bila dostupna *ad libitum* (Slika 10C). Kako bi se smanjio efekat davanja same injekcije Mg grupa je od osmog dana primala *s.c.* fiziološki rastvor (400 μ L). ACTH tretirana grupa životinja je imala *ad libitum* pristup vodi. Prilikom izvođenja NORT testa, ACTH tretmani su primenjivani 3h pre habituacije, trening ili test faze ispitivanja. Po završetku NORT testa životinje su žrtvovane uvođenjem u opštu anesteziju injekcijom natrijum-tiopental (Nesdonal®, Roche, Švajcarska). U svrhu određivanja koncentracije magnezijuma u mozgu i kortikosterona u plazmi, životinjama je uzorkovana krv i izolovan je mozak.



Slika 10. Prva faza istraživanja. (A) U prvom eksperimentu životinje su bile podeljene u dve grupe, akutno Mg tretirane životinje (*per os* u dozi 30 mg/kg) i kontrolnu grupu. (B) U drugom eksperimentu životinje su bile podeljene u 4 grupe: akutno Mg tretirane životinje (*per os* u dozi 30 mg/kg), akutno ACTH tretirane životinje (*s.c.* 10 µg/400 µL fiziološkog rastvora), akutno Mg i ACTH tretirane životinje i kontrolnu grupu. (C) U trećem eksperimentu životinje su bile dugoročno tretirane i podeljene u 4 grupe: Mg tretirane životinje (300 mg/L u vodi za piće) 28 dana, ACTH (*s.c.* 10 µg/400 µL fiziološkog rastvora) tretirane životinje od osmog dana u trajanju od 21 dan, Mg i ACTH tretirane životinje i kontrolnu grupu. NORT test je izvođen po protokolu tokom tri dana: faza habituacije (dan 1), trening faza (dan 2) i test faza (dan 3). Svi akutni tretmani primenjeni su 30 minuta pre test faze NORT testa.

3.2.2. Eksperimentalni dizajn – druga faza istraživanja

U sklopu **druge faze** istraživanja ispitivan je efekat dugoročnih tretmana na:

- parametre hipokampalne neurogeneze,
- ekspresiju alpha-2A adrenergičkih receptora u *locus ceruleus*-u,
- markere oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite,
- stepen oksidativnog oštećenja DNK molekula u perifernim limfocitima.

Životinje su nasumično podeljene u četiri eksperimentalne grupe (N=12, po eksperimentalnoj grupi). Tretmani životinja bili su identični tretmanima opisanim u trećem eksperimentu prve faze istraživanja, suplementacija magnezijumom rastvorenim u vodi za piće u trajanju od 28 dana i ACTH tretman *s.c.* u trajanju od 21 dan, počevši od osmog dana eksperimenta (Slika 11):

- **Mg grupa** – Mg rastvoren u vodi za piće (300 mg/L) u trajanju od 28 dana i od osmog dana *s.c.* fiziološki rastvor u trajanju od 21 dan;
- **ACTH grupa** – ACTH (*s.c.* 10 µg u 400 µL fiziološkog rastvora, dnevno) od osmog dana u trajanju od 21 dan i voda za piće je bila dostupna *ad libitum*;
- **ACTH/Mg grupa** – ACTH (*s.c.* 10 µg u 400 µL fiziološkog rastvora, dnevno) od osmog dana u trajanju od 21 dan i Mg rastvoren u vodi za piće (300 mg/L) u trajanju od 28 dana;
- **Kontrolna grupa** – voda za piće dostupna *ad libitum* i od osmog dana *s.c.* fiziološki rastvor u trajanju od 21 dan.

Po završetku tretmana, 28-og dana eksperimenta, životinje su uvedene u anesteziju *i.p.* primenom natrijum tiopentalnom (50 mg/kg; Nesdonal®, Roche, Švajcarska). Puna krv uzorkovana je kardijačnom punkcijom i deo krvi se koristio za ispitivanje stepena oštećenja DNK molekula perifernih limfocita, a krvna plazma je korišćena za ispitivanje markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite. Iz uzoraka mozga izolovani su hipokampus i *locus ceruleus*, i od 6 nasumično odabranih životinja iz svake eksperimentalne grupe hipokampus i *locus ceruleus* su ukalupljeni u parafin za imunohistohemijsku analizu, dok su od preostalih 6 životinja hipokampusi ostavljeni na -80 °C do Western Blot analize.



Slika 11. Druga faza istraživanja - tretmani životinja. Životinje su bile podeljene u 4 grupe: Mg tretirane životinje (300 mg/L u vodi za piće) u trajanju od 28 dana, ACTH (*s.c.* 10 µg u 400 µL fiziološkog rastvora) tretirane životinje od osmog dana u trajanju od 21 dan, kombinacijom tretmana (Mg i ACTH) tretirane životinje i kontrolnu grupu životinja.

3.2.3. Supstance korišćene kao tretmani: magnezijum i ACTH analog

Magnezijum u obliku magnezijum-sulfata ($MgSO_4$), dobijen od Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, rastvaran je u vodi za piće i za akutne i za dugoročne tretmane. U eksperimentima sa akutnim tretmanima Mg^{2+} u dozi 30 mg/kg (0,5 ml na 100 g telesne težine) primenjivan je putem gastrične sonde, a kako bi se umanjio efekat načina primene na rezultate eksperimenta ostale životinje su u istom eksperimentu dobijale placebo vodu za piće putem gastrične sonde. U eksperimentima sa dugoročnim tretmanima Mg^{2+} rastvoren u vodi za piće (300 mg/L) bio je dostupan *ad libitum*. Količina konzumirane vode merena je na dnevnom nivou i prosečan dnevni unos Mg^{2+} bio je $48,6 \pm 10,1$ mg/kg.

ACTH analog tetrakosaktid-acetat (Synacthen®, Novartis Pharma AG, Bazel, Švajcarska) primenjivan je s.c. u dozi 10 μ g rastvoreno u 400 μ L fiziološkog rastvora, a kako bi se umanjio efekat načina primene na rezultate eksperimenta životinje koje nisu dobijale ACTH analog u istom eksperimentu dobijale su s.c. 400 μ L fiziološkog rastvora. Ampule Synacthen® čuvane su pod kontrolisanim uslovima u frižideru pri temperaturi 2 °C - 8 °C, a rastvori ACTH analoga su sveže pripremani pre same primene. Injekcije su primenjivani svakog dana u isto vreme (\pm 30 minuta), uz obavezno rotiranje mesta primene kod životinja kod kojih su primenjivani dugoročni tretmani.

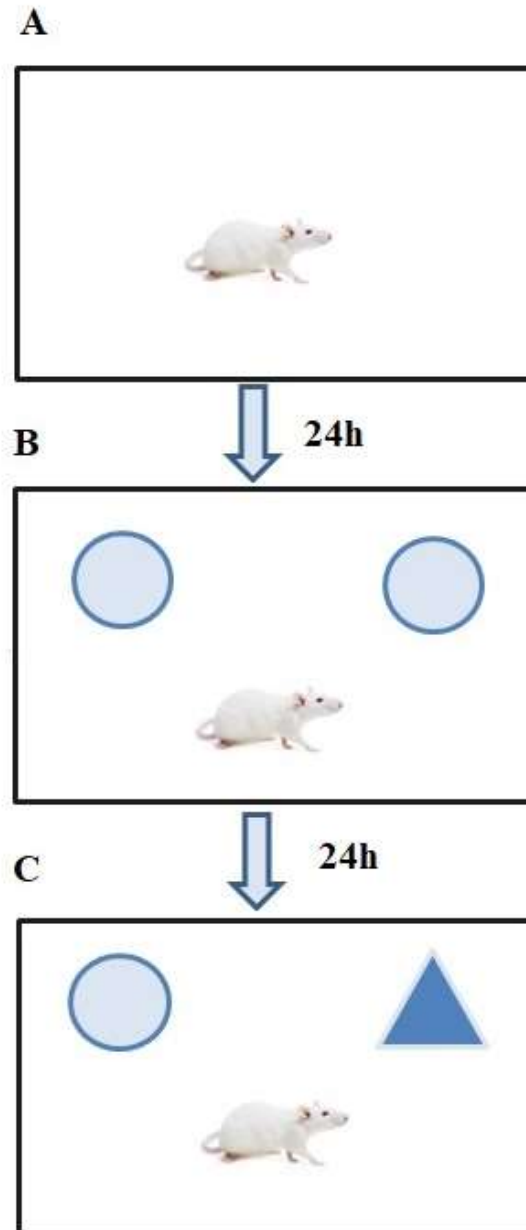
3.3. Test prepoznavanja novog objekta – NORT

Promene u dugotrajnoj memoriji eksperimentalnih životinja, ispitivanje uticaja hiperaktivnosti stres osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda, kao i potencijalno prokognitivnih efekata magnezijuma praćeno je testom prepoznavanja novog objekta (eng. *Novel object recognition test* – NORT). Poznata činjenica da pacovi i miševi imaju urođenu preferenciju za novim, te da mogu da prave razliku između poznatog i novog, iskorišćena je za test prepoznavanja novog objekta. Prednosti ovog testa su pre svega u činjenici da ne zahteva obimne treninge i nije stresan za životinje, što ga čini sličnim testovima prepoznavanja koji se koriste u kliničkim ispitivanjima (Dere et al., 2007).

3.3.1. NORT protokol

NORT protokol koji je korišćen koncipiran je tako da mogu da se ispitaju prokognitivni efekti tretmana. Naime čitav test se sastoji iz tri faze gde je interval između faza 24h (Slika 12). Prva faza, faza habituacije, obuhvata fazu prilagođavanja životinja na okolinu i aparaturu za izvođenje testa. Tokom ove faze životinje su slobodne da istražuju okolinu u trajanju od pet minuta (Slika 12A). Druga faza, trening faza, obuhvata fazu tokom koje se postavljaju dva identična objekta za istraživanje. U toku ove faze životinje su slobodne da istražuju dva identična objekta u trajanju od pet minuta (Slika 12B). Treća faza, test faza, je faza u kojoj se umesto jednog prethodno istraživanog objekta stavlja novi objekat. U toku ove faze životinje su slobodne da istražuju objekte, stari već poznati objekat i novi objekat u trajanju od pet minuta, pri čemu se prati vreme koje životinje provedu istražujući novi i već poznati objekat u test fazi (Slika 12C). U ovom protokolu ne očekuje se da kontrolne životinje zapamti trening fazu, odnosno očekuje se da kontrolna grupa životinja ne pravi razliku u istraživanju novog i već viđenog objekta u test fazi.

Sa druge strane, očekuje se da životinje koje su zapamte trening fazu, u test fazi više vremena provode istražujući novi objekat, shodno urođenoj preferenciji za novim.

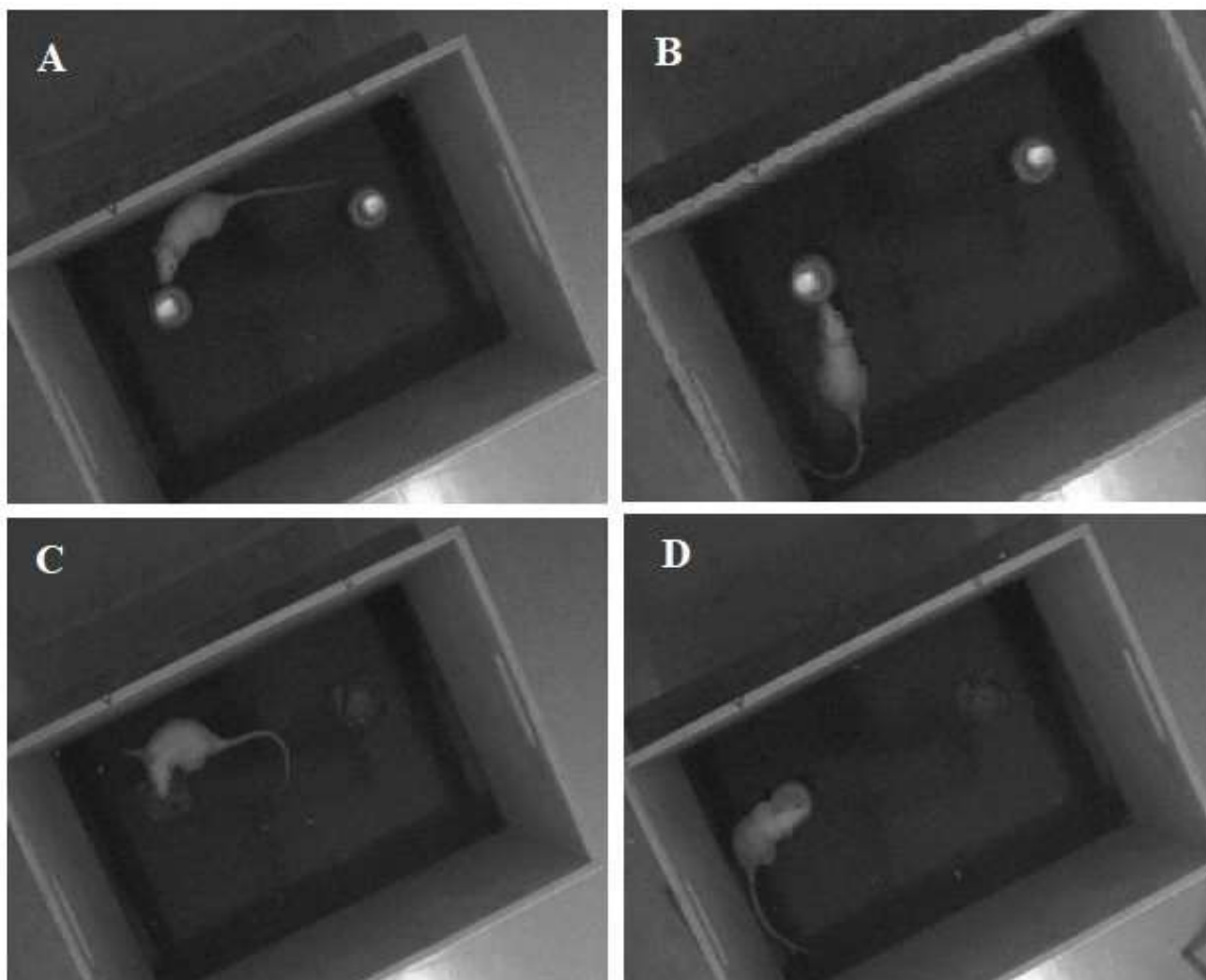


Slika 12. NORT protokol obuhvata tri faze: fazu habituacije (A), trening fazu (B) i test fazu (C); gde je interval između faza 24h. (A) Faza habituacije: životinje istražuju okolinu u trajanju od 5 minuta. (B) Trening faza, tokom koje se postavljaju dva identična objekta za istraživanje: životinje istražuju dva identična objekta u trajanju od 5 minuta. (C) Test faza, tokom koje se postavljaju jedan već istraživani objekat i jedan novi objekat za istraživanje: životinje istražuju dva objekta u trajanju od 5 minuta. U toku eksperimenta prati se vreme koje životinje provedu istražujući novi i već poznati objekat u test fazi.

Za izvođenje NORT testa korišćeno je ograđeno drveno polje dimenzija 60 cm × 40 cm × 60 cm sa crnim gumenim podom. Predmeti koji su korišćeni kao objekti bili su žuta staklena piramida (10 cm × 10 cm × 10 cm) i standardna aluminijumska konzerva (0,33 ml). Uticaj efekta urođene preferencije za određenim predmetom ili pozicijom u prostoru eliminisan je randomizacijom predmeta i pozicija unutar drvenog polja, tako što je životinjama u trening fazi nasumično određivan objekat za istraživanje, dok je u test fazi nasumično određivan položaj novog objekta (Slika 13). Olfaktorni tragovi životinja uklanjani su nakon svakog eksperimenta uz pomoć 70% etanola. Ponašanje životinja snimano je korišćenjem digitalne kamere povezane sa softverom ANY-maze (Stoelting Co, Velika Britanija), sistemom koji je podešen tako da automatski prati glavu životinja i snima koliko je vremena životinja provela u zoni objekta, a koji je virtualno podešen da obuhvata 2 cm oko samog objekta. Fizičko dodirivanje objekta i njuškanje objekta smatralo se istraživanjem objekta (Dere et al., 2007), dok se penjanje i sedenje na samom objektu nisu računali kao istraživanje (Slika 14). Životinje koje nisu istraživale objekte u ukupnom trajanju od 10 sekundi isključene su iz studije i statističke analize. U eksperimentu sa dugoročnim tretmanom NORT protokol se sprovodio tokom poslednja 3 dana tretmana.

Trening faza		Test faza	
mesto 1	mesto 2	mesto 1	mesto 2
I	I	I	II
II	II	I	II
I	I	II	I
II	II	II	I
I	I	I	II
II	II	I	II
I	I	II	I
II	II	II	I

Slika 13. NORT test: randomizacija objekata u trening fazi i randomizacija pozicije objekata u test fazi. U trening fazi naizmenično i nasumično postavljani su objekat I i objekat II. U test fazi novi objekat je nasumično postavljan na novu poziciju (mesto), što je na slici predstavljeno plavom bojom. I – objekat žuta staklena piramida; II – objekat standardna aluminijumska konzerva.



Slika 14. NORT test: primeri ponašanja životinja tokom izvođenja eksperimenta. (A i B) Njuškanje objekta od strane eksperimentalne životinje. (C) Dodirivanje objekta od strane eksperimentalne životinje. (D) Penjanje na objekat od strane eksperimentalne životinje. Fizičko dodirivanje objekta i njuškanje objekta smatrano se istraživanjem objekta, dok se penjanje i sedenje na samom objektu nisu računali kao istraživanje. Ponašanje životinja snimano je korišćenjem digitalne kamere povezane sa softverom ANY-maze (Stoelting Co, Velika Britanija).

3.3.2. NORT parametri

U NORT eksperimentima praćeni parametri koji su korišćeni za statističku analizu i evaluaciju efekata tretmana bili su vreme istraživanja poznatog (eng. *familiar object exploration time* - tf) i vreme istraživanja novog objekta (eng. *novel object exploration time* - tn) tokom test faze. Dodatno, na osnovu ovih parametara određivani su i indeks prepoznavanja (eng. *recognition index* - R index) i indeks diskriminacije (eng. *discrimination index* - D index) za dodatnu statističku analizu između eksperimentalnih grupa životinja (Wang et al., 2013; Gard et al., 2012)(Slika 15).

$$DI = \frac{tn - tf}{tn + tf} \quad \left| \quad RI = \frac{tn}{tn + tf}$$

Slika 15. NORT test: formule za izračunavanje indeksa diskriminacije i indeksa prepoznavanja u test fazi. DI - indeks diskriminacije; RI - indeks prepoznavanja; tf - vreme istraživanja poznatog objekta u test fazi; tn - vreme istraživanja novog objekta u test fazi.

3.4. Određivanje koncentracije magnezijuma u prefrontalnom korteksu mozga eksperimentalnih životinja

U trećem eksperimentu prve faze istraživanja, nakon uvođenja u anesteziju i dekapitacije, životinjama je izolovan mozak sa ciljem određivanja koncentracije magnezijuma u prefrontalnom korteksu. Prefrontalni korteks je izolovan na osnovu *Paxinos-Watson*-ovog atlasa i korišćenjem matriksa za mozak pacova (Zivic instruments, Pitsburg, SAD). Uzorci tkiva su mineralizovani koncentrovanim kiselinama analitičke čistoće HNO₃ i HClO₄ (Merck, Darmstad, Nemačka) u odnosu 4:1, a nakon mineralizacije uzorci su diluirani sa 0,1 mol/L HNO₃ i koncentracija magnezijuma je određivana plamenom atomskom apsorpcionom sprektrofotometrijom (eng. *flame atomic absorption spectrophotometry, FAAS, instrument GBC 932AA, Dandenong, Australija*). Dok su za validaciju metode korišćeni referentni uzorci nacionalnog biroa za standarde (eng. *National Bureau of Standards, NIST SRM 1577a bovine liver, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD*).

3.5. Određivanje koncentracije kortikosterona u plazmi Wistar pacova

Nivo kortikosterona u plazmi Wistar pacova određivan je korišćenjem sistema tečna hromatografija – elektrosprej jonizacija – tandem masena spektrometrija (eng. *Liquid chromatography – Electropray Ionisation - Tandem mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS*).

Puna krv životinja dobijena srčanom punkcijom, prvo je centrifugirana, nakon čega je u dobijeni supernatant dodat deksametazon kao interni standard. Ekstrakcija uzoraka, 250 µL, odrađena je na koloni čvrste faze (eng. *solid-phase column - SPE; ekstrakciona kolona: SOLA 10 mg/mL, Thermo Scientific, kat. br. 60109-001, SAD*) postavljenoj na vakum. Prekondicioniranje ekstrakcione kolone odrađeno je sa 1 ml metanola (Sigma Aldrich Co., kat. br. 34885, SAD) i 2 ml destilovane vode. Nakon nanošenja uzorka, analizirani uzorci eluirani su sa 1 ml metanola (Sigma Aldrich Co., kat. br. 34885, SAD). Kako bi dobili kalibracionu krivu u 6 tačaka (Wong et al., 1994), radni rastvori kortikosterona i deksametazona pripremani su u metanolu (500 µg/mL za kortikosteron; 10 µg/mL za deksametazon) i razblaženi su sa destilovanom vodom do finalnih koncentracija: 50 ng/mL, 100 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 750 ng/mL i 1000 ng/mL u plazmi bez kortikosterona. Za određivanje koncentracije kortikosterona korišćena je tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. *High pressure liquid chromatography, HPLC; Accela 3000, Thermo Scientific, SAD*) spregnuta sa masenim detektorom (TSQ Quantum Access Max, Thermo Scientific, SAD; radni parametri - tabela 3) pod sledećim uslovima:

- Kortikosteron: 346,96→121,04; kolizijska energija - CE = 22 V;
346,96→328,82; kolizijska energija - CE = 15 V;
- Dekametazon: 393,02→355,05; kolizijska energija - CE = 10 V.

Hromatografsko razdvajanje uzoraka rađeno je na koloni Xterra MS C18 3,5 μm , 2,1×150 mm (Waters S.A.S., kat. br. 186000408, Francuska) na temperaturi od 30 °C i pri protoku mobilne faze od 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, pri čemu je korišćena mobilna faza acetonitril (Sigma Aldrich Co., kat. br. 34967, SAD) i 0,1 % rastvor mravlje kiseline u destilovanoj vodi (50% : 50%).

Tabela 3. Radni parametri masenog detektora prilikom određivanja koncentracije kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja.

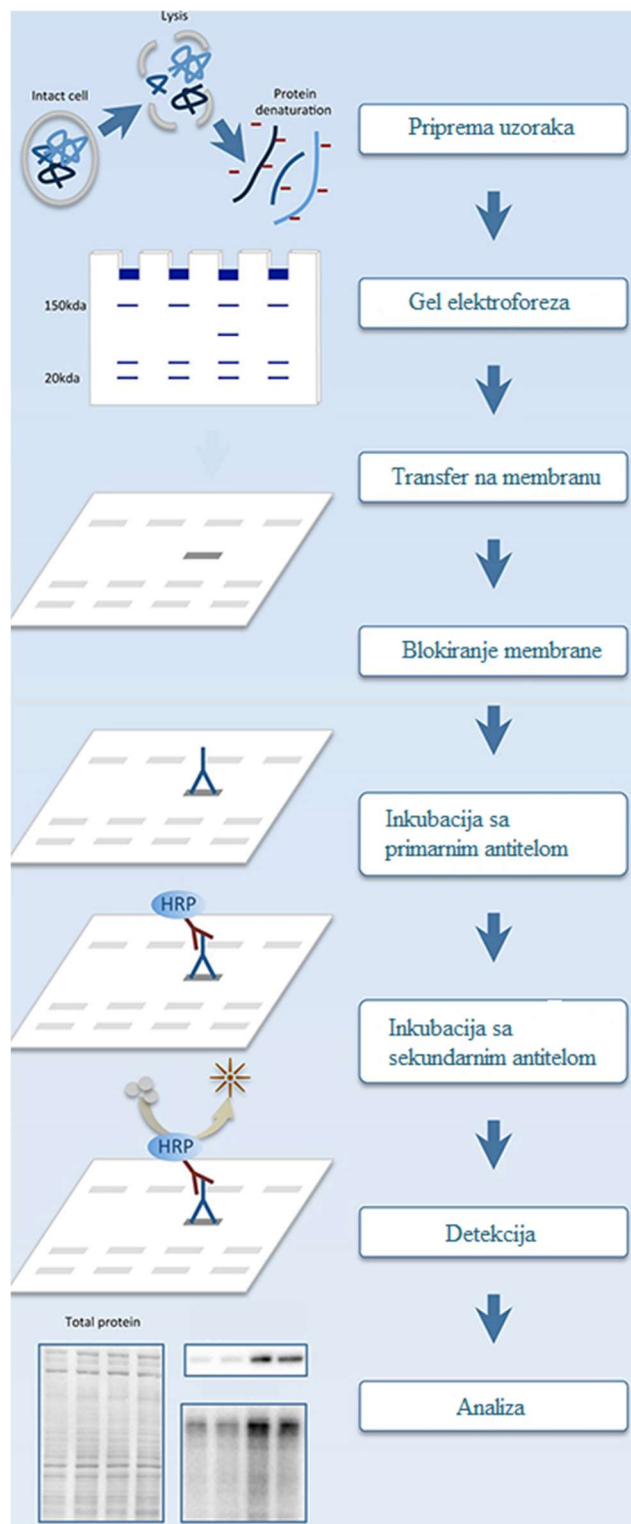
Maseni detektor – radni parametri:	
- napon spreja	4500 V
- temperatura uparivača	400 °C
- pritisak nosećeg gasa	50 j
- pritisak pomoćnog gasa	40 j
- kapilarna temperatura	300 °C.

3.6. Izolovanje i određivanje količine proteina u hipokampusu Western blot metodom

Kako bi se odredila količina neurotrofičnog faktora poreklom iz mozga (eng. *Brain derived neurotrophic factor*, BDNF) i proteina povezanog sa rastom 43 (eng. *Growth Associated Protein 43*, GAP-43) u drugoj fazi istraživanja od 6 nasumično odabranih životinja iz svake eksperimentalne grupe izolovani su hipokampusu za Western blot analizu. Western blot metoda je široko primenjivana za detekciju i analizu proteina, a sama metoda se zasniva na prenosu elektroforetski razdvojenih proteina sa gela na membranu nakon čega se proteini mogu specifično vizualizovati. Šematski prikaz Western blot metode je prikazan na slici 16.

3.6.1. Priprema tkiva hipokampusu za Western blot analizu

Nakon žrtvovanja životinja hipokampusi su izolovani i čuvani na -80 °C do Western blot analize. Tkivo hipokampusu je homogenizovano na 4 °C u 300 μL RIPA pufera (Sigma Aldrich, kat. br. R0278, SAD), gde RIPA (eng. *Radioimmunoprecipitation assay*) pufer (150 mM NaCl, 1,0% IGEPAL® CA-630, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) ima ulogu u liziranju ćelija i solubilizaciji proteina iz uzorka. Nakon homogenizacije, homogenizati su ostavljeni u frižideru na 4 °C da liziraju sat vremena, nakon čega su centrifugirani 20 minuta na 12 000 obrtaja po minuti na 4 °C. Iz izolovanog supernatanta određivana je ukupna količina proteina (Lowry et al., 1951), a kao standard je korišćen BSA (eng. *Bovine serum albumine*, BSA, Sigma Aldrich Co., kat. br. A2058, SAD) u koncentracijama 0,2-10 mg/ml. Određivanje količine proteina rađeno je u duplikatu, za svaki uzorak i standardni rastvor. Koncentracija proteina svedena je na istu - 6 mg/ml razblaživanjem sa destilovanom vodom.

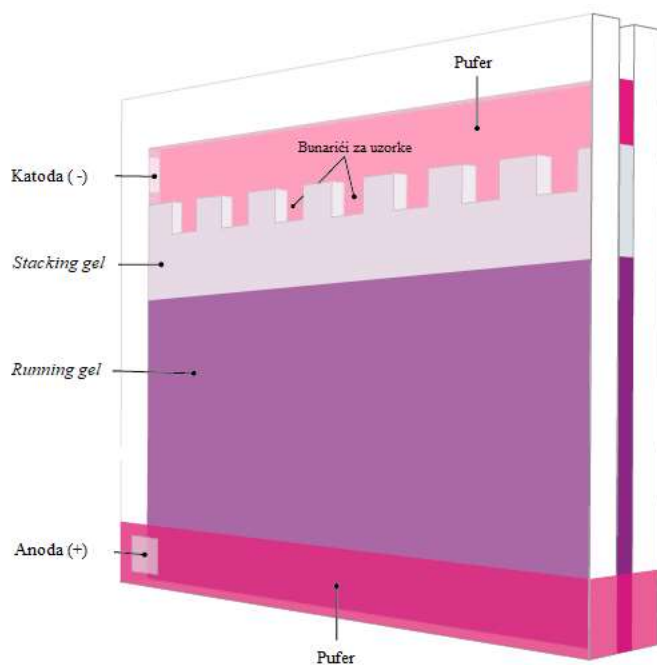


Slika 16. Šematski prikaz Western blot metode. Nakon prvog koraka, same pripreme uzoraka, uzorci se nanose na sistem za elektroforezu – SDS-PAGE, gde se proteini razdvajaju na osnovu molekulskih masa. U sledećem koraku proteini se transferuju sa gela na membranu, nakon čega se vrši blokiranje membrane, kako bi se izbeglo nespecifično vezivanje antitela. U sledećim koracima slede inkubacija prvo sa primarnim, pa sa sekundarnim antitelom i supstratom za hemiluminiscenciju, što je praćeno detekcijom i analizom dobijenih rezultata. (modifikovano prema referenci: Bass et al., 2017)

3.6.2. Natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel electrophoresis - SDS-PAGE*)

Elektroforeza obuhvata upotrebu gela za razdvajanje (eng. *Separating/running gel*) sa ciljem da se proteini razdvoje na osnovu molekulske mase u toku same elektroforeze, i gela za koncentrovanje proteina (eng. *Stacking gel*), sa ciljem da se proteini iz uzorka koncentrišu na samom početku elektroforeze (Slika 17).

Prilikom pripreme gelova prvo je pripreman gel za razdvajanje 4,5 ml 10% SDS gel (1,5 M Tris baza, Fisher scientific, kat. br. BP152-500, SAD, pH=8,8; 30% akrilamid-bisakrilamid - AA-bis, Sigma Aldrich Co., kat. br. A2917, SAD; 10% SDS, Fisher scientific, kat. br. PI28364, SAD; TEMED, Sigma Aldrich Co., kat. br. T9281, SAD; 10% amonijum persulfat – APS, Fisher scientific, kat. br. AC201531000, SAD i dH₂O), koji je nakon nanošenja poravnat sa 10% etanolom, i koji je ostavljen da polimerizuje 45 minuta. Nakon uklanjanja etanola, nanošen je gel za koncentrovanje 2 ml 4% SDS gel (0,5 M Tris baza, Fisher scientific, kat. br. BP152-500, SAD; pH=6,8, 30% akrilamid-bisakrilamid - AA-bis, Sigma Aldrich Co., kat. br. A2917, SAD; 10% SDS, Fisher scientific, kat. br. PI28364, SAD; TEMED, Sigma Aldrich Co., kat. br. T9281, SAD; 10% amonijum persulfat – APS, Fisher scientific, kat. br. AC201531000 i dH₂O) i postavljani su 'češljici', pri čemu se vodilo računa da ne dođe do stvaranja mehurići, nakon čega je gel ostavljan da polimerizuje oko 30 minuta. U poslednjem koraku 400 ml pufera za elektroforezu (eng. *Running buffer*) (25 mM Tris baza, Fisher scientific, kat. br. BP152-500, SAD, 192 mM glicin, Fisher scientific, kat. br. G46-500, SAD, 0,1% SDS, Fisher scientific, kat. br. PI28364, SAD i dH₂O) dodato je u aparaturu u kadu i između dva stakla.



Slika 17. SDS-poliakrilamid gel elektroforeza. SDS poliakrilamid gel elektroforeza obuhvata pripremu gela za razdvajanje (eng. *Running gel*), gela za koncentrovanje (eng. *Stacking gel*) i pufera za elektroforezu. Uzorci koji sadrže proteine se nanose u bunariće i prilikom aktiviranja sistema, pri voltaži od 100-120 V, proteini se kreću u smeru od katode (-) ka anodi (+) i razdvajaju se na osnovu molekulske mase. (modifikovano prema referenci: <https://www.proteinatlas.org/learn/method/western+blot>)

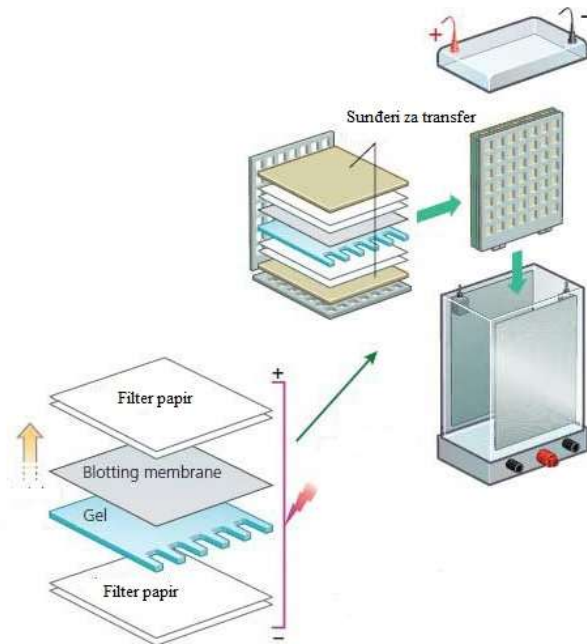
Leammle pufer za pripremu uzorka je korišćen kako bi se dobilo što bolje razdvajanje proteina pomoću SDS-poliakrilamid gel elektroforeze (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel electrophoresis* - SDS-PAGE). Neposredno pred elektroforezu, uporedno sa polimerizacijom gelova, pripremani su uzorci. U prethodno pripremljenih 200 μL *Leammle* pufera za pripremu uzorka (62,5 mM Tris baza, Fisher scientific, kat. br. BP152-500, SAD, pH=6,8 prilagođen sa HCl, 10% glicerol, 2% SDS, Fisher scientific, kat. br. PI28364, SAD, 0,002% bromfenolplavo, Sigma Aldrich Co., kat. br. B0126, SAD) dodato je 5 μL β -merkaptetoanol (Sigma Aldrich Co., kat. br. M6250, SAD). U sledećem koraku uzorci su mešani sa pripremljenim puferom u odnosu 1:1 (30 μL uzorka : 30 μL *Leammle* pufera), a ovako pripremljeni uzorci su kuvani u ključaloj vodi u digestoru na 100 °C, u trajanju od 3 min. Nakon hlađenja na gelove za elektroforezu nanošeno je 10 μL uzorka i 2,5 μL proteina Ladder-a (Prism Ultra Protein Ladder (10-245 kDa), Abcam, kat. br. ab116028, Velika Britanija), proteina poznatih molekulskih masa kako bi se lakše i preciznije lokalizovali ispitivani proteini. Standardni uzorci su korišćeni kao kontrola same procedure.

Elektroforeza je rađena na sistemu za vertikalnu elektroforezu *Perfect Blue™ Vertical Double Gel System/Twin S* (VWR Peqlab, kat. br. PEQL45-1010-C, SAD) u trajanju od oko 2h pri naponu od 100-120 V na sobnoj temperaturi, a gelovi su dalje korišćeni za Western blot analizu.

3.6.3. Transfer proteina sa gela na membranu

U sledećem koraku Western blot analize proteini su transferovani sa gela na membranu (eng. *Blotting*). Kako bi se gelovi izolovali iz aparature za elektroforezu, zajedno sa staklima potapani su u pufer za transfer (20% metanol, Sigma Aldrich Co., kat. br. 322415, SAD, 25 mM Tris baza, Fisher scientific, kat. br. BP152-500, SAD i 192 mM glicin, Fisher scientific, kat. br. G46-500, SAD, pH=8.3), koji olakšava odvajanje samog gela od stakala i omogućava lakše prebacivanje na filter papir. PVDF membrana (eng. *polyvinylidene difluoride* - PVDF; Amersham™ Protran® Western blotting membranes, nitrocellulose, Cytiva, kat. br. 10600002, SAD), prethodno isečena na dimenzije 10x5, je prvo aktivirana potapanjem 2 min u 100% metanola (Sigma Aldrich Co., kat. br. 322415, SAD), zatim potapanjem 2 min u dH₂O i na kraju potapanje u pufer za transfer u trajanju od 2 min. Nakon ovih koraka pristupilo se pravljenju sendviča (Slika 18), čemu je prethodilo potapanje svih komponenti u pufer za transfer. „Sendvič“ se formira tako što se na crnu stranu stavlja sunder za transfer, zatim filter papir na koji je prenesen gel, PVDF membrana, i na kraju ponovo filter papir. Crna strana aparature na kojoj se nalazi gel ide ka crnoj elektrodi – katodi, a sam prenos proteina ide u smeru od katode ka anodi.

Za transfer proteina korišćen je sistem za vlažni transfer *PerfectBlue™ Tank electro blotting systems WEB™ S* (VWR Peqlab, kat. br. PEQL52-WEB-10, SAD), koji je prethodno napunjen hladnim puferom za transfer. Transfer proteina sa gela na membranu se odvijao na 4 °C u trajanju od 50 min (100 V, 300 mA).



Slika 18. Šematski prikaz formiranja 'sendviča' i transfera proteina sa gela na membranu. Sendvič formiraju filter papir, gel, PVDF membrana i filter papir, tako što se gel postavlja bliže katodi. Transfer proteina odvija se u smeru anode (+) (modifikovano prema referenci: <https://www.bio-rad-antibodies.com/separating-proteins-to-a-blotting-membrane-western-blotting.html>)

3.6.4. Detekcija proteina

Nakon transfera, kako bi se izbeglo nespecifično vezivanje antitela na membrani, membrane su inkubirane (eng. *Blocking*) sa 5% rastvorom BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*) u TBST (eng. *Tris-buffered saline-Tween*; 50 mM Tris-HCl, Sigma Aldrich Co., kat. br. T6666, SAD, pH=7,4, 150 mM NaCl, 0,5% Tween® 20, Sigma Aldrich Co., kat. br. P9416, SAD) u trajanju od 1h na mešalici pri sobnoj temperaturi. U sledećem koraku membrane su opkrojene, obeležene po antitelima i inkubirane sa primarnim antitelima preko noći pri temperaturi 4 °C. Sutradan, nakon inkubacije membrane su ispirane sa TBST-om 4 puta u trajanju od po 15 minuta, te inkubirane sa sekundarnim-HRP antitelom u trajanju od 1h na mešalici. Nakon sekundarne inkubacije membrane su ponovo ispirane sa TBST-om 4 puta u trajanju od po 15 minuta. Karakteristike primarnih i sekundarnih antitela korišćenih u Western blot analizi se nalaze u tabeli 4.

Postupak vizualizacije sekundarnog antitela obuhvatao je korišćenje supstrata za hemiluminiscenciju *Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit* (Invitrogen Corporation, kat. br. WP20005, SAD). Nakon poslednjeg ispiranja membrane, membrana je postavljena na plastičnu providnu podlogu nakon čega je pipetiran supstrat za hemiluminiscenciju, dobijen mešanjem u odnosu 1:1 (*HRP Chemiluminescent Substrate Reagent A* i *HRP Chemiluminescent Substrate Reagent B*, Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit, Invitrogen Corporation, kat. br. WP20005, SAD), i dodata je plastična providna podloga. Nakon jednog minuta rađena je vizualizacija sekundarnog antitela. Za vizualizaciju sekundarnog antitela korišćen je hemiluminiscentni sistem za detekciju (LAS 1000 Plus –

Fujifilm, Japan), a sami filmovi su se obrađivali upotrebom programa za obradu slike *Image Reader LAS-1000 Lit* (Fujifilm, Japan). Izmerene vrednosti signala su izražene u arbitrarnim jedinicama (a.u.), a vrednosti su izražene u odnosu na signal β aktina.

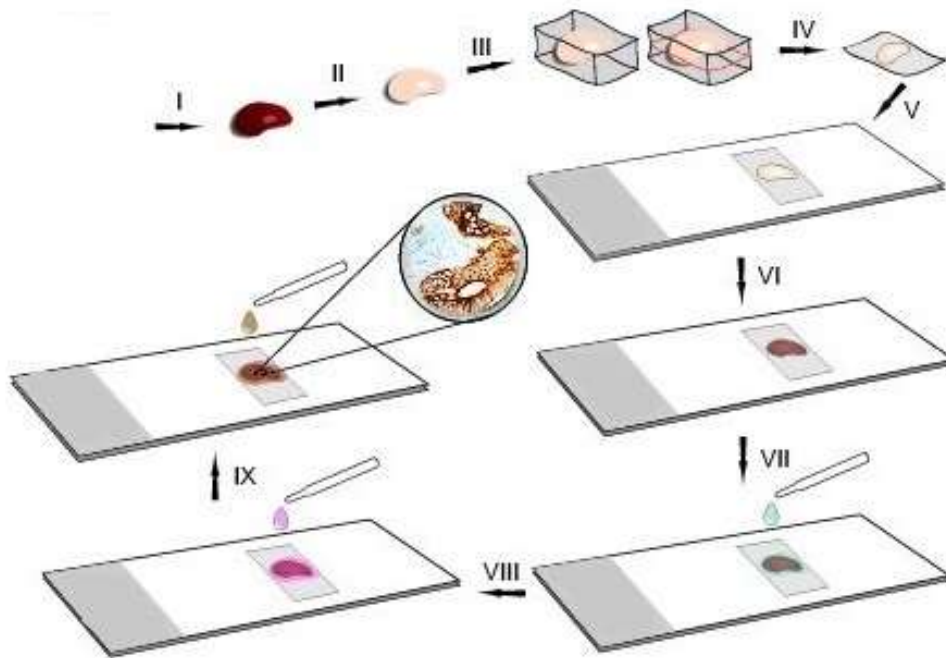
Tabela 4. Primarna i sekundarna antitela korišćena za Western blot analizu.

Antitela	Karakteristike	Kataloški broj i proizvođač	Razblaženje
Anti-BDNF	Primarno zečije poliklonalno antitelo	Kat. br. ab72439 Abcam, Velika Britanija	1:2000
Anti- β actin	Primarno zečje poliklonalno antitelo	Kat. Br. ab8227 Abcam, Velika Britanija	1:2000
Anti-GAP43	Primarno mišje monoklonalno antitelo	Kat. br. 33-5000 ThermoFisher Scientific, SAD	1:2000
Goat Anti Rabbit IgG (HRP)	Sekundarno kozije anti-zečije antitelo	Kat. Br. ab6721 Abcam, Velika Britanija	1:2000 za Anti- β actin 1:3000 za Anti-BDNF
Goat Anti Mouse IgG (HRP)	Sekundarno kozje anti-mišje antitelo	Kat. Br. HAF007 Biotechine, SAD	1:1000

3.7. Imunohistohemijska analiza ekspresije DCX proteina u hipokampusu i α 2A-adrenergičkih receptora u *locus ceruleus*-u

U drugoj fazi istraživanja nakon žrtvovanja životinja od preostalih 6 životinja iz svake eksperimentalne grupe izolovani su hipokampusi, koji eksprimiraju neuralni protein *doublecortin* (DCX), i *locus ceruleus*-i za imunohistohemijsku analizu (Slika 19 i 20).

Nakon izolovanja, tkiva hipokampusa i *locus ceruleus*-a su fiksirana u rastvoru formaldehida puferovanog fosfatima (3,6 %), dehidratirana u seriji rastvora etanola i ukalupljena u parafinu. Preseci tkiva sa rostrokaudalnim regionom hipokampusa debljine 5 μ m su dobijeni serijskim sečenjem parafinskih preparata na kriokatu Leica Cryocut 1800 Cryostat (Leica, Nemačka).



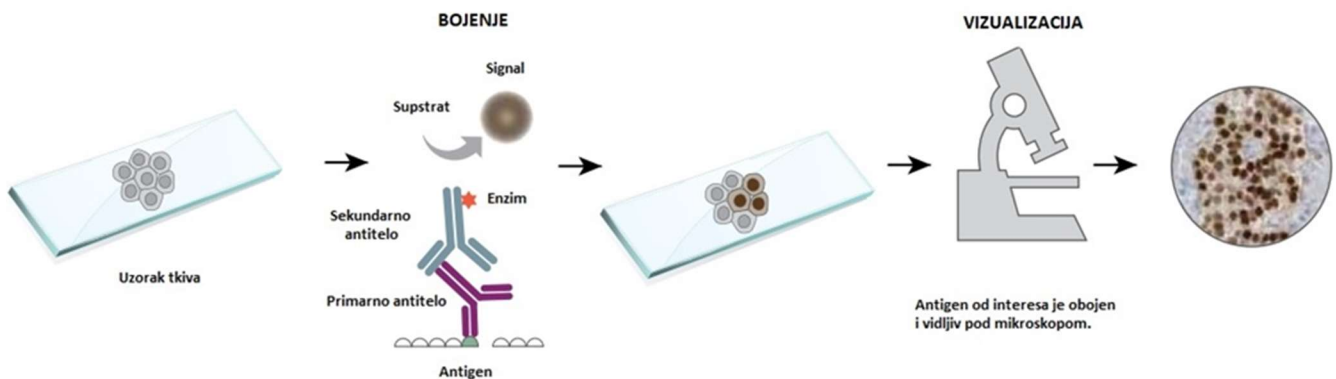
Slika 19. Imunohistohemijaska metoda: prikaz koraka. I korak - izolovanje tkiva; II korak - fiksacija tkiva; III korak - kalupljenje tkiva; IV - sečenje tkiva, dobijanje preseka tkiva; V korak - prenošenje preseka tkiva na mikroskopsku pločicu; VI korak - demaskiranje antigena i blokiranje; VII korak - inkubacija sa primarnim antitelom; VIII korak - inkubacija sa sekundarnim antitelom; IX korak - bojenje i vizualizacija (preuzeto sa: <https://www.creative-diagnostics.com/Immunohistochemistry-guide.htm>).

3.7.1. Određivanje ekspresije DCX proteina u hipokampusu imunohistohemijaskom metodom

Preseci tkiva hipokampusa, su na početku prvo deparafisani i hidratisani, stavljanjem mikroskopskih pločica u kivete sa rastvorima sledećim redosledom: ksilol I, ksilol II, ksilol III, 100 % etanol, 100 % etanol, 96 % etanol, 96 % etanol, 70 % etanol, destilovana voda; u trajanju od po 5 minuta, te ispirani PBS-om (eng. *Phosphate buffered saline*) u trajanju od po 5 minuta tri puta. Nakon toga preparati su inkubirani sa reagensima i antitelima na sobnoj temperaturi, dok su posle svake inkubacije preparati ispirani tri puta PBS-om u trajanju od po 5 minuta. Endogene peroksidaze su blokirane inkubacijom sa blokatorom peroksidaza stavljanjem 1-3 kapi blokatora na ceo preparat (5-10 min u vlažnoj komori), dok je inkubacija sa blokatorom seruma blokirala epitope i smanjila nespecifična vezivanja (1-3 kapi, 20min u vlažnoj komori). Inkubacija sa primarnim anti-DCX antitelom (75 µl rastvora), razblaženim u odnosu 1:100 u blokatoru seruma, odvijala se na sobnoj temperaturu u vlažnoj komori preko noći. Narednog dana, nakon ispiranja, preparati su inkubirani prvo sa univerzalnim biotinizovanim sekundarnim antitelom (1-3 kapi), a zatim i sa HRP-streptavidin kompleksom (1-3 kapi) na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori u trajanju od po 30 minuta.

U narednom koraku vršena je inkubacijom sa sveže pripremljenim HRP supstratom - diaminobenzidinom (DAB), gde se razvijanje boje pratilo pod mikroskopom i u proseku je bilo potrebno između 30 s i 10 minuta (Slika 20). Sama reakcija je prekidana stavljanjem mikroskopske pločice u kivetu sa destilovanom vodom. Kontrastiranje se radilo hematoksilinom (Sigma Aldrich Co., kat. br. MHS1, SAD), nakon čega su preparati ispirani vodom iz česme i dehidratirani (70% etanol, 96% etanol, 100% etanol, 100% etanol, ksilol II, ksilol III u trajanju od po 5 min). Pokrovna ljspica je stavljena uz korišćenje *DPX Mountant* medijuma za histologiju. Preparati su analizirani pomoću svetlosnog mikroskopa Olympus BX50 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Nemačka), povezanog sa digitalnom kamerom (SonyPower HAD 3CCD, Tokio, Japan) i kompjuterskog programa za obradu slike (MicroImage, Ver. 4.0., OLYMPUS Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemačka). Imunopozitivne ćelije kvantifikovane su pod uveličanjem 400x, od strane iskusnog istraživača koji je bio 'slep' za tretmane. Broj DCX pozitivnih ćelija određen je u celom *dentate gyrus* regionu hipokampusa i izražen je po površini vidnog polja (0,07 mm²).

Reagensi za imunohistohemijsku detekciju DCX sadržani su u komercijalnom kitu *ImmunoCruz® goat LSAB Staining System: sc-2053* (Santa Cruz biotechnology, inc, SAD), uključujući i sekundarno mišje anti-kozije biotenzinovano antitelo. Kao primarno antitelo za detekciju DCX korišćeno je kozije poliklonsko anti-DCX antitelo (Tabela 5).



Slika 20. Osnovni princip imunohistohemijske analize. Uzorak tkiva ispoljeva antigen, na koji se specifično vezuje primarno antitelo. Na primarno antitelo vezuje se sekundarno antitelo sa enzimom, te dodavanjem supstrata za enzim dolazi do stvaranja signala. Pozitivne ćelije su obojene braon bojom i vidljive su pod mikroskopom (modifikovano prema referenci: Immunohistochemistry (IHC) Handbook, bio-techne.com).

Tabela 5. Primarna i sekundarna antitela korišćena za imunohistohemijsku analizu.

Antitela	Karakteristike	Kataloški broj i proizvođač
Anti-DCX	Primarno kozije poliklonsko antitelo	Doublecortin (C-18) Kat. Br. sc-8066; Santa Cruz biotechnology, inc, SAD
Mouse Anti-Goat IgG-Biotin	Sekundarno mišje anti-kozije biotenzovano antitelo	ImmunoCruz® goat LSAB Staining System: Kat. Br. sc-2053 Santa Cruz biotechnology, inc, SAD
Anti - α 2A-AR	Primarno zečije poliklonsko antitelo	Anti-alpha 2a Adrenergic Receptor antibody; Kat. Br. ab65833 Abcam, Velika Britanija
HRP Horse Anti-Rabbit IgG	Sekundarno konjsko anti-zečije HRP konjugovano antitelo	ImmPRESS® Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Peroxidase Kat. Br. MP-7401; Vector Laboratories, SAD

3.7.2. Određivanje ekspresije α 2A-AR u *locus ceruleus*-u imunohistohemijskom metodom

Pripremljene mikroskopske pločice sa tkivom su stavljene u termostat podešen na 56-57 °C na 30 minuta. Preseci tkiva su nakon toga deparafisani i hidratizirani, stavljanjem mikroskopskih pločica u kivete sa rastvorima sledećim redosledom: ksilol I, ksilol II, ksilol III, 100 % etanol, 100 % etanol, 96 % etanol, 96 % etanol, 70 % etanol, destilovana voda; u trajanju od po 5 minuta, te ispirani PBS-om (eng. *Phosphate buffered saline*) u trajanju od po 5 minuta tri puta. Tkivo je zaokruženo *Liquid Pen Block*-om, nakon čega su preparati inkubirani i posle svake inkubacije preparati su ispirani 3 puta PBS-om u trajanju od po 5 minuta. Endogene peroksidaze su blokirane inkubacijom sa 3 % H₂O₂ u trajanju od 10 minuta u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi, dok je inkubacija sa blokatorom seruma blokirala epitope i smanjila nespecifična vezivanja (*Serum Block* reagens iz kita MP-7401, 30min u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi). Inkubacija sa primarnim anti- α 2-adrenergičkim receptor antitelom, razblaženim u odnosu 1:1000 u blokatoru seruma, odvijala se u vlažnoj komori u frižideru preko noći. Narednog dana, nakon ispiranja, preparati su inkubirani sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa peroksidazom (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta.

Vizualizacija je vršena nakon inkubacijom sa sveže pripremljenim HRP supstratom - diaminobenzidinom (DAB substrate kit, Abcam, kat. br. Ab64238, Velika Britanija), gde se razvijanje boje pratilo pod mikroskopom i u proseku je bilo potrebno između 1 minuta i 40 s i 2 minuta (Slika 20). Kontrastiranje se radilo hematoksilinom (Sigma Aldrich Co., kat. br. MHS1, SAD), nakon čega su preparati ispirani vodom iz česme i dehidratizirani (70 % etanol, 96 % etanol,

96 % etanol, 100 % etanol, 100 % etanol, ksilol III, ksilol II, ksilol II u trajanju od po 5 min). Pokrovna ljspica je stavljena uz korišćenje *DPX Mountant* medijuma za histologiju. Preparati su analizirani pomoću istog mikroskopa kao i preparati hipokampusa. Imunopozitivne ćelije kvantifikovane su pod uvećanjem 400x, od strane iskusnog istraživača koji je bio 'slep' za tretmane. Broj α 2A-AR pozitivnih ćelija određen je u celom *locus ceruleus*-u i izražen je po površini vidnog polja (0,07 mm²).

Reagensi za imunohistohemijsku detekciju α 2A-AR sadržani su u komercijalnom kitu *ImmPRESS® HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Peroxidase* (Vector Laboratories, SAD), uključujući i sekundarno konjsko anti-zečije HRP konjugovano antitelo. Kao primarno antitelo za detekciju α 2A-AR korišćeno je zečije poliklonsko anti- α 2A-AR antitelo (Tabela 5).

3.8. Određivanje stepena oštećenja DNK molekula perifernih limfocita nakon dugoročnih tretmana

Nakon žrtvovanja životinja u drugom eksperimentu, kardijačnom punkcijom uzorkovana je puna krv kako bi se ispitao stepen oštećenja DNK molekula perifernih limfocita. Oštećenje DNK molekula perifernih limfocita određivano je alkalnim *Comet* testom, široko primenjivanom standardnom metodom za određivanja oštećenja DNK u različitim tipovima ćelija, uključujući periferne limfocite. U *Comet* testu oštećenje DNK određuje se na osnovu kretanja oštećene DNK u električnom polju. Prednosti *Comet* testa kao *in vitro* testa su pre svega osetljivost na nizak nivo DNK oštećenja, mali uzorak, jednostavnost testa i brzina izvođenja (Tice et al., 2000).

U toku eksperimenta prvo je ispitivano da li dugoročni tretmani magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom tretmana utiču na stabilnost DNK molekula perifernih limfocita, dok je u drugom delu eksperimenta ispitivana osetljivost DNK molekula perifernih limfocita na egzogeni oksidativni stres (izlaganje 1,5 mM H₂O₂ u trajanju od 5 minuta). Inkubacija sa visokim dozama vodonik peroksida predstavlja deo standardne metode za koju se pokazalo da održava dobru viabilnost ćelija a produkuje odgovarajuće DNK oštećenje (Stanić et al., 2016; Petrović et al., 2016).

Korišćen je modifikovan protokol po *Singh*-u i saradnicima (Singh et al., 1988), a koji je standardizovan u našoj laboratoriji (Stanić et al., 2016; Petrović et al., 2016). Pre izvođenja testa, viabilnost ćelija za svaki uzorak ispitivana je triptan-plavo metodom, i bila je preko 90 % (Anderson et al., 1994; Strober, 2015). Mikroskopske pločice su pripremljene i obložene sa 1 % rastvorom obične agaroze (eng. *normal melting point agarose*; Sigma Aldrich Co., kat. br. A9539, SAD), koja je ostavljena da se osuše na sobnoj temperaturi. Uzorak heparizovane pune krvi životinja, 6 μ L, pomešan je sa 100 μ L 0,67 % rastvora agaroze niske tačke topljenja (eng. *low melting point*, LMP; Sigma Aldrich Co., kat. br. A9918, SAD) u fosfatnom puferu (eng. *Phosphate buffered saline*, PBS, Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak", Srbija), te pipetiran na prethodno pripremljene mikroskopske pločice i nakon stavljanja pokrovne ljspice, ostavljen da očvrzne 5 min na 4 °C. Nakon uklanjanja pokrovne ljspice, mikroskopski uzorci su tretirani zavisno od dela eksperimenta sa 60 μ L PBS-a ili sa 60 μ L 1,5 mM H₂O₂ u trajanju od 5 min na 4 °C. U sledećem koraku nanešen je novi sloj 0,5 % rastvora LMP agaroze u PBS-u (100 μ L) koji je ostavljen da očvrzne 5 min na 4 °C. Pločice su zatim uronjene u lizirajući rastvor (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA - ethylene-diaminetetra-acetic acid, Sigma Aldrich Co., kat. br. E6758, SAD, 10 mM Tris, pH=10, Sigma Aldrich Co., kat. br. T1503, SAD, 1% Triton X-100, Sigma Aldrich, Co., kat. br.

T8532, SAD i 10% DMSO - dimethylsulfoxide, Sigma Aldrich Co., kat. br. 41639 SAD; pH=10 je podešen sa 10 M NaOH) i ostavljene preko noći na 4 °C. U sledećem koraku, mikroskopske pločice sa uzorcima su prebačene na 30 minuta u hladni pufer za elektroforezu (300 mM NaOH i 1 mM EDTA, Sigma Aldrich Co., kat br. E6758, SAD, pH>13), nakon čega je izvedena horizontalna elektroforeza u trajanju od 30 minuta pri uslovima 4 °C, 25 V i 215 mA na sistemu *PerfectBlue Wide Gel System Maxi ExW* (Peqlab, Life Science, Nemačka). Kako bi se uklonile sve baze i detrdženti, nakon elektroforeze pločice su ispirane tri puta na svakih 5 min sa 0,4 M rastvorom Tris baze (Sigma Aldrich Co., kat. br. T1503, SAD, pH=7,5, podešen sa koncentrovanom HCl), nakon čega su obojene sa rastvorom etidijum bromida koncentracije 20 µg/mL (Sigma Aldrich Co., kat. br. E1385, SAD).

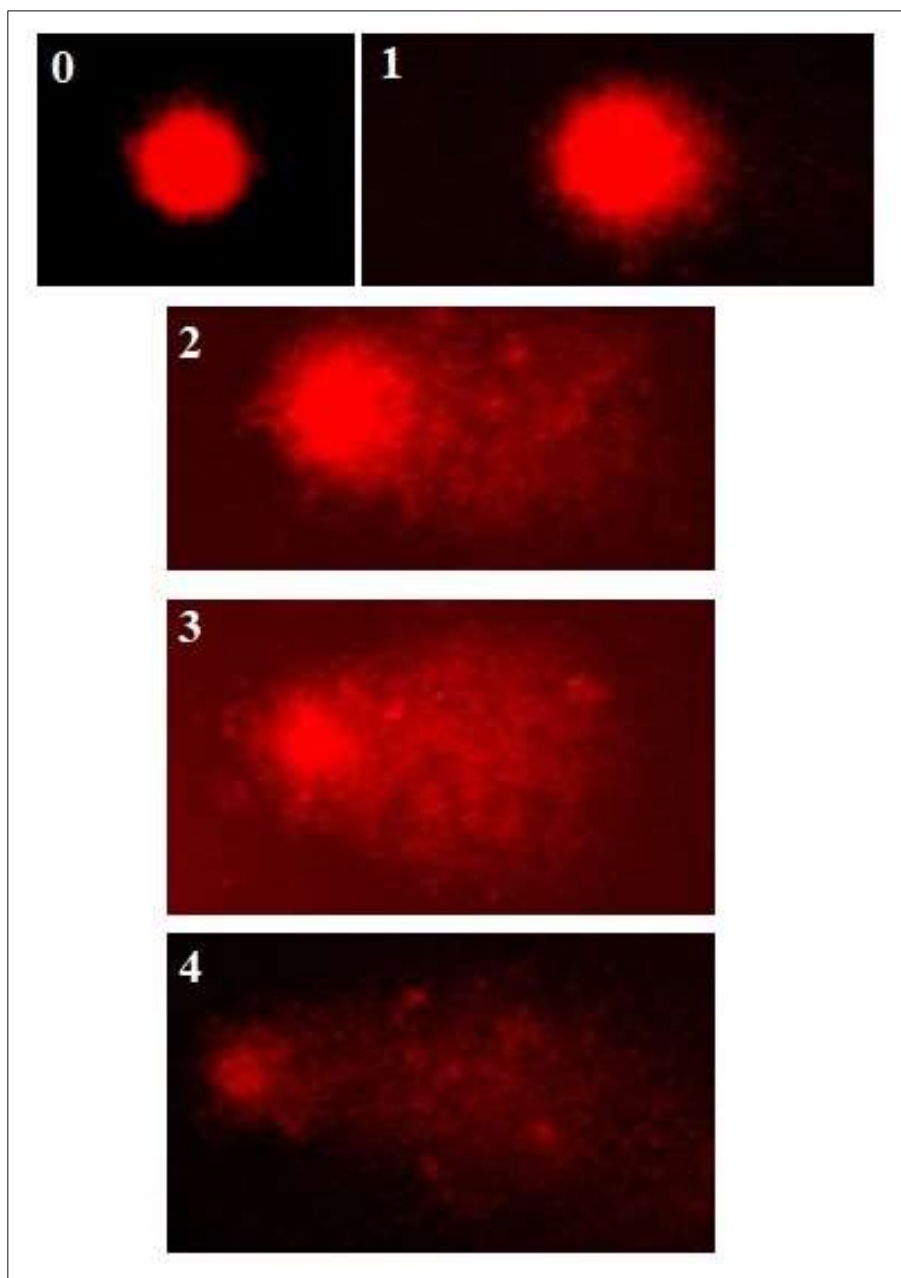
Analiza oštećenja DNK perifernih limfocita vršena je nakon stavljanja pokrovne ljušpice vizualno, korišćenjem fluorescentnog mikroskopa (Olympus BX 50 microscope, Olympus Optical Co., GmbH, sa žvinom lampom HBO, 100 W, 516-560 nm, Zeiss) pri uvećanju 100x. Prilikom analize mikroskopskih preparata korišćen je softver za obradu slike MicroImage, Ver. 4.0. (Olympus Optical Co. GmbH).

Preparati su pripremani u duplikatu za svaku životinju i za svaki preparat odrađena je procena 50 ćelija, tako da je analizirano ukupno 100 ćelija po životinji. Preparati su analizirani vizualno, od strane jednog istraživača koji je bio 'slep' za tretmane, a ćelije su podeljene u 5 kategorija na osnovu veličine repa, odnosno količine DNK oslobođene iz nukleusa (Anderson et al., 1994; Heuser et al., 2002) (Tabela 6, Slika 21). Ćelije u apoptozi su isključene iz dalje analize (Singh, 2005).

Rezultati *Comet* testa predstavljeni su kao totalni broj ćelija sa oštećenim DNK molekulom (eng. *Damaged nuclei, DN*) od 100 analiziranih ćelija po životinji - Ukupan DN. Pored toga na osnovu jačine oštećenja DNK, ćelije su grupisane u 2 kategorije: srednje ili umereno oštećene ćelije i visoko oštećene ćelije. Srednje ili umereno oštećene ćelije, Umereni DN, predstavljaju zbir ćelija kategorija 1 i 2 (oštećenja između 5% i 40% u odnosu na neoštećene ćelije), dok visoko oštećene ćelije, Visoki DN, predstavljaju zbir ćelija kategorija 3 i 4 (oštećenja preko 40% u odnosu na neoštećene ćelije).

Tabela 6. Pet kategorija kometa perifernih limfocita Wistar pacova

Kategorija	Oštećenja ćelija	% oštećenja ćelija
0	neoštećene	manje od 5%
1	blago oštećene	između 5% i 20%
2	srednje oštećene	između 20% i 40%
3	visoko oštećene	između 40% i 95%
4	maksimalno oštećene	veće od 95%



Slika 21. Mikroskopski prikaz kategorija perifernih limfocita Wistar pacova na osnovu veličine repa (klase kometa). (0) kategorija 0, neoštećene ćelije; (1) kategorija 1, blago oštećene ćelije; (2) kategorija 2, srednje oštećene ćelije; (3) kategorija 3, visoko oštećene ćelije; (4) kategorija 4, maksimalno oštećene ćelije.

Dodatno, u daljoj analizi rezultata izračunat je i totalni komet skor (eng. *total comet score*, TCS) za svaku životinju na osnovu formule $TCS = 0(n)+1(n)+2(n)+3(n)+4(n)$ gde 'n' predstavlja broj ćelija u odgovarajućoj klasi (Khisroon et al., 2015). Kako je analizirano 100 ćelija po životinji, vrednosti TCS nalazi se između 0 jedinica, totalno neoštećene ćelije, i 400 jedinica, totalno oštećene ćelije (Collins, 2004; Sopić et al., 2014). Dodatno, komet skor je izračunat i za umereno oštećene ćelije (eng. *medium damaged comet score*, MDCS) i za visoko oštećene ćelije (eng. *highly damaged comet score*, HDCS) (Stanić et al., 2016).

3.9. Određivanje markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi Wistar pacova

Sa ciljem ispitivanja uticaja povećane aktivnosti HPA osovine i suplementacije magnezijumom na promene u oksidativnom statusu dugoročno tretiranih eksperimentalnih životinja, određivani su markeri oksidativnog statusa u plazmi: superoksid anjon (O_2^-), totalni oksidativni status (TOS) i produkti oksidacije proteina (eng. *Advanced oxidation protein products*, AOPP), kao i aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid dizmutaze (SOD) i paraoksonaze 1 (PON1).

Nakon žrtvovanja životinja u drugom eksperimentu, kardijačnom punkcijom uzorkovana je krv, koja je transferovana u epruvete sa heparinom na 4 °C. Uzorci krvi su zatim centrifugirani na 3000 obrtaja u minuti na 4 °C u trajanju od 15 minuta, a uzorci plazme su skladišteni na -80 °C do analiziranja. Spektrofotometrijska analiza uzoraka rađena je na aparatu ILAB 300+ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italija; Slika 22).

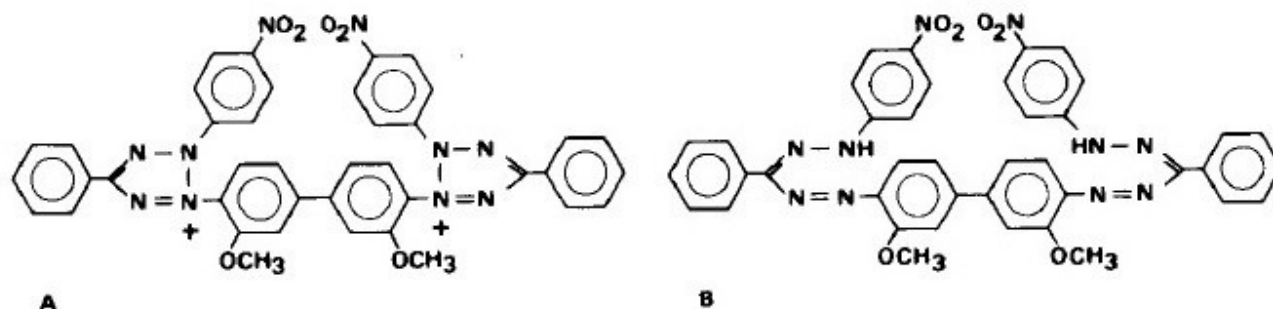


Slika 22. Aparatura korišćena za spektrofotometrijske analize, ILAB 300 plus analizator (preuzeto iz: Katalog opreme, Farmaceutskog fakulteta, 2020).

3.9.1. Određivanje nivoa superoksid anjona - O_2^-

Nivo superoksid anjona (O_2^-) u plazmi određivan je metodom opisanom od strane Auclair-a i Voisin-a (Auclair i Voisin, 1985), a koja se zasniva na redukciji nitro plavog tetrazolijuma (eng. *nitroblue tetrazolium*, NBT) žute boje do plavog diformazana (Slika 23).

Diformazan nije rastvorljiv u vodi, pa se pored glavnog reagensa NBT (konc. 1 mmol/L) u uzorak dodaje i želatin (konc. 0,1 mg/ml), dok se reakcija odvija u 0,05 M fosfatnom puferu pH=8,6 (konc. 0,1 mM EDTA). U pripremi uzoraka ekstruzija kiseonika vrši se azotnim gasom pod pritiskom sat vremena pre analize. Nivo superoksid anjona je izražen kao brzina redukcije NBT, mereno spektrofotometrijski na 560 nm.



Slika 23. Molekulske strukture nitro plavog tetrazolijuma (NBT) i diformazana. (A) NBT – žuto jedinjenje; (B) Diformazan – plavo jedinjenje (preuzeto iz reference: Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. BocaRaton, FL: CRC Press; 1985. p. 123–32).

3.9.2. Određivanje totalnog oksidativnog statusa - TOS

Određivanje totalnog oksidativnog statusa (eng. *total oxidative status*, TOS) u uzorku se baziralo na sposobnosti oksidanasa iz uzorka da dovedu do oksidacije fero (Fe^{2+}) jona u feri (Fe^{3+}) jone u kiselj sredini (Erel, 2005; Kotur-Stevuljevic et al., 2015).

Oksidansi iz uzorka, poput vodonik peroksida i lipidnih hidroperoksida, dovode do oksidacije fero jona iz fero-o-dianizidin kompleksa u feri jone. Određivanje TOS-a odvija se uz pomoć reagensa, 5 mM fero-amonijum-sulfata i 10 mM o-dianisidin dihidrohlorida, a oksidacija se odvija u prisustvo visoke koncentracije glicerola (konc. 1,35 mol/L). Druga reakcija koja je neophodna za određivanje totalnog oksidativnog statusa, predstavlja stvaranje obojenog kompleksa u reakciji između feri jona i ksilenol oranža (konc. 150 $\mu\text{mol/L}$) u kiselj sredini, gde je intenzitet boje proporcionalan totalnoj količini oksidanasa u uzorku. Absorbanca nastalog jedinjenja je merena na 560 nm i proporcionalna je totalnoj količini molekula u uzorku. Kalibracija same metode je rađena sa vodenim rastvorima vodonik peroksida (konc. 10-200 $\mu\text{mol/L}$) i rezultati su predstavljani kao ekvivalenti H_2O_2 po litru ($\mu\text{mol/L}$).

3.9.3. Određivanje koncentracije AOPP

Produkti oksidacije proteina (eng. *Advanced oxidation protein products*, AOPP), kao marker oksidativnog stresa određivan je spektrofotometrijskom metodom opisanom od strane Witko-Sarsat-a (Witko-Sarsat et al., 1996).

Prilikom pripreme uzorka plazme 200 μL uzorka je razblaženo u odnosu 1:5 u 20 mM fosfatnom puferu pH 7,4, nakon čega je dodavano 20 μL glacijalne kiseline, 10 μL kalijum-jodida i 20 μL glacijalne kiseline. Absorbanca nastalog jedinjenja merena je na 340 nm. Kalibracija metode je rađena sa hloramine T kao standardom u koncentracijama 10-100 $\mu\text{mol/L}$, te je koncentracija AOPP izražena kao ekvivalent hloramin T po litri ($\mu\text{mol/L}$).

3.9.4. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dizmutaze – SOD

Sa ciljem određivanja aktivnosti enzimske antioksidativne zaštite u plazmi određivana je aktivnost SOD enzima korišćenjem modifikovane metode postavljene od strane Misra i Fridovich-a (Misra i Fridovich, 1972). Ova metoda se zasniva na sposobnosti SOD enzima da inhibira autooksidaciju adrenalina (epinefrina) u alkalnoj sredini pri pH=10,2 do adrenohroma roze boje sa maksimumom absorbance na 480 nm.

Tokom izvođenja eksperimenta pripremani su rastvori uzoraka i kontrolni rastvori sa različitim koncentracijama adrenalina, počevši od koncentracije 10 mmol/L. Uzorak plazme 10 µL, pripreman je dodatkom 690 µL bikarbonatnog pufera (konc. 0,05 mmol/L, pH=10,2) uz dodatak rastvora EDTA (konc. 1 mmol/L), dok je u kontrolni uzorak dodavan samo bikarbonatni pufer. U sledećem koraku dodavano je 50 µL rastvora adrenalin koncentracije 10 mmol/L u HCl (konc. 20 mmol/L). Kivete su ostavljene na tamnom mestu 3 minuta, nakon čega je merena absorbanca na svaki minut u trajanju od tri minuta.

SOD enzim maksimalnu aktivnost odnosno najveći procenat inhibicije autooksidacije adrenalina ostvaruje pri koncentraciji adrenalina koja će dovesti do promene absorbance od 0.025 nm u minuti, te je SOD aktivnost u uzorku određivana pri toj koncentraciji adrenalina. Aktivnost SOD enzima predstavljena je u relativnim jedinicama, kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina, gde je jedna relativna jedinica definisana kao ona aktivnost enzima koja inhibira autooksidaciju adrenalina 50%.

3.9.5. Određivanje aktivnosti paraoksonaze 1 – PON1

Nivo parametara antioksidativne zaštite u plazmi, ispitivan je i putem određivanje antioksidativne aktivnost paraoksonaze 1 (PON1), enzima koji smanjuje oksidaciju lipida (Litvinov et al., 2012). PON1 aktivnost je određivana metodom opisanom od strane Richter-a i Furlong-a (Richter i Furlong, 1999), a koja se zasniva na konverziji paraoksona, supstrata za PON1 enzim, do p-nitrofenola intenzivno žute boje u alkalnoj sredini.

Aktivnost PON1 enzima u uzorku određivana je dodavanjem 1,2 mM paraoksona (Chem Service, West Chester, SAD) kao supstrata za enzim i dodavanjem alkalnog rastvora koji sadrži 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,5, 2 mmol/L CaCl₂. Brzina konverzije paraoksona do p-nitrofenola je praćena spektrofotometrijski na 405 nm, dok su rezultati aktivnosti enzima predstavljeni kao brzina konverzije, µmol supstrata koji hidrolizuje po minuti u litru plazme (U/L).

3.10. Statistička analiza rezultata

Rezultati istraživanja obrađivani su odgovarajućim statističkim testovima: studentovim t-testom, t-testom parova, jednofaktorskim ANOVA testom, ponovljenim ANOVA testom i dvofaktorskim ANOVA testom. Ispitivanje normalne raspodele podataka procenjivano je Shapiro-Wilkov-im testom.

Statistička analiza rezultata NORT testa obuhvatala je primenu sledećih testova:

- Studentov T-test korišćen je za analizu vrednosti D indexa i R indexa u eksperimentu 1.
- Jednofaktorska ANOVA korišćena je za analizu vrednosti D indexa i R indexa dobijenih u eksperimentima sa akutnim i dugoročnim tretmanima. Prilikom primene ANOVA testa, za višestruka poređenja korišćen je Bonferroni *post hoc* test.
- Ponovljena ANOVA korišćena je za analizu rezultata vremena istraživanja u test fazi, gde je tretman bio faktor između eksperimentalnih životinja, a preferencija za objektom faktor eksperimentalne životinje.

Za statističku analizu koncentracije magnezijuma u prefrontalnom korteksu i kortikosterona u plazmi životinja korišćenja je dvofaktorska ANOVA, sa fiksnim faktorima tretmanima magnezijumom i ACTH hormonom, uz korišćenje *post hoc* testa za višestruka poređenja gde je bilo potrebno (Student-Newman-Keuls Method).

Jednofaktorski ANOVA test korišćen je za analizu markera oksidativnog stresa i aktivnosti antioksidativnih enzima, kao i za analizu nivoa DCX, BDNF i GAP 43 u hipokampusu i α 2A-AR u LC eksperimentalnih životinja. Prilikom primene ANOVA testova za višestruka poređenja korišćeni su Bonferroni i LSD *post hoc* testovi.

Za analizu rezultata oštećenja DNK molekula perifernih limfocita korišćena je dvofaktorska ANOVA sa fiksnim faktorima tretmanima i *in vitro* inkubacijom PBS-om ili H₂O₂ uz korišćenje Bonferroni *post hoc* testa. Dodatno, T-test parova korišćen je za analizu razlike u oštećenju DNK perifernih limfocita inkubiranih sa PBS i H₂O₂ unutar svake eksperimentalne grupe.

Statistički značajnom vrednošću smatrana je vrednost $p < 0,05$. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna greška. Statistička analiza podataka je rađena pomoću programa GraphPad Prism Verzija 7 (San Dijego, SAD) i PASW Statistics verzija 18 (Čikago, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Uticaji akutne i dugoročne aktivacije HPA osovine na memoriju eksperimentalnih životinja, modulatorna uloga magnezijuma

Cilj izvođenja NORT testa bio je da se ispita da li akutni i dugoročni tretmani magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom tretmana utiču na memoriju pacova. Kako je ispitivanje uključivalo praćenje potencijalno prokognitivnih efekata tretmana korišćen je protokol sa 24 sata intervalom između trening i test faze u kome se očekuje da kontrolne životinje u test fazi nisu zapamtile trening fazu, te da ne prave razliku između novog i poznatog objekta. Tokom samih testova praćeno je vreme istraživanja poznatog i vreme istraživanja novog objekta u test fazi, a životinje koje nisu istraživale objekte u ukupnom trajanju od 10 sekundi isključivane su iz studije i iz statističke analize.

4.1.1. NORT test – indeks diskriminacije i indeks prepoznavanja

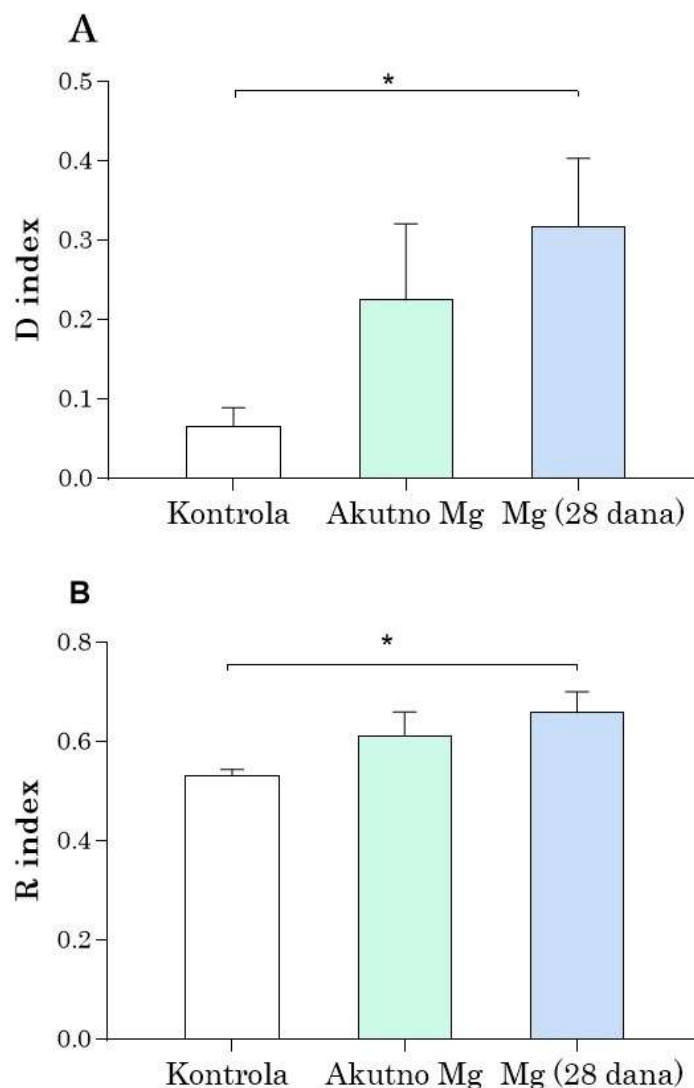
Prvi korak u analizi rezultata dobijenih sprovođenjem NORT testova bio je izračunavanje i statistička analiza vrednosti indeksa diskriminacije (D indexa) i indeksa prepoznavanja (R indexa), najčešće korišćenog pristupa prilikom analize rezultata NORT testa (Gard et al., 2007; Gard et al., 2012; Wang et al., 2013).

4.1.1.1. Promene u D indeksu i R indeksu – eksperiment 1

Vrednosti indeksa diskriminacije (D index) i indeksa prepoznavanja (R index) životinja tretiranih akutno magnezijumom i kontrolne grupe životinja iz eksperimenta 1 prikazane su na slici 24 (Slika 24, A i B).

Prilikom analize rezultata, studentov t-test nije pokazao statistički značajnu razliku ni u indeksu diskriminacije ni u indeksu prepoznavanja između akutno magnezijumom tretirane grupe životinja i kontrolne grupe životinja.

Kako ni u jednom planiranom eksperimentu akutni i dugoročni tretmani magnezijumom nisu paralelno primenjivani, prilikom analize rezultata, rezultati dugoročno magnezijumom tretiranih životinja dobijeni iz eksperimenta 3 analizirani su i predstavljeni uz rezultate eksperimenta 1. Studentov t-test pokazao je statistički značajnu razliku i u indeksu diskriminacije ($p < 0,05$) i u indeksu prepoznavanja ($p < 0,05$) između dugoročno Mg tretirane grupe životinja i kontrolne grupe životinja (Slika 24, A i B).



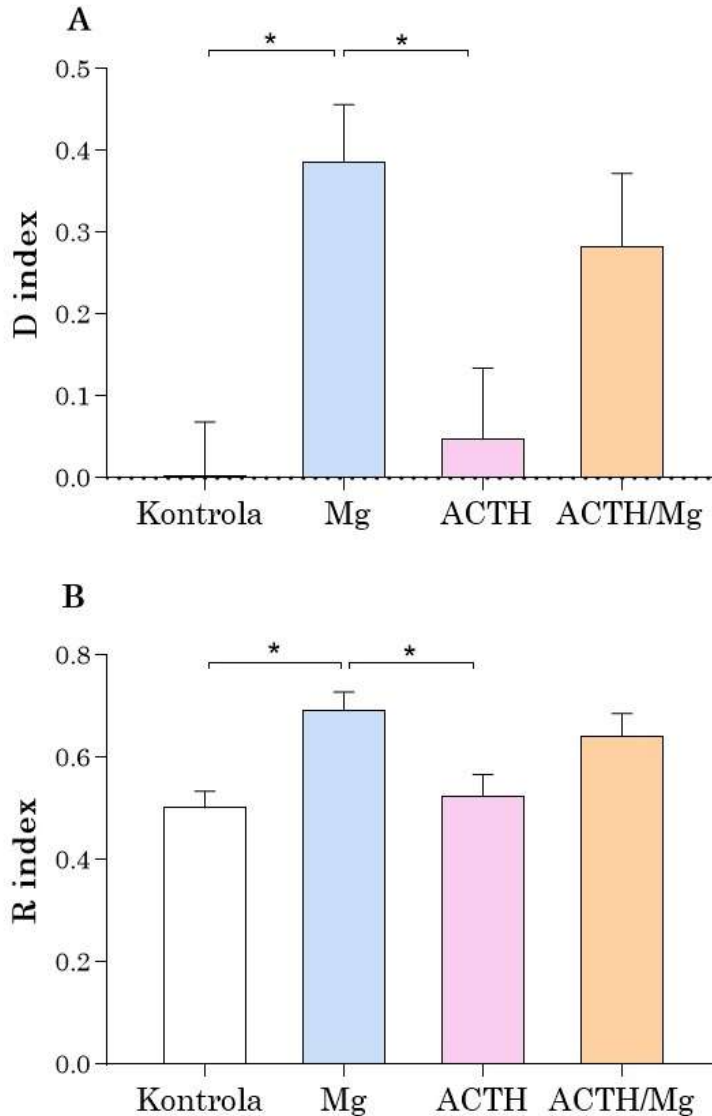
Slika 24. Efekti tretmana magnezijumom na vrednosti indeksa diskriminacije (A) i indeksa prepoznavanja (B) u NORT testu. Vrednosti indeksa diskriminacije (D index) i indeksa prepoznavanja (R index) životinja tretiranih akutno magnezijumom i kontrolne grupe životinja iz eksperimenta 1, i dugoročno tretiranih magnezijumom iz eksperimenta 3 predstavljene su kao srednje vrednosti \pm S.E.M. Analiza rezultata iz eksperimenta 1 rađena je studentovim t-testom, nakon čega je urađen studentov t-test poređenja kontrolne grupe životinja i dugoročno magnezijum tretirane grupe životinja iz eksperimenta 3. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu.

4.1.1.2. Promene u D indeksu i R indeksu – eksperiment 2

Na slici 25 prikazane su vrednosti indeksa diskriminacije i indeksa prepoznavanja životinja akutno tretiranih magnezijumom, ACTH hormonom i ACTH/Mg kombinacijom tretmana i kontrolne grupe životinja iz eksperimenta 2 (Slika 25, A i B).

Nasuprot rezultatima iz prvog eksperimenta, u ponovljenom eksperimentu akutni tretman magnezijumom pokazao je statistički značajno veće vrednosti D indeksa ($p < 0,05$) i R

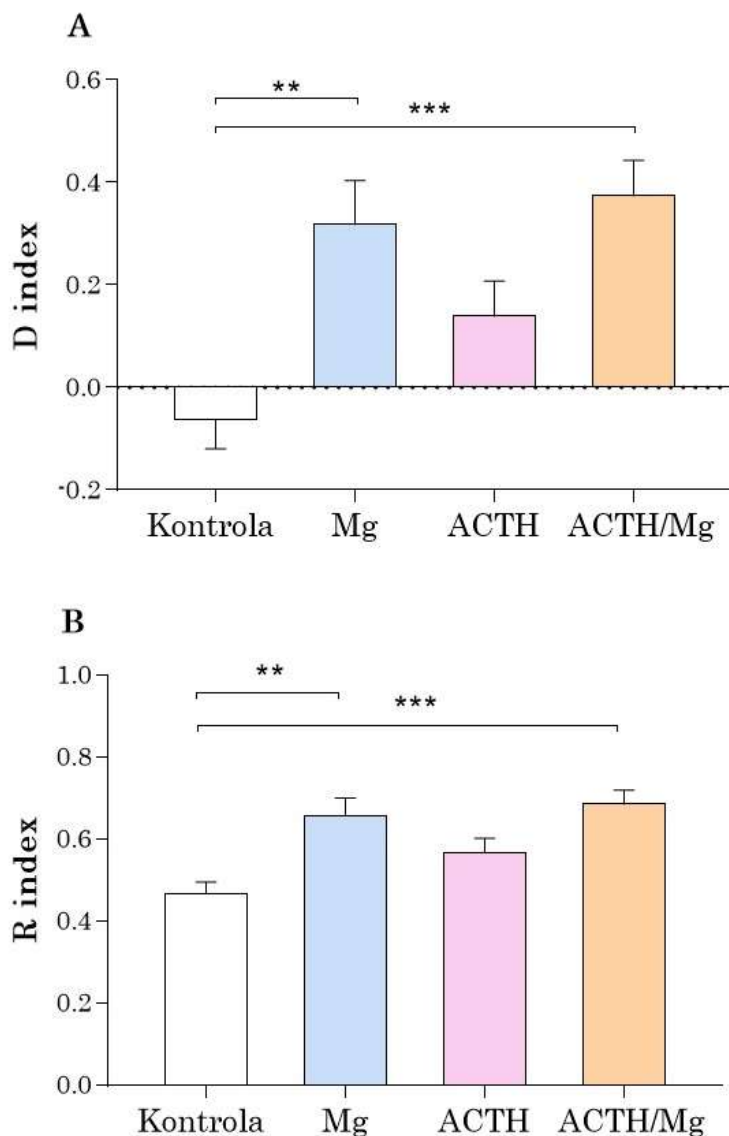
indeksa ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja, što ukazuje da su magnezijumom tretirane životinje više vremena provele u istraživanju novog objekta u test fazi u odnosu na životinje iz kontrolne grupe. Dodatno ovaj efekat na vrednosti D indeksa i R indeksa, prisutan je i prilikom poređenja magnezijumom tretirane grupe životinja i ACTH tretirane grupe životinja (D index - $p < 0,05$; R index - $p < 0,05$). Za razliku od akutne primene magnezijuma, akutna primena ACTH hormona i akutna primena kombinacije tretmana (ACTH/Mg) nisu pokazala statistički značajne promene u vrednostima D indeksa i R indeksa u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



Slika 25. Efekti akutnih tretmana na indeks diskriminacije (A) i indeks prepoznavanja (B) u NORT testu. Vrednosti indeksa diskriminacije (D index) i indeksa prepoznavanja (R index) životinja tretiranih akutno magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom ACTH/Mg tretmana i kontrolne grupe životinja predstavljene su kao srednje vrednosti \pm S.E.M. Analiza rezultata rađena je jednofaktorskim ANOVA testom. * $p < 0,05$

4.1.1.3. Promene u D indeksu i R indeksu – eksperiment 3

Vrednosti indeksa diskriminacije i indeksa prepoznavanja životinja dugoročno tretiranih magnezijumom, ACTH hormonom i ACTH/Mg kombinacijom tretmana i kontrolne grupe životinja prikazane su na slici 26.



Slika 26. Efekti dugoročnih tretmana na indeks diskriminacije (A) i indeks prepoznavanja (B) u NORT testu. Vrednosti indeksa diskriminacije (D index) i indeksa prepoznavanja (R index) životinja tretiranih magnezijumom 28 dana, ACTH hormonom 21 dan i kombinacijom ACTH/Mg tretmana i kontrolne grupe životinja predstavljene su kao srednje vrednosti \pm S.E.M. Analiza rezultata rađena je jednofaktorskim ANOVA testom. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

U skladu sa rezultatima koji su dobijeni za akutni tretman magnezijumom u eksperimentu 2, tretman magnezijumu u trajanju od 28 dana pokazao je statistički značajno povećanje vrednosti D indeksa i R indeksa u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p < 0,01$, za oba indeksa). Dodatno, statistički značajan efekat na D indeks i R indeks tretman magnezijumom imao je i uz hroničnu aktivaciju HPA osovine tretmanom ACTH hormonom poslednjih 21 dan ($p < 0,001$, za oba indeksa). Izolovana primena ACTH hormona nije pokazala statistički značajne promene u vrednostima D indeksa i R indeksa u odnosu na kontrolnu grupu životinja, kao ni u odnosu na magnezijumom i ACTH/Mg tretirane grupe životinja.

4.1.2. NORT test – vremena istraživanja objekata u test fazi

Sa ciljem ispitivanja prokognitivnih efekata tretmana u NORT testu, korišćen je protokol u kome se očekuje da kontrolne životinje u test fazi nisu zapamtile trening fazu, te da ne prave razliku između novog i poznatog objekta. U tako postavljenom protokolu očekuje se da je vrednost D indeksa kontrolnih životinja približno jednaka nuli, što nam je ukazalo da je možda krucijalno pitanje prilikom analize rezultata "Da li životinje u specifičnoj grupi prave razliku između novog i poznatog objekta?" Na ovo pitanje, odgovor bi mogao da se dobije jednostavnom analizom rezultata t-testom sa ciljem ispitivanja da li je D indeks značajno različit od nule ili t testom parova kako bi se uporedilo vreme provedeno istražujući novi objekat i poznati objekat. Međutim, prilikom višestrukog poređenja, ponavljanje t testa bi moglo da dovede do lažno pozitivnih rezultata.

Dodatno, poređenje diskriminišućih parametra između grupa, D indeksa i R indeksa, korišćenjem ANOVA testa, odgovorilo nam je na pitanje "Koja grupa diskriminiše bolje ili pamti bolje?" ali nismo dobili odgovor na pitanje "Da li kontrolna grupa pamti trening fazu?"

Stoga smo se, sa ciljem dobijanja odgovora na prvo i krucijalno pitanje za svaku grupu, a uzimajući u obzir probleme koji se javljaju prilikom višestrukog korišćenja nezavisnih t-testova, opredelili za ANOVA test ponovljenih merenja (eng. *Repeated Measure ANOVA*), pri čemu je preferencija za objektom faktor eksperimentalne životinje, i praćen je efekat ovog faktora unutar svake eksperimentalne grupe.

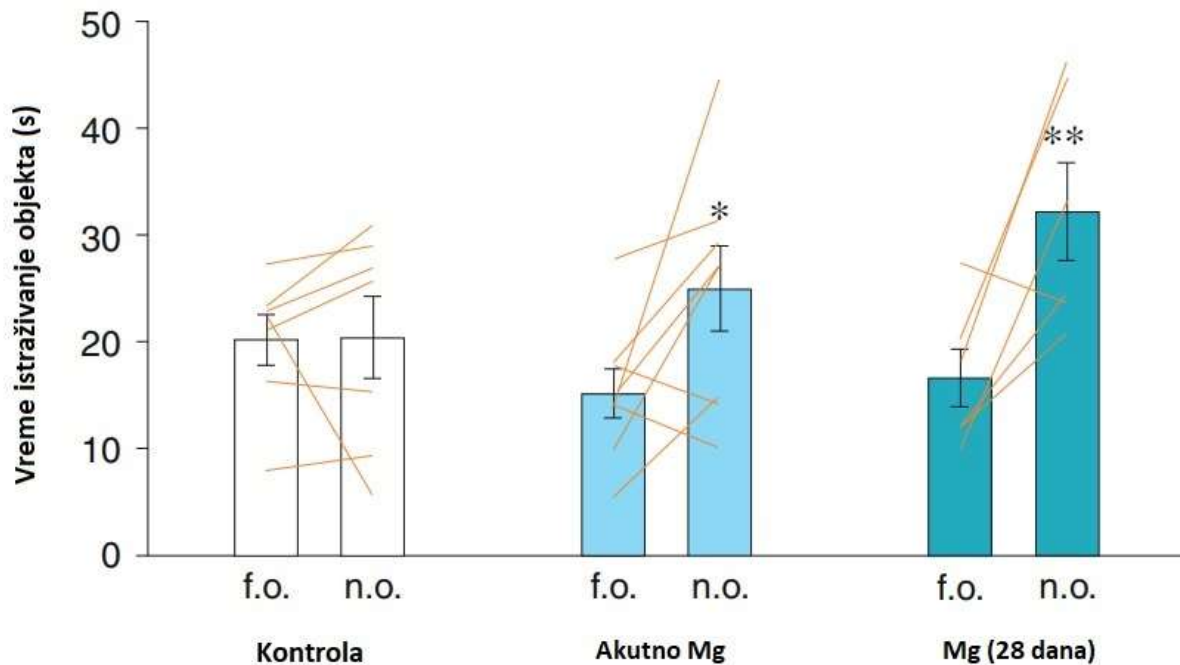
U sva tri eksperimenta analizirano je vreme istraživanja objekta pomoću ANOVA testa ponovljenih merenja, gde je faktor između eksperimentalnih životinja bio tretman, a preferencija za objektom faktor eksperimentalne životinje. Predstavljani su efekti oba faktora, i dodatno pojedinačni efekat faktora životinje (preferencije za objektom), kako bi analizirali koje grupe životinja značajno prave razliku između objekata.

4.1.2.1. Promene u vremenu istraživanja objekata – eksperiment 1

Prilikom analiziranja rezultata prvog eksperimenta, a kako je glavni cilj u ovoj analizi poređenje vremena istraživanja unutar same grupe životinja, pored akutne Mg i kontrolne grupe životinja u analizu rezultata uključena je i grupa životinja dugoročno tretiranih magnezijumom iz trećeg eksperimenta.

Statistička analiza rezultata korišćenjem ponovljenog ANOVA testa pokazala je da nije bilo značajnog efekta tretmana na vreme istraživanja ($F_{(2,18)} = 0,731$; $p = 0,495$), međutim preferencija za objektom je statistički značajno uticala na ovaj parametar ($F_{(1,18)} = 13,251$; $p = 0,002$), a sama interakcija između ova dva faktora pokazala je statistički trend ($F_{(2,18)} = 3,521$; $p = 0,051$).

Daljom analizom pojedinačnog faktora preferencije za objektom na vreme istraživanja, pokazano je da kontrolne životinje ne prave razliku između poznatog (prethodno predstavljenog) i novog objekta ($p = 0,964$), u skladu sa očekivanjima prilikom postavljanja protokola. Nasuprot tome, životinje tretirane akutno ($p = 0,018$) i dugoročno ($p = 0,002$) magnezijumom provele su statistički značajno više vremena u istraživanju novog objekta (Slika 27), što ukazuje na potencijalni prokognitivni efekat tretmana.



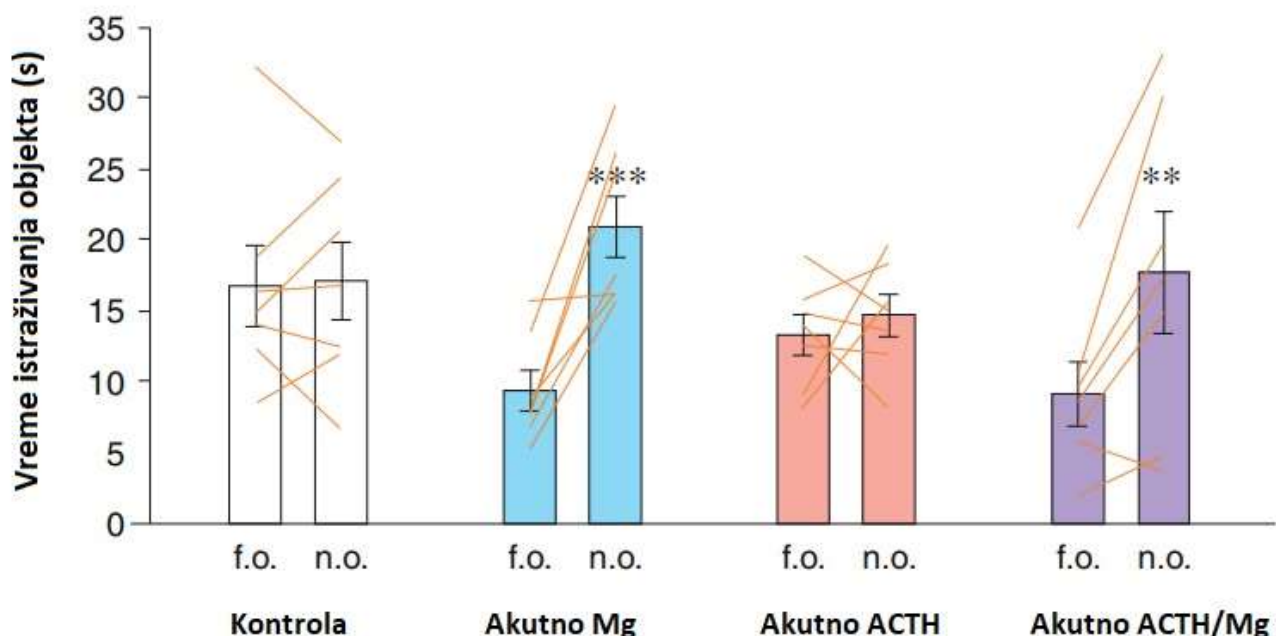
Slika 27. Efekti akutnog i dugoročnog tretmana magnezijumom na vreme istraživanja novog i poznatog objekta u testu dugoročne memorije. Vremena istraživanja objekata u test fazi NORT testa životinja tretiranih akutno i dugoročno, 28 dana, magnezijumom i vremena istraživanja kontrolne grupe predstavljena su kao srednje vrednosti (\pm S.E.M), koje su životinje provele istražujući poznati (f.o) i novi (n.o.) objekat. Vremena pojedinačnih životinja predstavljena su ravnom linijom. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, u odnosu na vreme istraživanja poznatog objekta unutar grupe.

4.1.2.2. Promene u vremenu istraživanja objekata - eksperiment 2

U drugom eksperimentu, ispitivan je efekat akutnih tretmana magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom tretmana na vreme provedeno u istraživanju poznatog i novog objekta u test fazi NORT testa.

Analiza rezultata ponovljenim ANOVA testom pokazala je da tretman nije uticao na vreme istraživanja ($F_{(3,24)} = 0,478$; $p = 0,700$), dok je preferencija za objektom značajno uticala na ovaj parametar ($F_{(1,24)} = 22,677$; $p = 0,000$), kao i interakcija između faktora ($F_{(3,24)} = 5,648$; $p = 0,004$).

Daljom analizom pojedinačnog faktora preferencije za objektom na vreme istraživanja, a u skladu sa rezultatima prvog eksperimenta, pokazano je da kontrolne životinje nisu pravile razliku između poznatog i novog objekta ($p = 0,868$). Dodatno, životinje akutno tretirane ACTH hormonom takođe nisu pokazale statistički značajnu razliku u vremenu istraživanja novog i već poznatog objekta ($p = 0,561$). Međutim, životinje akutno tretirane magnezijumom i u drugom eksperimentu proveli su značajno više vremena istražujući novi objekat u poređenju sa poznatim, kako je prikazano na slici 28. Pored toga, životinje akutno tretirane kombinacijom tretmana Mg i ACTH provele su statistički značajno više vremena istražujući novi objekat ($p = 0,01$).

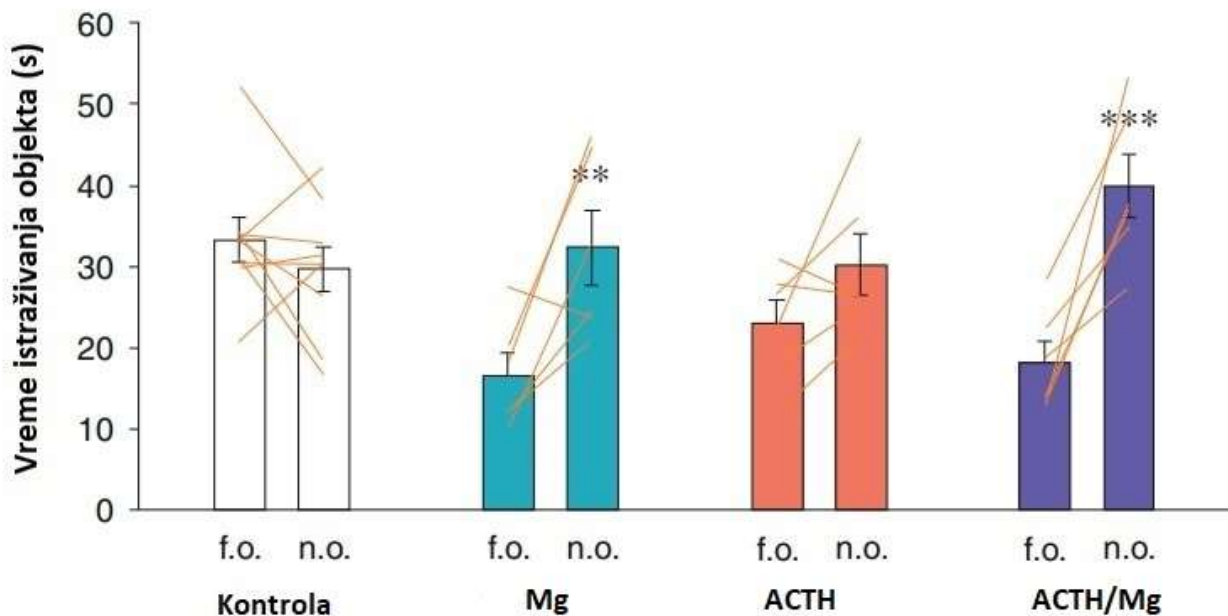


Slika 28. Efekti akutnih tretmana magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom tretmana na vreme istraživanja novog i poznatog objekta u testu dugoročne memorije. Vremena istraživanja objekata u test fazi NORT testa životinja akutno tretiranih magnezijumom, ACTH hormonom i ACTH/Mg kombinacijom tretmana i vremena istraživanja kontrolne grupe predstavljena su kao srednje vrednosti (\pm S.E.M) koje su životinje provele istražujući poznati (f.o) i novi (n.o.) objekat. Vremena pojedinačnih životinja predstavljena su ravnom linijom. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, u odnosu na vreme istraživanja poznatog objekta unutar grupe.

4.1.2.3. Promene u vremenu istraživanja objekata - eksperiment 3

Uticaj dugoročnih tretmana, predstavljen je na slici 29, i pokazano je da efekat tretmana na vreme istraživanja nije signifikantan ($F_{(3,23)} = 1,606$; $p = 0,215$), nasuprot tome preferencija za objektom značajno je uticala na ovaj parametar ($F_{(1,23)} = 24,154$; $p = 0,000$), kao i interakcija između faktora ($F_{(3,23)} = 7,833$; $p = 0,001$).

Analiza pojedinačnog efekta preferencije za objektom pokazala je da kontrolna grupa životinja nije pravila razliku između objekata ($p = 0,324$), što je u skladu sa prethodna dva eksperimenta. Dodatno, pokazano je da ACTH tretman u trajanju od 21 dan nije uticao na eksperimentalne životinje, odnosno ni ACTH grupa životinja nije pravila razliku između objekata ($p = 0,110$). Međutim, pacovi tretirani magnezijumom u trajanju od 28 dana ($p = 0,002$), kao i oni tretirani dugoročno kombinacijom Mg i ACTH tretmana ($p = 0,000$), proveli su statistički značajno više vremena istražujući novi objekat u poređenju sa poznatim objektom.



Slika 29. Efekti dugoročnih tretmana magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom tretmana na vreme istraživanja novog i poznatog objekta u testu dugoročne memorije.

Vremena istraživanja objekata u test fazi NORT testa životinja tretiranih magnezijumom *per os* u trajanju od 28 dana, ACTH hormonom *s.c.* u trajanju od 21 dan i kombinacijom ACTH/Mg tretmana (ACTH *s.c.* 21dan/Mg *per os* 28dana) i vremena istraživanja kontrolne grupe (fiziološki rastvor *s.c.* 21 dan) predstavljena su kao srednje vrednosti (\pm S.E.M), koje su životinje provele istražujući poznati (f.o) i novi (n.o.) objekat. Vremena pojedinačnih životinja predstavljena su ravnom linijom. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, u odnosu na vreme istraživanja poznatog objekta unutar grupe.

4.2. Efekat dugoročnih tretmana na koncentraciju magnezijuma u prefrontalnom korteksu

U cilju evaluacije efekata dugoročnih tretmana na koncentraciju magnezijuma u mozgu životinja, u trećem eksperimentu prve faze istraživanja nakon žrtvovanja životinja izolovan je prefrontalni korteks kao deo limbičkog sistema, moždane strukture uključene u formiranje memorije i u emocionalni odgovor.

Dobijeni rezultati ukazuju da dugoročni tretmani magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom tretmana nisu uticali na koncentraciju magnezijuma u prefrontalnom korteksu. Statističkom analizom podataka nije pokazan statistički značajan efekat magnezijum ($F_{(1,23)} = 0,669$, $p = 0,422$) niti ACTH ($F_{(1,23)} = 0,238$, $p = 0,631$) faktora, kao ni interakcije ova dva faktora ($F_{(1,23)} = 0,253$, $p = 0,620$) na koncentraciju magnezijuma u prefrontalnom korteksu, ispitivano dvofaktorskim ANOVA testom (Tabela 7).

Tabela 7. Koncentracija magnezijuma u prefrontalnom korteksu eksperimentalnih životinja. Koncentracija magnezijuma u prefrontalnom korteksu životinja dugoročno tretiranih magnezijumom u trajanju od 28 dana (Mg grupa), ACTH hormonom u trajanju od 21 dan (ACTH grupa), kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa) i kontrolne grupe životinja predstavljene su kao srednje vrednosti \pm S.E.M. Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji magnezijuma u prefrontalnom korteksu između eksperimentalnih grupa.

Grupa	Koncentracija (mmol/kg)
Kontrola	9,27 \pm 1,47
Mg	9,56 \pm 0,82
ACTH	8,35 \pm 0,71
ACTH/Mg	9,57 \pm 0,68

4.3. Uticaj dugoročnih tretmana na koncentraciju kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja

Kako bi se analizirao uticaj dugoročnih tretmana na aktivnost HPA osovine i utvrdilo da li primena ACTH hormona tokom 21 dana dovodi do aktivacije HPA osovine, određivana je koncentracija kortikosterona u plazmi životinja. Koncentracija kortikosterona u plazmi životinja evaluirana je u sve četiri eksperimentalne grupe i rezultati su predstavljeni u tabeli 8.

Statistička analiza dvofaktorskim ANOVA testom pokazala je statistički značajan efekat ACTH faktora ($F_{(1,24)} = 8,891$, $p = 0,006$) na koncentraciju kortikosterona u plazmi, ali ne i efekat magnezijuma ($F_{(1,24)} = 3,329$, $p = 0,081$). Kako je pokazana i značajna interakcija ova dva faktora ($F_{(1,24)} = 5,365$, $p = 0,029$) urađen je i test za višestruku komparaciju (eng. *All Pairwise Multiple Comparison Procedure, Student-Newman-Keuls Method*) koji je pokazao da je nivo kortikosterona

u plazmi statistički značajno veći kod životinja tretiranih ACTH hormonom u trajanju od 21 dan u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p = 0,001$) i ACTH/Mg tretiranu grupu životinja ($p = 0,008$). Ovi rezultati ukazuju da primena ACTH hormona dovodi do aktivacije HPA osovine, kao što je i očekivano. Međutim rezultati ukazuju da ko-administracija magnezijum tretmana uz ACTH tretman smanjuje ovaj efekat na HPA osovinu.

Tabela 8. Koncentracija kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja. Koncentracija kortikosterona u plazmi životinja dugoročno tretiranih magnezijumom u trajanju od 28 dana (Mg grupa), ACTH hormonom u trajanju od 21 dan (ACTH grupa), kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa) i kontrolne grupe predstavljene su kao srednje vrednosti \pm S.E.M. ** $p < 0,01$ u odnosu na kontrolnu grupu; ## $p < 0,01$ u odnosu na ACTH/Mg grupu.

Grupa	Koncentracija kortikosterona (ng/ml)
Kontrola	205,82 \pm 1,28
Mg	208,78 \pm 1,40
ACTH	237,64 \pm 11,31 **, ##
ACTH/Mg	212,77 \pm 3,58

4.4. Uticaj dugoročnih tretmana na ekspresiju parametara neurogeneze i sinaptogeneze u hipokampusu

Kako je hipokampus struktura za koju je pokazano da je uključena u formiranje, konsolidaciju i pozivanje memorije, a *dentate gyrus* region hipokampusa predstavlja moždanu strukturu za koju je pokazano da tokom čitavog života učestvuje u procesima neurogeneze bilo je značajno odrediti parametre neurogeneze i sinaptogeneze u hipokampusu. BDNF protein se smatra ključnim medijatorom sinaptičke plastičnosti i adultne neurogeneze (Meng et al., 2011), a *doublecortin* (DCX) protein nalazi se u sastavu progenitorskih ćelija i nezrelih nervnih ćelija, dok je nedetektabilan u sastavu zrelih neurona, te se može koristiti kao marker adultne neurogeneze (Brown et al., 2003). Dodatno, protein povezan sa rastom 43 (eng. *Growth-Associated Protein 43*, GAP43) ima značajnu ulogu u sinaptogenezi, regulaciji rasta aksonskih završetaka i regulaciji organizacije citoskeleta u nervnim završetcima (Benowitz i Routtenberg, 1997), te se smatra markerom sinaptičke plastičnosti.

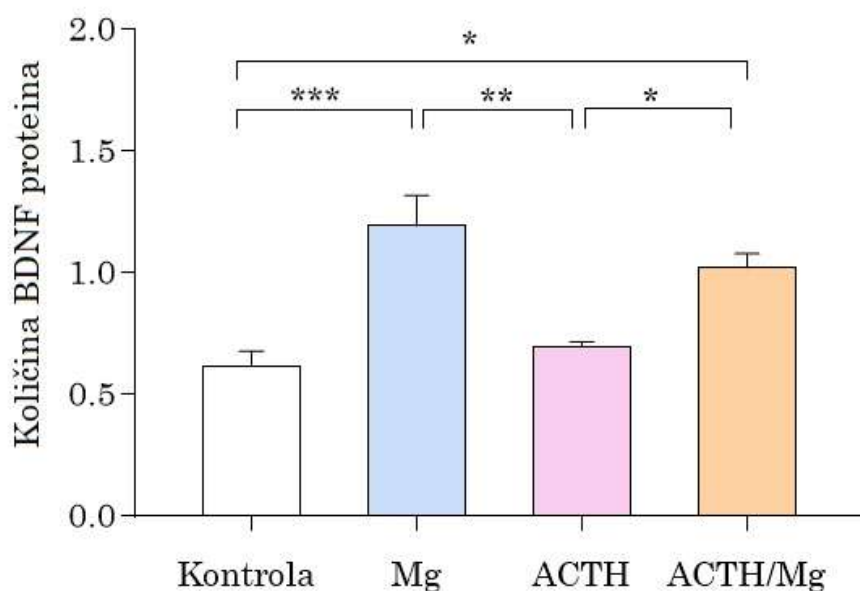
Uzimajući sve navedeno u obzir analizirana je količina proteina neutrofičnog faktora poreklom iz mozga – BDNF i proteina povezanog sa rastom 43 – GAP43 u hipokampusu, kao i gustina ćelija koje ekspimiraju DCX.

4.4.1. Količina BDNF proteina u hipokampusu

Ukupna količina proteina neurotrofičnog faktora poreklom iz mozga (BDNF) određivana je Western blot metodom. Dobijeni rezultati predstavljeni su u arbitralnim jedinicama (a.u.), odnosno normalizovani su u odnosu na β -aktin (Slika 30, Tabela 9).

Pokazano je da četvoronedeljni tretmana magnezijumom ($p < 0,001$) dovodi do značajnog povećanja količine BDNF proteina u hipokampusu u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, kombinacija tretmana ACTH/Mg statistički značajno povećava ukupnu količinu BDNF proteina u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$), što ukazuje da je efekat magnezijuma prisutan i u uslovima aktivacije HPA osovine. Efekat magnezijuma na ukupnu količinu BDNF proteina je u skladu sa rezultatima dobijenim analizom rezultata NORT testa.

Efekti magnezijuma ($p < 0,01$) i kombinacije tretmana magnezijuma i ACTH hormona ($p < 0,05$) na ukupnu količinu BDNF proteina bili su prisutni i u odnosu na ACTH tretiranu grupu životinja. Dodatno, samostalan dugoročni tretman ACTH hormonom nije doveo do značajnog uticaja na količinu BDNF proteina u hipokampusu u odnosu na kontrolnu grupu eksperimentalnih životinja.



Slika 30. Uticaj dugoročnih eksperimentalnih tretmana na količinu BDNF proteina u hipokampusu Wistar pacova. Količina BDNF proteina životinja tretiranih magnezijumom u trajanju od 28 dana (Mg grupa), ACTH hormonom u trajanju od 21 dan (ACTH grupa) i ACTH/Mg kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa; 21dan/28dana) i kontrolne grupe (fiziološki rastvor 21 dan) predstavljene su kao srednje vrednosti (\pm S.E.M). Rezultati su izraženi u arbitralnim jedinicama (a.u.), normalizovani u odnosu na β -aktin. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Tabela 9. Uticaj eksperimentalnih tretmana na količinu BDNF proteina u hipokampusu. Količina BDNF proteina životinja dugoročno tretiranih magnezijumom, ACTH hormonom i ACTH/Mg kombinacijom tretmana i kontrolne grupe predstavljene su kao srednje vrednosti (\pm S.E.M). Rezultati su izraženi u arbitralnim jedinicama (a.u.), normalizovani u odnosu na β -aktin. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, u poređenju sa kontrolnom grupom (a), magnezijum grupom (b) i ACTH grupom (c).

Grupa	Količina BDNF proteina (a.u.)
Kontrola	0,6178 \pm 0,061
Mg	1,194 \pm 0,125 a ***
ACTH	0,6952 \pm 0,023 b**
ACTH/Mg	1,023 \pm 0,058 a* c*

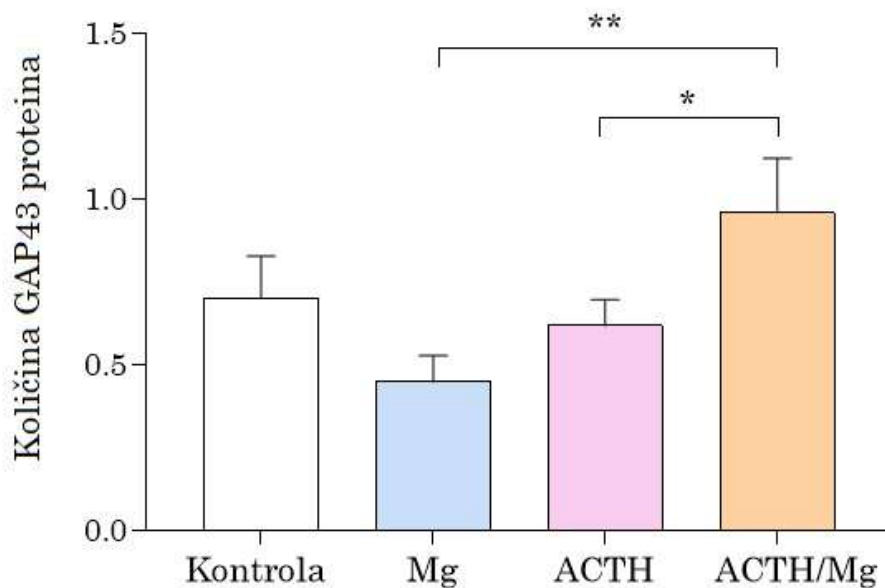
4.4.2. Količina GAP43 proteina u hipokampusu

Ukupna količina proteina povezanog sa rastom 43 (eng. *Growth-associated protein - GAP43*), određivana je Western blot metodom. Dobijeni rezultati predstavljeni su u arbitralnim jedinicama (a.u.), normalizovani u odnosu na β -aktin (Slika 31, Tabela 10).

Pokazano je da tretman magnezijumom u trajanju od četiri nedelje, tretman ACTH hormonom u trajanju od tri nedelje i kombinacija tretmana ne utiču značajno na količinu GAP43 proteina u hipokampusu životinja u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Međutim, kombinacija tretmana ACTH/Mg dovela je do statistički značajnog povećanje količine GAP43 proteina u poređenju sa grupom magnezijumom tretiranih životinja ($p < 0,01$) i ACTH tretmanom tretiranih životinja ($p < 0,05$).

Tabela 10. Uticaj eksperimentalnih tretmana na količinu GAP43 proteina u hipokampusu. Količina GAP43 proteina životinja tretiranih magnezijumom u trajanju od 28 dana (Mg grupa), ACTH hormonom u trajanju od 21 dan (ACTH grupa) i ACTH/Mg kombinacijom tretmana (21dan/28dana) i kontrolne grupe (fiziološki rastvor 21 dan) predstavljene su kao srednje vrednosti (\pm S.E.M). Rezultati su izraženi u arbitralnim jedinicama (a.u.), normalizovani u odnosu na β -aktin. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, u poređenju sa magnezijum grupom (a) i ACTH grupom (b).

Grupa	Količina GAP43 proteina (a.u.)
Kontrola	0,7017 \pm 0,12704
Mg	0,4487 \pm 0,07974
ACTH	0,6176 \pm 0,07905
ACTH/Mg	0,9597 \pm 0,16376 a** b*



Slika 31. Uticaj dugoročnih eksperimentalnih tretmana na količinu GAP43 proteina u hipokampusu Wistar pacova. Količina GAP43 proteina životinja dugoročno tretiranih magnezijumom, ACTH hormonom i ACTH/Mg kombinacijom tretmana i kontrolne grupe predstavljene su kao srednje vrednosti (\pm S.E.M). Rezultati su izraženi u arbitralnim jedinicama (a.u.), normalizovani u odnosu na β -aktin. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

4.4.3. Ekspresija DCX proteina u *dentate gyrus* regionu hipokampusu

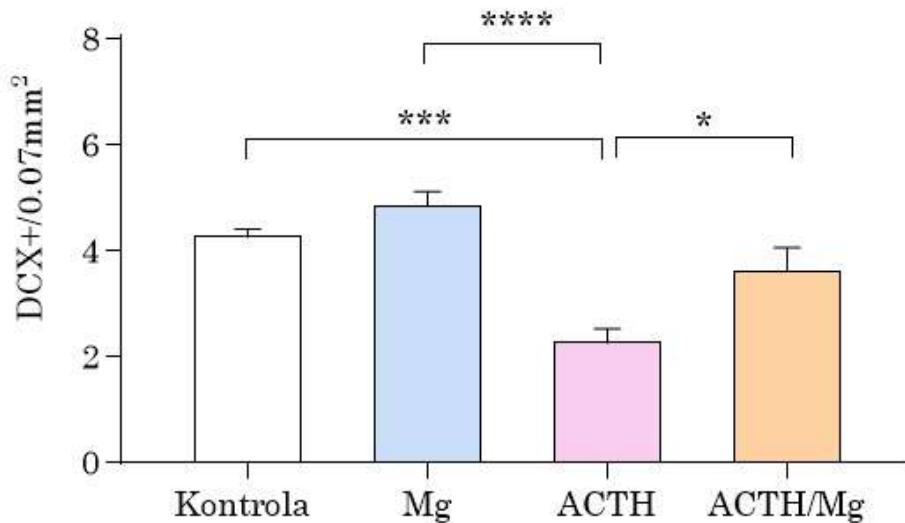
Sa ciljem ispitivanja uticaja dugoročnih tretmana magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom tretmana na ekspresiju *doublecortin* proteina u *dentate gyrus* regionu hipokampusu rađena je imunohistohemijska analiza histoloških preseka hipokampusu. Dobijeni rezultati su predstavljeni kao broj ćelija koje eksprimiraju DCX (DCX+ ćelije) po vidnom polju površine $0,07 \text{ mm}^2$ (Slika 32, Tabela 11).

Tronedeljni tretman ACTH hormonom doveo je do statistički značajnog smanjenja broja DCX+ ćelija u *dentate gyrus* regionu hipokampusu u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p < 0,001$), dodatno ovaj efekat je bio prisutan i u odnosu na Mg tretiranu grupu životinja ($p < 0,0001$) kao i ACTH/Mg tretiranu grupu životinja ($p < 0,05$).

Dugoročni tretman magnezijumom nije doveo do značajnih promena u broju DCX+ ćelija u hipokampusu eksperimentalnih životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, magnezijum u kombinaciji sa ACTH hormonom (ACTH/Mg grupa) anulirao je negativni efekat koji je pokazao tretman ACTH hormonom ($p < 0,05$).

Tabela 11. Uticaj dugoročnih eksperimentalnih tretmana na gustinu ćelija koje eksprimiraju DCX protein u dentate gyrus regionu hipokampusu. Broj ćelija koje eksprimiraju DCX (DCX+), po vidnom polju 0,07mm², životinja dugoročno tretiranih magnezijumom (Mg grupa), ACTH hormonom (ACTH grupa) i ACTH/Mg kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa) kao i kontrolne grupe životinja predstavljen je kao srednja vrednost (± S.E.M). ****p<0,0001, ***p<0,001, *p<0,05, u poređenju sa kontrolom grupom (a), magnezijum grupom (b) i ACTH grupom životinja (c).

Grupa	DCX+/0,07mm ²
Kontrola	4,273 ± 0,145
Mg	4,848 ± 0,280
ACTH	2,269 ± 0,272 a*** b****
ACTH/Mg	3,622 ± 0,447 c*

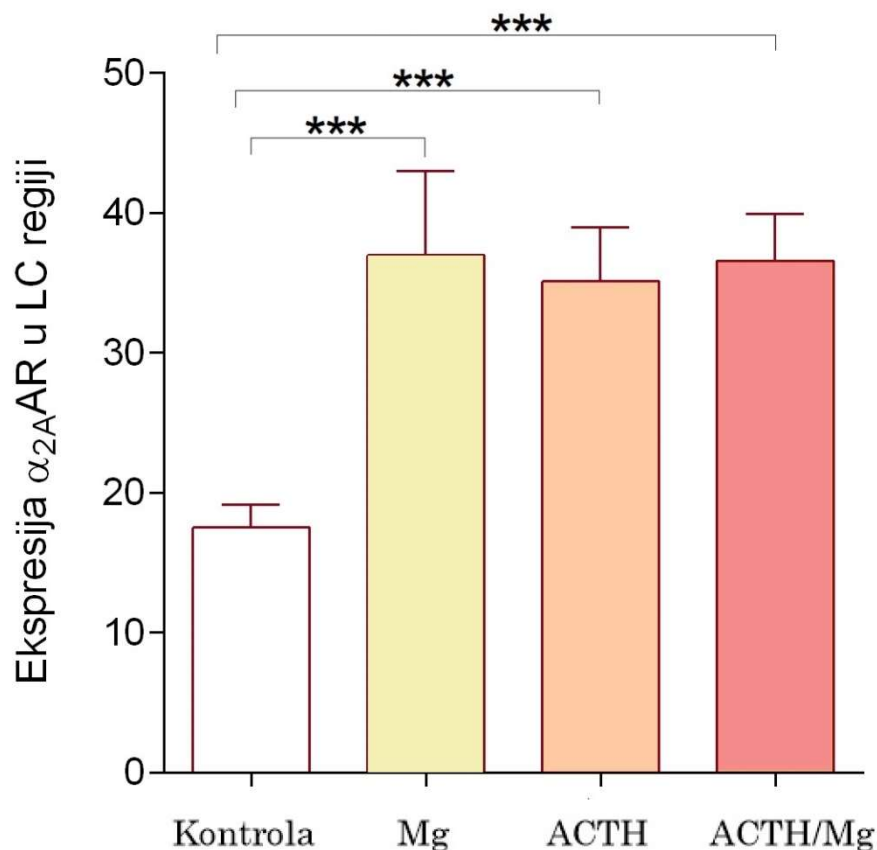


Slika 32. Uticaj eksperimentalnih tretmana na broj ćelija koje eksprimiraju DCX protein u dentate gyrus regionu hipokampusu. Broj ćelija koje eksprimiraju DCX (DCX+), izražen po vidnom polju 0,07mm², životinja tretiranih magnezijumom u trajanju od 28 dana, ACTH hormonom u trajanju od 21 dan i ACTH/Mg kombinacijom tretmana (21dan/28dana) i kontrolne grupe (fiziološki rastvor 21 dan) predstavljen je kao srednja vrednost (± S.E.M). ****p<0,0001, ***p<0,001, * p<0,05.

4.5. Efekat dugoročnih tretmana na ekspresiju alpha-2A adrenergičkih receptora u *Locus ceruleus*-u

Sa ciljem ispitivanja uticaja dugoročnih tretmana magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacije tretmana na ekspresiju alpha-2A adrenergičkih receptora (α 2A-AR) u *Locus ceruleus* (LC) regionu rađena je imunohistohemijska analiza histoloških preseka LC-a. Rezultati dobijeni imunohistohemijskom analizom predstavljeni su kao broj ćelija koje ekspresiraju alpha-2A adrenoceptori (α 2A-AR) i izraženi su po vidnom polju 0,07mm² (Slika 33).

Tronedeljni tretman ACTH hormonom doveo je do statistički značajnog povećanja gustine ekspresije alpha-2A adrenergičkih receptora (α 2A-AR) u LC regionu u odnosu na kontrolnu grupu životinja (p < 0,001). Dugoročni tretmani magnezijumom i kombinacijom tretmana magnezijumom i ACTH hormonom (ACTH/Mg grupa) pokazali su sličan efekat (p < 0,001; p < 0,001).



Slika 33. Uticaj eksperimentalnih tretmana na gustinu ćelija koje ekspresiraju alpha 2A-adrenergičke receptore (α 2A-AR). Broj ćelija koje ekspresiraju α 2A-AR u LC regiji, izražen po vidnom polju 0,07mm², životinja tretiranih magnezijumom u trajanju od 28 dana, ACTH hormonom u trajanju od 21 dan i ACTH/Mg kombinacijom tretmana (21dan/28dana) i kontrolne grupe (fiziološki rastvor 21 dan) predstavljen je kao srednja vrednost (\pm S.E.M). ***p<0,001.

4.6. Uticaj tretmana na oksidativna oštećenja DNK molekula, na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Pokazano je da povećanje aktivnosti HPA osovine dovodi do značajnih metaboličkih promena, a takođe i do promena u oksidativnom statusu i aktivnosti antioksidativnih enzima (Liu et al., 1996; Stanić et al., 2016). Sa druge strane, na osnovu dosadašnjih studija o uticaju Mg na metaboličke procese, moglo bi se pretpostaviti da dugoročni tretman magnezijumom može uticati na ravnotežu parametara oksidativnog statusa (Ścibior et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Stoga, u cilju ispitivanja potencijalnih efekata povećane aktivnost HPA osovine i dugoročnog tretmana magnezijumom, praćeno je oksidativno oštećenje DNK molekula perifernih limfocita. Pored toga praćeni su parametri oksidativnog statusa: superoksid anjon, totalni oksidativni status i koncentracija produkata oksidacije proteina, kao i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite superoksid dizmutaze i paraoksonaze 1.

4.6.1. Oštećenja DNK molekula perifernih limfocita

Efekti dugoročnih tretmana magnezijumom, adrenokortikotropnim hormonom i kombinacijom Mg i ACTH tretmana na DNK perifernih limfocita praćeni su *Comet* testom. Rezultati su predstavljeni kao ukupan broj ćelija sa DNK oštećenjem od 100 analiziranih ćelija, kao i broj ćelija umerenog DNK oštećenja i broj ćelija visokog DNK oštećenja (Slike 34 i 35).

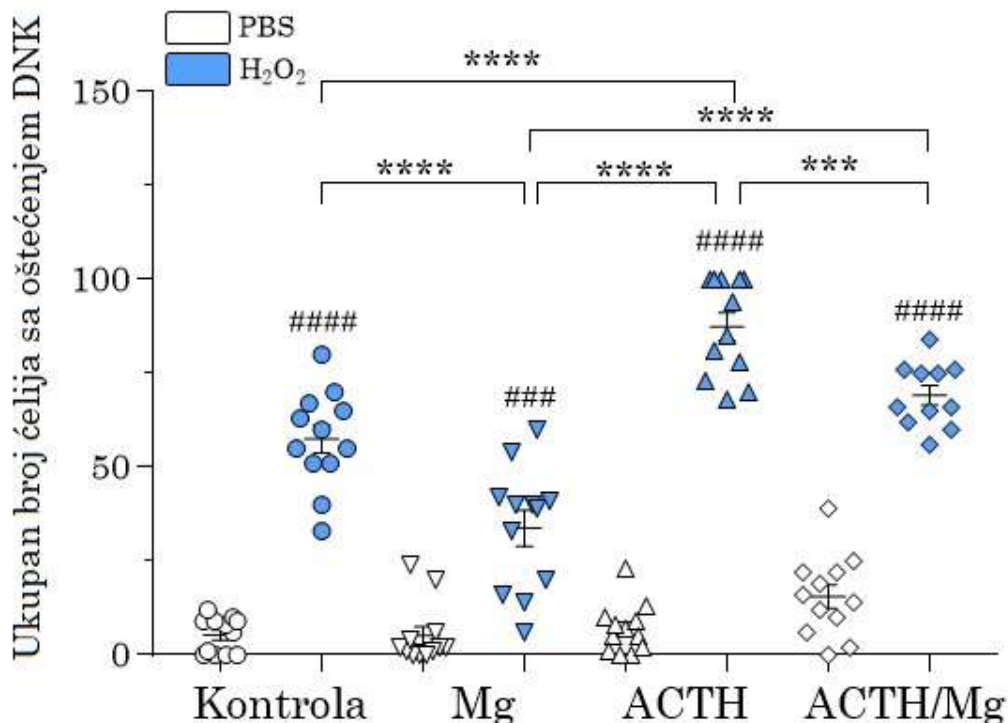
Rezultati komet testa za svaku eksperimentalnu grupu predstavljeni su kao totalni komet skor (eng. *total comet score* - TCS) koji je izračunat množenjem broja ćelija date kategorije sa odgovarajućom kategorijom (Khisroon et al., 2015). Dodatno, komet skor je izračunat i analiziran za umereno oštećene ćelije (eng. *medium damaged comet score* - MDCS) i za visoko oštećene ćelije (eng. *highly damaged comet score* - HDCS) (Stanić et al., 2016) (Tabele 12 i 13, Slika 36).

4.6.1.1. Ukupni broj perifernih limfocita sa DNK oštećenjem

Inkubacija perifernih limfocita sa PBS-om nije pokazala statistički značajnu razliku u ukupnom broju perifernih limfocita sa DNK oštećenjem između eksperimentalnih grupa, međutim razlika je primećena nakon inkubacije sa H₂O₂ (Slika 34). Statistički značajno povećanje ukupnog broja ćelija sa DNK oštećenjem primećeno je u svakoj eksperimentalnoj grupi nakon inkubacije perifernih limfocita sa H₂O₂.

Statistički značajan efekat tretmana ($F_{(3,87)} = 31,13$, $p < 0,0001$), prisustva H₂O₂ ($F_{(1,87)} = 586$, $p < 0,0001$) i interakcije između tretmana i prisustva H₂O₂ ($F_{(3,87)} = 23,14$, $p < 0,0001$) dobijen je dvofaktorskim ANOVA testom. Ukupan broj ćelija sa DNK oštećenjem značajno je povećan kod ACTH tretirane grupe životinja u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p < 0,0001$), dok je ovaj efekat izostao kod ACTH/Mg tretirane grupe životinja. Naprotiv, ukupni broj ćelija sa DNK oštećenjem u ACTH/Mg tretiranoj grupi životinja je značajno smanjen u odnosu na ACTH tretiranu grupu životinja ($p < 0,001$).

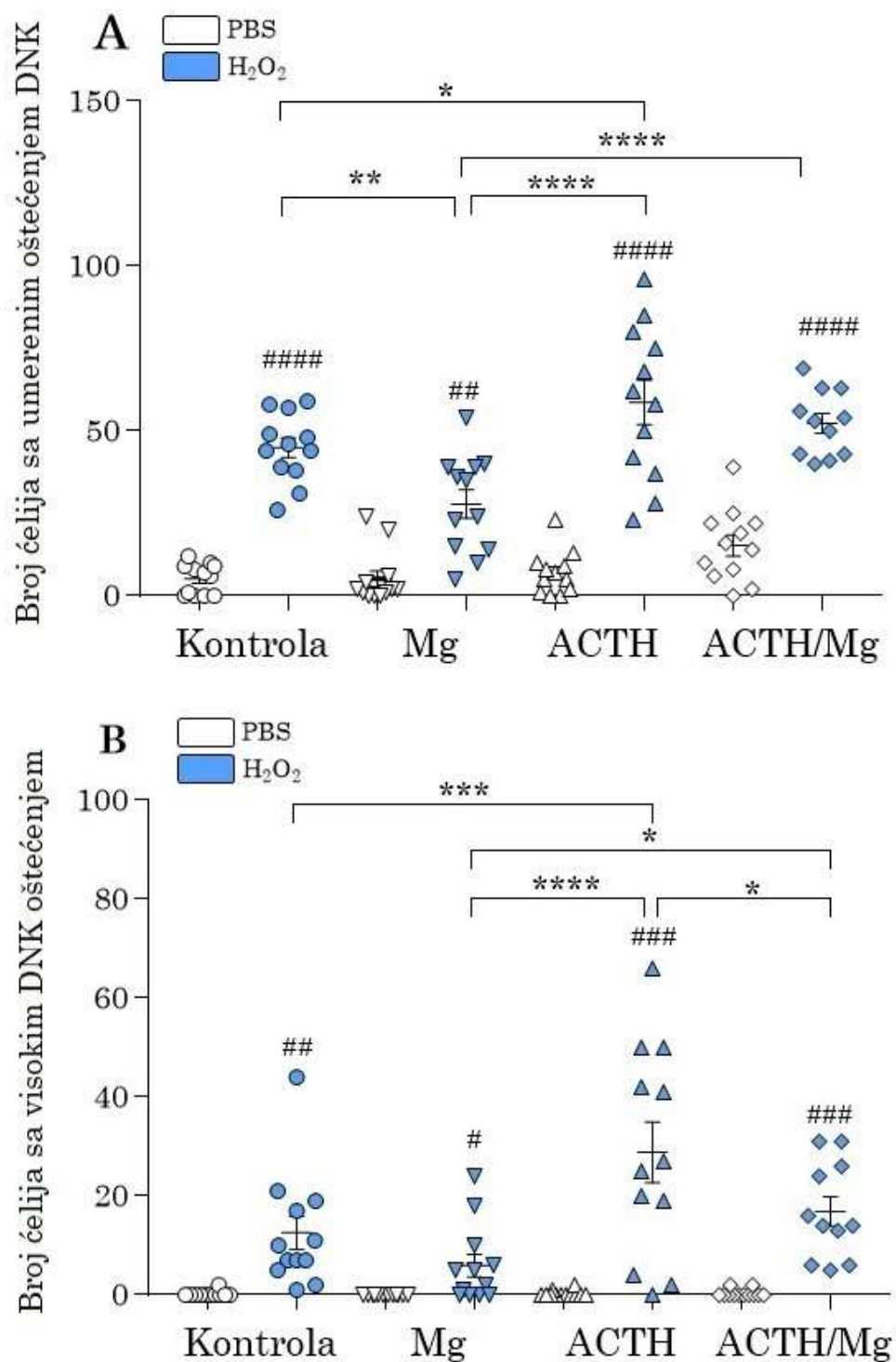
Rezultati su pokazali da je tretman magnezijumom značajno smanjio ukupni broj ćelija sa oštećenjem DNK molekula u poređenju sa kontrolnom grupom životinja ($p < 0,0001$), ali i u poređenju sa ACTH ($p < 0,0001$) i ACTH/Mg ($p < 0,0001$) grupama životinja.



Slika 34. Uticaj eksperimentalnih tretmana na ukupan broj ćelija sa oštećenjem DNK molekula. Periferni limfociti pacova Wistar soja tretiranih magnezijumom *per os* 28 dana (Mg grupa), adrenokortikotropnim hormonom *s.c.* 21 dan (ACTH grupa), kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa) i fiziološkim rastvorom *s.c.* 21 dan (kontrolna grupa) inkubirani su *in vitro* sa PBS-om ili H₂O₂. Analiza je rađena na 100 ćelija po svakom uzorku, i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, u poređenju PBS ili H₂O₂ tretiranih uzoraka između eksperimentalnih grupa; #### $p < 0,0001$, ### $p < 0,001$, u poređenju PBS i H₂O₂ tretiranih uzoraka unutar eksperimentalne grupe.

4.6.1.2. Stepen DNK oštećenja perifernih limfocita: ćelije sa umerenim i ćelije sa visokim oštećenjem DNK molekula

Stepen oštećenja DNK molekula u perifernim limfocitima evaluiran je u sve četiri eksperimentalne grupe životinja, u prisustvu i u odsustvu inkubacije sa H₂O₂ (Slika 35). Inkubacija ćelija sa H₂O₂ statistički značajno je povećala broj ćelija umerenog i visokog DNK oštećenja u poređenju sa odsustvom inkubacije kod svih eksperimentalnih grupa životinja.



Slika 35. Uticaj eksperimentalnih tretmana na stepen oštećenja DNK molekula perifernih limfocita: broj ćelija sa umerenim DNK oštećenjem (A) i broj ćelija sa visokim DNK oštećenjem (B). Periferni limfociti pacova Wistar soja tretiranih magnezijumom *per os* 28 dana (Mg grupa), adrenokortikotropnim hormonom *s.c.* 21 dan (ACTH grupa), kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa) i fiziološkim rastvorom *s.c.* 21 dan (kontrolna grupa) inkubirani su *in vitro* sa PBS-om ili H₂O₂. Ćelije sa umerenim DNK oštećenjem predstavljaju zbir ćelija kategorije 1 i 2 (oštećenja između 5% i 40% u odnosu na neoštećene ćelije), dok ćelije sa visokim DNK oštećenjem predstavljaju zbir ćelija kategorija 3

i 4 (oštećenja preko 40% u odnosu na neoštećene ćelije). Analiza je rađena na 100 ćelija po svakom uzorku i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, poređenje PBS ili H_2O_2 tretiranih uzoraka između eksperimentalnih grupa; #### $p < 0,0001$, ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$, poređenje PBS i H_2O_2 tretiranih uzoraka unutar eksperimentalne grupe.

Broj ćelija umerenog DNK oštećenja analiziran je dvofaktorskim ANOVA testom koji je pokazao značajan efekat tretmana ($F_{(3,87)} = 10,01$, $p < 0,0001$) i prisustva H_2O_2 ($F_{(1,87)} = 221,6$, $p < 0,0001$), kao i postojanja interakcije između tretmana i prisustva H_2O_2 ($F_{(3,87)} = 5,596$, $p = 0,0015$). Broj umereno oštećenih ćelija je signifikantno povećan kod ACTH tretirane grupe životinja u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,05$). Nasuprot tome, slično efektu tretmana magnezijuma na ukupan broj DNK oštećenih ćelija, tretman magnezijumom je smanjio broj umereno oštećenih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($p < 0,01$), ali i u odnosu na ACTH grupu ($p < 0,0001$) i ACTH/Mg grupu životinja ($p < 0,0001$).

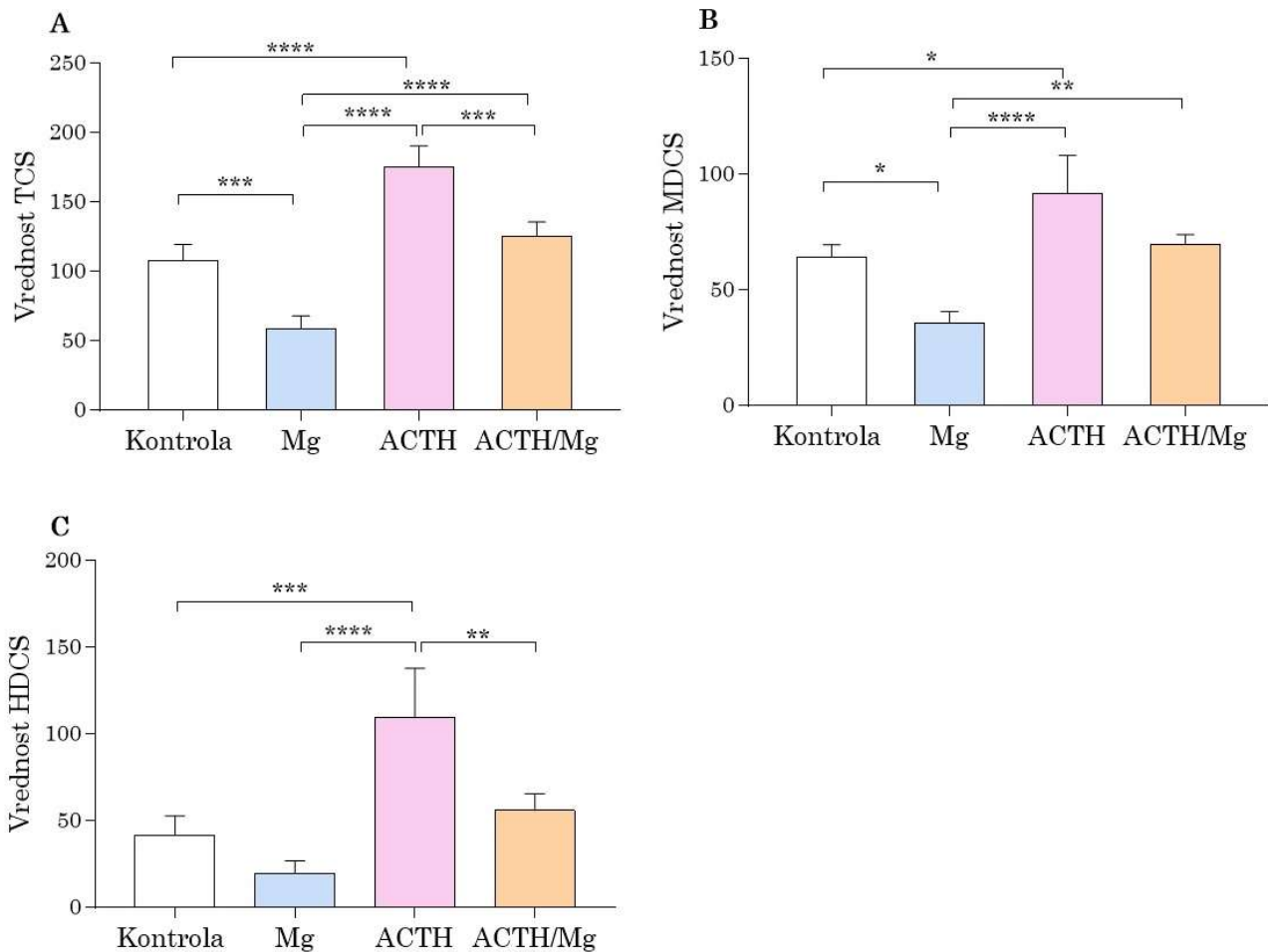
Signifikantan efekat tretmana ($F_{(3,87)} = 6,105$, $p = 0,0008$), prisustva H_2O_2 ($F_{(1,87)} = 64,12$, $p < 0,0001$) i interakcije ova dva faktora ($F_{(3,87)} = 5,857$, $p = 0,0011$) pokazan je i na broju ćelija sa visokim do maksimalnim oštećenjem DNK molekula. Povećanje broja visoko oštećenih ćelija primećeno je kod ACTH tretirane grupe životinja u poređenju sa ostale tri eksperimentalne grupe. ACTH tretman je pokazao značajno povećanje broja ćelija visokog DNK oštećenja u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$), dok je ovaj efekat izostao kod ACTH/Mg tretirane grupe životinja. U skladu sa rezultatima dobijenim za ukupan broj DNK oštećenih ćelija, kombinacija ACTH i Mg tretmana pokazala je smanjenje i u broju ćelija visokog DNK oštećenja u poređenju sa ACTH tretiranom grupom ($p < 0,05$). Značajan efekat magnezijuma na visoko oštećene ćelije nije primećen u odnosu na kontrolnu grupu životinja, ali je primećen u poređenju sa ACTH ($p < 0,0001$) i ACTH/Mg ($p < 0,05$) grupama životinja.

4.6.1.3. Promene nivoa totalnog komet skora (TCS), komet skora umereno oštećenih ćelija (MDCS) i komet skora visoko oštećenih ćelija (HDCS)

Statistička analiza vrednosti TCS dvofaktorskim ANOVA testom pokazala je signifikantan efekat tretmana ($F_{(3,87)} = 17,89$, $p < 0,0001$), prisustva H_2O_2 ($F_{(1,87)} = 320,6$, $p < 0,0001$) i interakcije ova dva faktora ($F_{(3,87)} = 15,2$, $p < 0,0001$). Takođe, statistička analiza vrednosti MDCS pokazala je signifikantan efekat tretmana ($F_{(3,87)} = 6,78$, $p = 0,0004$), prisustva H_2O_2 ($F_{(1,87)} = 137,5$, $p < 0,0001$) i interakcija ova dva faktora ($F_{(3,87)} = 5,396$, $p = 0,0019$), kao i statistička analiza vrednosti HDCS, efekat tretmana ($F_{(3,85)} = 6,755$, $p = 0,0004$), prisustva H_2O_2 ($F_{(1,85)} = 57,84$, $p < 0,0001$) i interakcije ova dva faktora ($F_{(3,85)} = 6,379$, $p = 0,0006$).

U skladu sa rezultatima dobijenim za totalni broj oštećenih ćelija, za broj ćelija sa umerenim oštećenjem DNK i za broj ćelija sa visokim oštećenjem DNK nakon *in vitro* inkubacije sa H_2O_2 , ACTH tretman je značajno povećao totalni komet skor ($p < 0,0001$), komet skor umereno oštećenih ćelija ($p < 0,05$) i komet skor visoko oštećenih ćelija ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Slika 36, Tabela 12). Efekat tretmana ACTH u poređenju sa kontrolnom grupom životinja izostao je kod eksperimentalnih životinja tretiranih ACTH hormonom u kombinaciji sa magnezijumom (ACTH/Mg grupa). Pored toga, ACTH/Mg tretirana grupa životinja pokazala je značajno smanjenje totalnog komet skora ($p < 0,001$) i komet skor visoko oštećenih ćelija ($p < 0,01$) u poređenju sa ACTH grupom životinja.

Suplementacija magnezijumom u Mg grupi pokazala je značajno smanjenje totalnog komet skora ($p < 0,001$) i komet skora umereno oštećenih ćelija ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Slika 36, Tabela 12). Pored toga, tretman magnezijumom pokazao je statistički značajno smanjenje sva tri skora (TCS, MDCS i HDCS) u poređenju sa ACTH grupom i statistički značajno smanjenje totalnog komet skora i komet skora umereno oštećenih ćelija u poređenju sa ACTH/Mg tretiranom grupom životinja.



Slika 36. Vrednosti totalnog komet skora – TCS (A), komet skora umereno DNK oštećenih ćelija - MDCS (B) i visoko DNK oštećenih ćelija - HDCS (C) nakon *in vitro* inkubacije sa H_2O_2 . Periferni limfociti pacova Wistar soja tretiranih magnezijumom *per os* 28 dana (Mg grupa), adrenokortikotropnim hormonom *s.c.* 21 dan (ACTH grupa), kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa) i fiziološkim rastvorom *s.c.* 21 dan (kontrolna grupa) su *in vitro* inkubirani sa H_2O_2 . Odgovarajući komet skorovi su izračunati množenjem broja ćelija date kategorije sa samom kategorijom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Tabela 12. Totalni komet skor (TCS), komet skor umereno DNK oštećenih ćelija (MDCS) i visoko DNK oštećenih ćelija (HDCS) nakon *in vitro* inkubacije sa H₂O₂. Periferni limfociti pacova Wistar soja tretiranih dugoročno magnezijumom (Mg grupa), adrenokortikotropnim hormonom (ACTH grupa) i kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa), kao i kontrolne grupe, *in vitro* su inkubirani sa H₂O₂. Odgovarajući komet skorovi su izračunati množenjem broja ćelija date kategorije sa samom kategorijom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. ****p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05, u poređenju sa kontrolom (a), magnezijum grupom (b) i ACTH grupom (c).

H ₂ O ₂				
	Kontrola	Mg	ACTH	ACTH/Mg
TCS	107,917 ± 11,789	59,083 ± 9,129 a***	175,667 ± 15,053 a**** b****	125,727 ± 10,306 b**** c ***
MDCS	64,333 ± 5,369	35,833 ± 5,016 a*	91,917 ± 16,448 a* b****	69,727 ± 4,361 b**
HDCS	41,833 ± 11,159	19,667 ± 7,404	109,6 ± 28,435 a*** b ****	56 ± 9,705 c**

U skladu sa rezultatima dobijenim za totalni broj oštećenih ćelija, za broj ćelija sa umerenim oštećenjem DNK i za broj ćelija sa visokim oštećenjem DNK, *in vitro* inkubacija perifernih limfocita sa PBS-om nije pokazala statistički značajnu razliku u vrednosti komet skorova (TCS, MDCS i HDCS) između eksperimentalnih grupa (Tabela 13).

Tabela 13. Totalni komet skor (TCS), komet skor umereno DNK oštećenih ćelija (MDCS) i visoko DNK oštećenih ćelija (HDCS) nakon *in vitro* inkubacije sa PBS-om. Periferni limfociti pacova Wistar soja tretiranih dugoročno magnezijumom (Mg grupa), adrenokortikotropnim hormonom (ACTH grupa) i kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa), kao i kontrolne grupe, inkubirani su *in vitro* sa PBS-om. Odgovarajući komet skorovi su izračunati množenjem broja ćelija date kategorije sa samom kategorijom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. Nije bilo statistički značajnih razlika u komet skorovima nakon *in vitro* inkubacije sa PBS-om između eksperimentalnih grupa.

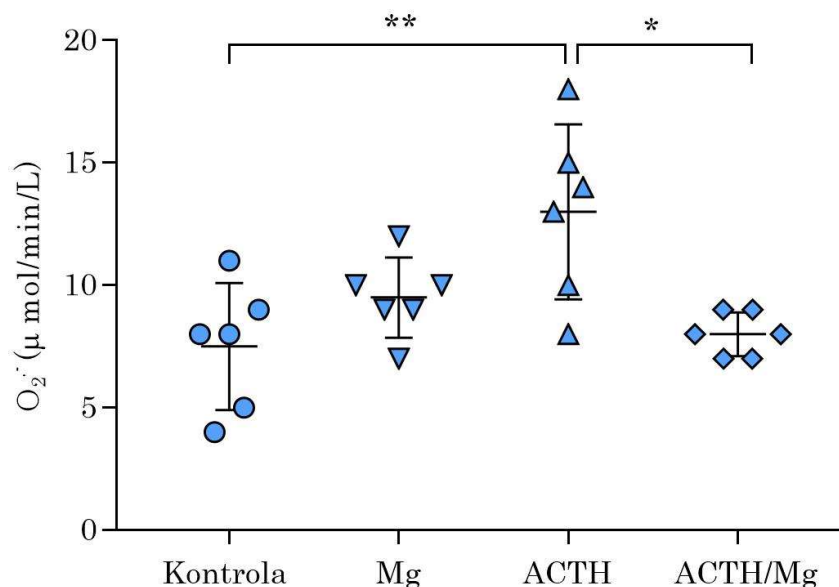
PBS				
	Kontrola	Mg	ACTH	ACTH/Mg
TCS	6,417 ± 1,69	5,417 ± 2,385	8,583 ± 2,265	18,583 ± 3,338
MDCS	5,917 ± 1,583	5,417 ± 2,385	7,25 ± 2,161	16,917 ± 3,29
HDCS	0,5 ± 0,5	0 ± 0	1,333 ± 0,801	1 ± 0,674

4.6.2. Efekti dugoročnih tretmana magnezijumom, adrenokortikotropnim hormonom i kombinacije tretmana na markere oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi Wistar pacova

Sa ciljem ispitivanja efekata dugoročnih tretmana magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacije tretmana na oksidativni stres u plazmi pacova Wistar soja određivani su markeri oksidativnog stresa: superoksid anjon, totalni oksidativni status i koncentracija produkata oksidacije proteina, kao i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite superoksid dizmutaze i paraoksonaze 1.

4.6.2.1. Promene vrednosti nivoa superoksid anjona - $O_2^{\cdot-}$

Kao što je prikazano na slici 37 dugoročni tretman ACTH hormonom, u trajanju od 21 dan, doveo je do statistički značajnog povećanja nivoa superoksid anjona u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,01$). Sa druge strane, efekat ACTH hormona je anuliran dugoročnom suplementacijom magnezijumom, tačnije nivo superoksid anjona kod životinja iz ACTH/Mg grupe nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu životinja, a dodatno statistički je značajno niži u odnosu na ACTH grupu ($p < 0,05$). Međutim, samostalna suplementacija magnezijumom nije dovela do značajnog efekta na nivo superoksid anjona u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Slika 37, Tabela 14).



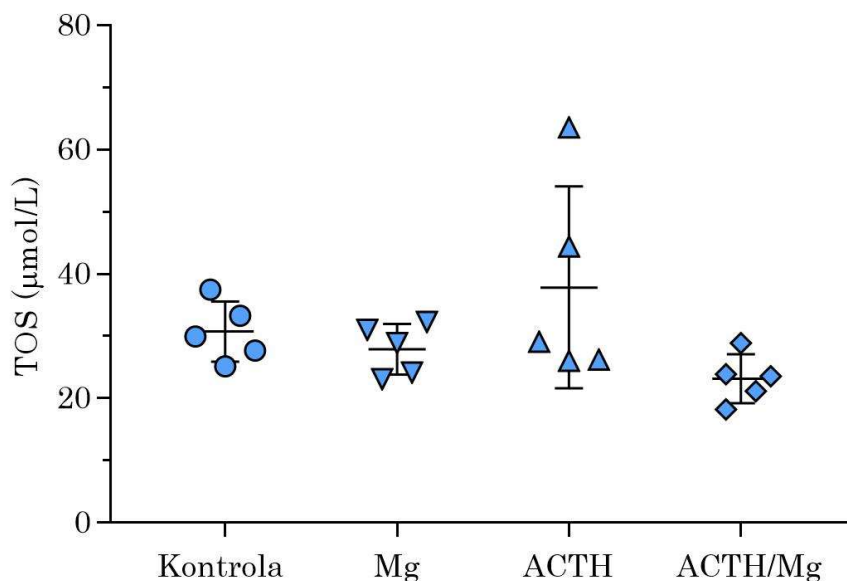
Slika 37. Uticaj eksperimentalnih tretmana na nivo superoksid anjona. Nivo superoksid anjona određivan je u plazmi pacova Wistar soja dugoročno tretiranih magnezijumom, adrenokortikotropnim hormonom i kombinacijom tretmana (ACTH/Mg), kao i kod kontrolne grupe. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Tabela 14. Vrednosti markera oksidativnog stresa: O_2^- , TOS i AOPP. Nivoi markera oksidativnog stresa određivani su u plazmi pacova Wistar soja dugoročno tretiranih magnezijumom, adrenokortikotropnim hormonom i kombinacijom tretmana (ACTH/Mg) kao i kod kontrolne grupe. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, u poređenju sa kontrolom (a), magnezijum grupom (b) i ACTH grupom (c).

Markeri oksidativnog stresa				
	Kontrola	Mg	ACTH	ACTH/Mg
O_2^- $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$	$7,5 \pm 1,057$	$9,5 \pm 0,671$	$13 \pm 1,461$ a**	$8 \pm 0,365$ c*
TOS $\mu\text{mol}/\text{L}$	$30,74 \pm 2,164$	$27,9 \pm 1,831$	$37,86 \pm 7,268$	$23,14 \pm 1,76$
AOPP $\mu\text{mol}/\text{L}$	$93,11 \pm 3,797$	$51,3 \pm 9,835$ a**	$89,63 \pm 7,451$ b**	$69,75 \pm 6,915$

4.6.2.2. Promene vrednosti totalnog oksidativnog status - TOS

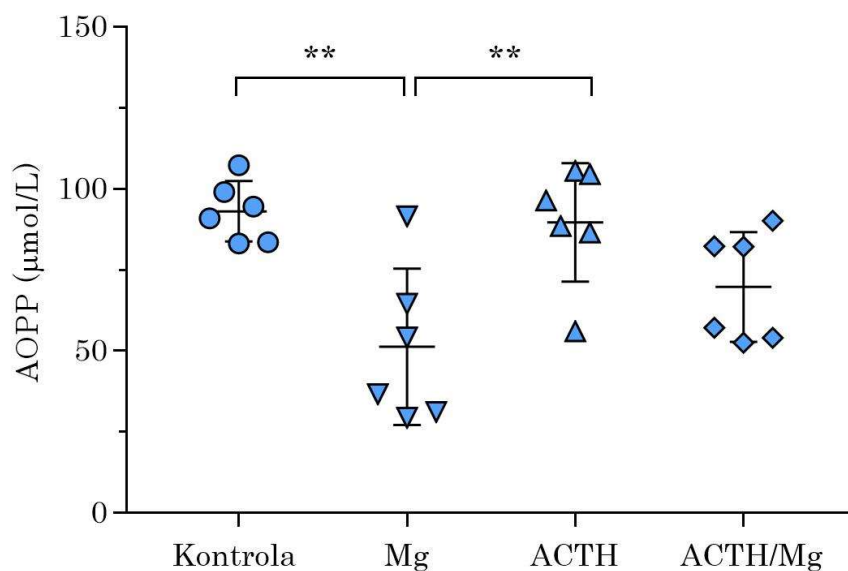
Vrednosti totalnog oksidativnog statusa prikazane su na slici 38 i u tabeli 14. Dugoročni tretmani magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom tretmana nisu doveli do značajne promene u vrednosti totalnog oksidativnog statusa u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Pored toga, razlika u vrednosti totalnog oksidativnog statusa između grupa nije postojala.



Slika 38. Uticaj eksperimentalnih tretmana na totalni oksidativni status. TOS je određivan u plazmi pacova Wistar soja tretiranih magnezijumom *per os* u trajanju od 28 dana, adrenokortikotropnim hormonom *s.c.* u trajanju od 21 dan, kombinacijom tretmana (ACTH/Mg) i kod kontrolne grupe. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. Nije bilo statistički značajnih razlika u vrednostima TOS-a između eksperimentalnih grupa.

4.6.2.3. Promene koncentracije produkata oksidacije proteina – AOPP

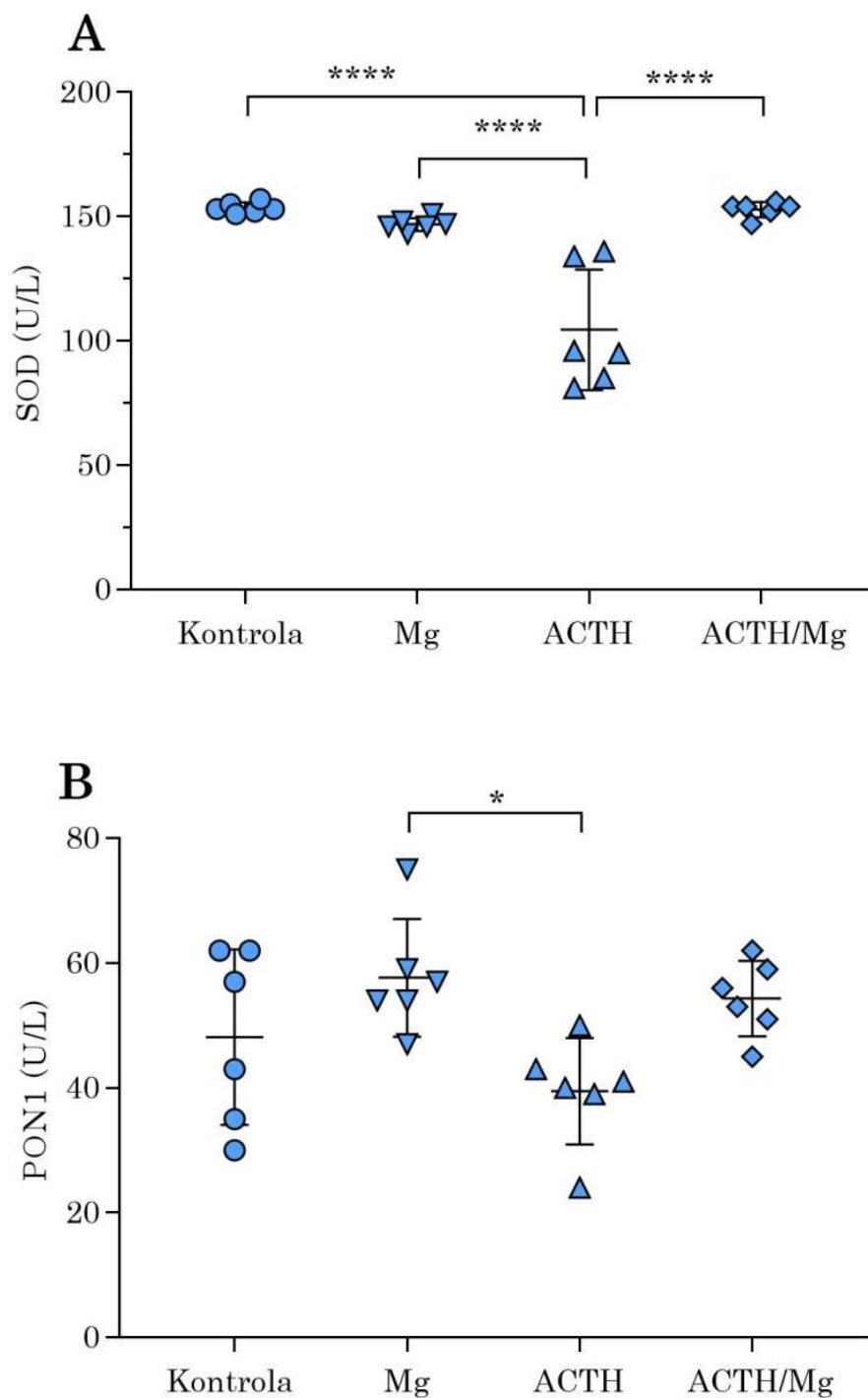
Kao što je prikazano na slici 39 tretman magnezijumom u trajanju od 28 dana doveo je do značajnog smanjenja koncentracije produkata oksidacije proteina u plazmi Wistar pacova u poređenju sa kontrolnom grupom životinja ($p < 0,01$). Dodatno, efekat magnezijuma bio je prisutan i u poređenju sa ACTH tretiranom grupom životinja ($p < 0,01$). Međutim, ovaj efekat magnezijuma u poređenju sa kontrolnom grupom životinja izostao je kod životinja tretiranih u kombinaciji sa ACTH hormonom (ACTH/Mg grupa). Dodatno, dugoročni tretman ACTH hormonom nije doveo do promene u koncentraciji AOPP (Slika 39, Tabela 14).



Slika 39. Uticaj eksperimentalnih tretmana na AOPP. Koncentracija AOPP određivana je u plazmi pacova Wistar soja tretiranih magnezijumom *per os* u trajanju od 28 dana, adrenokortikotropnim hormonom *s.c.* u trajanju od 21 dan, kombinacijom tretmana (ACTH/Mg) i kod kontrolne grupe. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. ** $p < 0,01$.

4.6.2.4. Promene aktivnosti enzima superoksid dizmutaze – SOD u plazmi

Na slici 40 prikazana je aktivnost enzima superoksid dizmutaze u plazmi pacova Wistar soja tretiranih magnezijumom u trajanju od 28 dana, ACTH hormonom u trajanju od 21 dan, kombinacijom tretmana ili tretiranih fiziološkim rastvorom - kontrolna grupa (Slika 40A, Tabela 15).



Slika 40. Uticaj eksperimentalnih tretmana na aktivnost enzima antioksidativne zaštite superoksid dizmutaze - SOD (A) i paraoksonaze 1 - PON1 (B). Aktivnost enzima određivana je u plazmi pacova Wistar soja dugoročno tretiranih magnezijumom *per os* (Mg grupa/28dana), adrenokortikotropnim hormonom *s.c.* (ACTH grupa/10 µg, 21 dan), kombinacijom tretmana (ACTH/Mg grupa) i fiziološkim rastvorom *s.c.* (kontrola/21 dan). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.E.M. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$.

Primena ACTH hormona u trajanju od 21 dan dovela je do statistički značajnog smanjenja antioksidativne aktivnosti SOD enzima u plazmi eksperimentalnih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,0001$), ali i u poređenju sa grupom životinja tretiranom magnezijumom ($p < 0,0001$). Međutim, ovaj efekat je izostao kod životinja tretiranih dugoročno kombinacijom magnezijumom 28 dana i ACTH hormonom poslednjih 21 dan, štaviše kombinacija tretmana je značajno povećala aktivnost SOD enzima u poređenju sa ACTH grupom životinja ($p < 0,0001$). Dodatno, efekat magnezijuma je bio prisutan samo u uslovima aktivacije HPA osovine ACTH tretmanom.

Tabela 15. Aktivnosti antioksidativnih enzima: SOD i PON1. Aktivnost antioksidativnih enzima određivana je u plazmi pacova Wistar soja dugoročno tretiranih magnezijumom, adrenokortikotropnim hormonom i kombinacijom tretmana (ACTH/Mg) i kontrolne grupe. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm S.E.M. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$, u poređenju sa kontrolom grupom (a), magnezijum grupom (b) i ACTH grupom (c).

Aktivnosti antioksidativnih enzima				
(U/L)	Kontrola	Mg	ACTH	ACTH/Mg
SOD	153,5 \pm 0,885	146,8 \pm 1,078	104,5 \pm 9,929 a**** b****	152,8 \pm 1,276 c****
PON1	48,17 \pm 5,747	57,67 \pm 3,844	39,5 \pm 3,49 b*	54,33 \pm 2,472

4.6.2.5. Promene aktivnosti enzima paraoksonaze 1 – PON1 u plazmi

Aktivnosti paraoksonaze 1 u plazmi pacova Wistar soja tretiranih dugoročno magnezijumom, ACTH hormonom i kombinacijom tretmana, kao i aktivnost PON1 enzima u kontrolnoj grupi prikazane su na slici 40 (Slika 40B, Tabela 15).

Pomenuti tretmani u sve tri grupe, Mg, ACTH i ACTH/Mg grupe, nisu doveli do značajnih promena u aktivnosti PON1 enzima u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Međutim, tretman magnezijumom je doveo do povećanje PON1 aktivnosti u plazmi eksperimentalnih životinja u poređenju sa ACTH tretmanom ($p < 0,05$).

5. DISKUSIJA

5.1. Uticaj magnezijuma na memoriju u fiziološkim i uslovima aktivacije HPA osovine

Rezultati prve faze ove doktorske disertacije ukazuju da akutna i dugoročna primena magnezijuma pokazuju prokognitivni efekat, odnosno tretmani dovode do poboljšanja memorije pacova Wistar soja ispitivano testom prepoznavanja novog objekta. Nasuprot tome rezultati ukazuju da akutna i dugoročna aktivacija HPA osovine primenom ACTH hormona ne dovodi do poboljšanja memorije eksperimentalnih životinja. Međutim, u uslovima primene kombinacije tretmana, akutne aktivacije HPA osovine uz akutno primenjen magnezijum i u uslovima dugoročne aktivacije HPA osovine uz dugoročno primenjivan magnezijum, primećeno je poboljšanje memorije pacova.

5.1.1. Prokognitivni efekat magnezijuma

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na prokognitivni efekat akutno i dugoročno primenjenog magnezijuma, na šta ukazuju vremena istraživanja novog i poznatog objekta, odnosno vrednosti D indeksa i R indeksa u testu prepoznavanja novog objekta.

Važno je istaći da je akutna primena magnezijuma u formi $MgSO_4$ dovela do poboljšanja pozivanja dugoročne memorije u testu prepoznavanja novog objekta kod zdravih odraslih pacova. Iako je ovo ispitivanje zasnovano na pojedinačnoj bihevioralnoj paradigmi sa ciljem ispitivanja specifičnog aspekta epizodne memorije (Antunes i Biala, 2012), prokognitivni efekat akutno primenjenog magnezijuma primećen u prvom eksperimentu reprodukovano je u drugom eksperimentu. Postoji veoma skroman broj bihevioralnih studija kod pacova u kojima je ispitivan efekat akutne primene magnezijuma u kojima nije pokazano ni poboljšanje memorije ni redukcija memorijskog deficita do sada. Browne i saradnici su pokazali da disfunkcija učenja, koja se prati povećanjem vremena potrebnog za pronalaženje platforme u Morisovom vodenom lavirintu, nije oslabljena preventivnom akutnom primenom magnezijuma kod pacova koju su doživeli traumatsku povredu mozga, iako je tretman doveo do značajnog smanjenja progresivnog gubitka tkiva hipokampusa (Browne et al., 2004). Pored toga efekat jedne doze magnezijum-sulfata na poboljšanje pozivanja dugoročne memorije pokazan je i kod životinja akutno tretiranih ACTH hormonom. Iako NORT protokol korišćen u ovom istraživanju ne može da detektuje oštećenje memorije, postoje studije koje ukazuju da akutni glukokortikoidni tretmani dovodi do oštećenja pozivanja dugoročne memorije i kod životinja i kod ljudi (de Quervain et al., 1998; de Quervain et al., 2000; Lupien i McEwen, 1997).

U ovom istraživanju prokognitivni efekat magnezijuma u identičnom NORT protokolu je primećen i nakon dugoročne *ad libitum* primene magnezijum-sulfata u periodu od 28 dana. Uzimajući u obzir da je akutni tretman magnezijumom u NORT protokolu doveo do poboljšanja pozivanja epizodne memorije, ne može se sa sigurnošću smatrati da je poboljšanje memorije koje je primećeno kod životinja tretiranih dugoročno magnezijumom u trajanju od 28 dana jasna posledica dugoročnog uzimanja magnezijuma. Suprotno tome, uzimajući u obzir *ad libitum*

pristup magnezijumu od strane životinja, ne može se ni tvrditi da je samo mala količina magnezijuma uzeta pre samog testa uzrok kognitivnog poboljšanja. Čak štaviše kontinuirano *ad libitum* uzimanje magnezijuma rastvorenog u vodi za piće moglo je uticati na sve faze memorije (akviziciju, konsolidaciju i pozivanje memorije) i odgovarajuće kognitivne procese u 24h inter-intervalu. U saglasnosti sa rezultatima ove doktorske disertacije, pokazano je da hronični tretman magnezijumom u obliku Mg-L-treonata dovodi do smanjenja različitih kratkoročnih i dugoročnih deficita memorije u NORT testu u animalnim modelima: gubitak memorije povezan sa godinama (Slutsky et al., 2010), hronični neuropatski bol (Wang et al., 2013), Alchajmerova bolest (Li et al., 2014) i lekom izazvan gubitak memorije (Zhou et al., 2021). Pokazano je da tretman Mg-L-treonatom u trajanju od jednog meseca poboljšava prepoznavanje novog objekta u NORT modifikovanom protokolu kratkoročne memorije, u kome kontrolne grupe starih životinja nisu uspele da diskriminiraju novi objekat posle 10 minuta, dok je tretman Mg-L-treonatom doveo do poboljšanja i dugoročne memorije u modifikovanom protokolu sa 12h inter-intervalom (Slutsky et al., 2010). Od značaja je da su u istoj studiji ispitivani efekti hroničnih tretmana drugih soli magnezijuma, kao što su magnezijum-hlorid, magnezijum-citrat i magnezijum-glukonat, na dugoročnu memoriju u protokolu modifikovanom korišćenjem tri objekta i modifikovane formule za izračunavanje indeksa prepoznavanja, te da ovi tretmani nisu uspeli da značajno povećaju indeks prepoznavanja u odnosu na kontrolnu grupu životinja analizirano jednofaktorskim ANOVA testom (Slutsky et al., 2010). Kako je u animalnom modelu hroničnog neuropatskog bola pokazan deficit kratkoročne memorije korišćenjem modifikovanog NORT testa (Slutsky et al., 2010), Wang i saradnici su pokazali da dvonedeljni oralni tretman Mg-L-treonatom rastvorenim u vodi za piće pokazuje i preventivni i terapijski uticaj na očuvanje kratkoročne memorije (Wang et al., 2013). Indeks prepoznavanja životinja tretiranih Mg-L-treonatom u modelu hroničnog neuropatskog bola značajno je poboljšan u odnosu na životinje koje nisu primale magnezijum, ali se ne razlikuje u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Wang et al., 2013). Pozitivan efekat oralne primene magnezijum-L-treonata u trajanju od 8 dana na kratkoročnu memoriju korišćenjem NORT testa pokazan je i prilikom ispitivanja oksaliplatinom izazvanog deficita memorije (Zhou et al., 2021). Dodatno, u animalnom modelu AD korišćenjem transgenih miševa, Li i saradnici su pokazali da oralna primena magnezijum-L-treonata rastvorenog u vodi za piće u trajanju od 16 meseci dovodi do poboljšanja i kratkoročne i dugoročne memorije ispitivano u modifikovanom NORT testu sa inter-intervalima 5min i 24h (Li et al., 2014).

Pored napred navedenih istraživanja efekat dugoročnog tretmana magnezijumom na memoriju životinja ispitivan je u različitim animalnim modelima uključujući Morisov vodeni lavirint, T-lavirint i uzdignut plus lavirint (eng. *Elevated plus maze*, EPM). Slutski i saradnici su pokazali da tretman magnezijum-L-treonatom putem vode za piće u trajanju od 24 dana dovodi do poboljšanja prostorne radne memorije, ispitivano T-lavirint testom, i dugoročne prostorne radne memorije, ispitivano Morisovim vodenim lavirintom, kod mladih (2 meseca) i kod starih (22 meseca) životinja (Slutsky et al., 2010). Sadir i saradnici su ispitivali efekat dugoročnih tretmana magnezijum-L-treonatom, magnezijum-hloridom i magnezijum-sulfatom u različitim dozama, na akviziciju i retenciju memorije u uzdignutom plus lavirintu. Značajan efekat na procenat retencije memorije pokazao je tretman magnezijum-L-treonatom u trajanju od 28 dana u dozama 100 mg/kg i 150 mg/kg, dok su tretmani sa magnezijum-hloridom i magnezijum-sulfatom pokazali trend ka povećanju retencije memorije (Sadir et al., 2019). Interesantno je da je tretman magnezijum-L-treonatom u dozi 50 mg/kg, minimalnoj efektivnoj dozi po Slutskom i saradnicima (Slutsky et al., 2010), takođe pokazao samo trend ka povećanju retencije memorije (Sadir et al., 2019). Međutim Li i saradnici su pokazali da tretman magnezijumom u obliku

magnezijum-sulfata u trajanju od 61 dan poboljšava prostornu memoriju ispitivano Morisovim vodenim lavirintom kod pacova sa hepatičnom encefalopatijom, uz izostanak razlike u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Li et al., 2017). Suprotno pomenutim studijama, suplementacija u trajanju od osam nedelja novom komponentom magnezijuma, magnezijum-pikolinatom, kao i magnezijum oksidom (500 mg/kg) nisu pozitivno uticale na broj ulazaka u ciljni kvadrant, već suprotno imale su negativan uticaj na prostornu memoriju u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Orhan et al., 2022).

Procena je da preko 40 miliona ljudi u svetu boluje od demencije gde je najčešći oblik (60-75%) demencije AD, te stoga, veliki broj studija ispituje vezu između incidence AD i opadanja kognitivnih sposobnosti i načina ishrane i svakodnevnog unošenja nutrijenata (Dominguez i Barbagallo, 2018; Lane et al., 2018). Takođe, veliki broj kliničkih studija ukazuje da pacijenti sa AD imaju nizak nivo magnezijuma u krvi (Balmuş et al., 2017; Lemke, 1995; Barbagallo et al., 2011). Stoga je značajno pomenuti pozitivan efekat tretmana magnezijumom iz prekliničkih istraživanja Alchajmerove bolesti. U modelu AD primenom streptozotocina ispitivan je efekat *i.p.* primene magnezijum-sulfata u trajanju od 7 dana u različitim dozama (50 mg/kg, 100 mg/kg i 150 mg/kg) na prostornu memoriju Sprague-Dawley pacova tri nedelje nakon intervencije i dve nedelje nakon tretmana magnezijumom (Xu et al., 2014). Očekivano, streptozotocin model doveo je do memorijskog deficita, dok je tretman magnezijum-sulfatom (100 mg/kg i 150 mg/kg) efikasno smanjio kognitivni deficit, značajno je smanjio latenciju do skrivene platforme, povećao vreme provedeno i broj ulazaka u ciljni kvadrant. Dodatno efekat je praćen povećanjem koncentracije magnezijuma u hipokampusu, bez razlike u koncentraciji magnezijuma u hipokampusu u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Xu et al., 2014). Zatim u mišijem modelu AD, pored već pominjanog efekta pokazanog u testu prepoznavanja novog objekta, Li i saradnici ispitivali su efekat magnezijum-L-treonata na prostornu memoriju u Morisovim vodenom lavirintu. Statistički značajan efekat magnezijum-L-treonata pokazan je kod 7 meseci starih životinja nakon mesec dana tretmana, i potvrđen kod istih životinja starih 15 meseci nakon 9 meseci tretmana (Li et al., 2014). U skladu sa ovim rezultatima u istom modelu AD na miševima dobijen je sličan efekat magnezijum-L-treonat tretmana na prostornu memoriju kod 6 meseci starih miševa nakon 3 meseca tretmana magnezijumom (Xiong et al., 2022).

Iako je skoro tri decenije visoko cenjeno terapijsko dejstvo magnezijuma u neurološkim poremećajima tačan mehanizam je ostajao neotkriven, delimično zbog neadekvatnog razumevanja transporta magnezijuma kroz krvno-moždanu barijeru i načina na koji bi mogao biti modifikovan (Vink, 2016). Dodatno, centralni pozitivni efekti magnezijuma široko su ispitivani. Jedna od studija pokazala je da oralna primena magnezijuma dovodi do parcijalne reverzije promena EEG tokom spavanja i noćnih neuroendokrinih promene povezanih sa starenjem (Held et al., 2002). Takođe, pokazano je smanjenje oslobađanja supstance P i posledično nishodna regulacija neurološke inflamacije (Kramer et al., 1997), kao i poboljšanje kognicije i lokomocije kod pacova sa hepatičnom encefalopatijom (Li et al., 2017). U skladu sa izborom terapijskog oblika magnezijuma u ovom istraživanju, značajno je napomenuti da su Hallak i saradnici ispitivali centralni efekat periferno primenjenog magnezijum-sulfata. Istraživanje je pokazalo da tretman magnezijum-sulfatom dovodi do povećanja koncentracije magnezijuma u cerebrospinalnoj tečnosti gde povećanje koreliše sa povećanjem koncentracije u krvi, dok sam tretman magnezijum-sulfatom pokazuje antikonvulzivni efekat (Hallak et al., 1992). Pored toga, tretman magnezijum-sulfatom je pokazao centralni efekat značajnom redukcijom kapaciteta vezivanja NMDA receptora u korteksu i nekim regionima hipokampusa (Hallak et al., 1994). Međutim, poboljšanje dugoročne memorije u NORT protokolu u ovom istraživanju koje je

pokazano nakon primene magnezijuma u trajanju od 28 dana, nije potkrepljeno sa signifikatnim povećanjem koncentracije magnezijuma u prefrontalnom korteksu, a izuzev ovog određivanja, samo istraživanje nije bilo fokusirano na ispitivanje transporta magnezijuma kroz krvno-moždanu barijeru. Uzimajući u obzir gore navedena istraživanja, kao i činjenicu da je tretman magnezijumom u ovom istraživanju primenjivan oralno, može se pretpostaviti da su joni magnezijuma prošli krvno-moždanu barijeru na isti način na koji prolazi magnezijum unet putem hrane.

5.2. Izostanak prokognitivnog efekta ACTH hormona

Kako je stres široko definisan kao stanje narušavanja homeostaze organizma izrazito je interesantan za istraživače, pa je razvijen veliki broj animalnih modela sa ciljem ispitivanja efekata akutnog i hroničnog stresa, te potencijalne antistres terapije (Jaggi et al., 2011). Primarni fiziološki odgovor na fizički ili emocionalni stres sa ciljem uspostavljanja ponovne homeostaze i povećavanja mogućnosti za preživljavanjem jeste aktivacija HPA osovine, uz aktivaciju simpatoadrenalnog sistema (Chrousos i Gold, 1992; Smith i Vale, 2006; Yegen, 2010). Međutim u okviru istraživanja ove doktorske disertacije ispitivan je potencijalno prokognitivni efekat aktivacije HPA osovine primenom ACTH hormona. Model repetativne primene niskih doza ACTH hormona (10 µg/po životinji/po danu) u trajanju od 21 dan validiran je u našoj laboratoriji u testu forsiranog plivanja kao model depresije rezistentne na triciklične antidepresive (Petrović et al., 2018), prethodno uspostavljen od strane Kitamure (Kitamura et al., 2002). Iako se dobro uspostavljeni model depresije rezistentne na triciklične antidepresive kod pacova bazira na hroničnoj administraciji visokih doza ACTH (100 µg/po životinji), Siswanto i saradnici su pokazali da doze 10 µg/kg i 100 µg/kg pokazuju skoro ekvivalentno akutno povećanje kortikosterona (oko 220 ng/ml) i komparabilne večernje nivoe kortikosterona u plazmi odraslih muških Sprague-Dawley pacova (Kitamura et al., 2002; Walker et al., 2015; Siswanto et al., 2008). Zaista, i u ovom istraživanju doza ACTH 10 µg po životinji (grubo oko 30 µg/kg) dovela je do povećanja koncentracije kortikosterona do komparabilnih 240 ng/ml, što je bilo signifikatno više u poređenju sa kontrolnom grupom životinja.

U NORT protokolu ovog istraživanja akutni i dugoročni tretmani ACTH hormonom nisu doveli do poboljšanja memorije, uz povećan nivo kortikosterona verovatno i u fazi akvizicije i u test fazi. Pored toga kako NORT protokol korišćen u ovom istraživanju ne može da detektuje potencijalna oštećenja memorije, ne može se isključiti ni da tretman ACTH hormonom ima potencijalno negativan efekat na memoriju životinja. Shodno našem saznanju ne postoje istraživanja efekata aktivacije HPA osovine primenom ACTH hormona, dok je dostupan veliki broj studija u kojima je ispitivan efekat kortikosterona ili efekat fizički izazvanog stresa na memoriju životinja. Dodatno, postoji određen broj istraživanja potencijalno prokognitivnih efekata primene analoga ACTH hormona u animalnim modelima.

Akutni tretman kortikosteronom pokazao je poboljšanje konsolidacije memorije u NORT testu (Okuda et al., 2004), dok je tretman kortikosteronom primenjen pre retencionog testiranja pokazao oštećenje pozivanja prostorne memorije (de Quervain et al., 1998). Okuda i saradnici su pokazali da efekat primenjenog kortikosterona odmah nakon trening faze u testu ispitivanje dugoročne memorije (24h inter-interval) zavisi od emocionalne komponente. Sam pozitivan efekat na prepoznavanje novog objekta bio je prisutan samo kod grupe životinja koje nisu imale habituaciju, odnosno efekat je bio prisutan samo uz komponentu emocionalnog uzbuđenja

povezanog sa treningom fazom u novom okruženju. Međutim negativan efekat tretmana kortikosteronom na pozivanje kratkoročne memorije (1h inter-interval) bio je prisutan kod životinja koje nisu prošle fazu habitacije, ukazujući na potencijalno različite efekte kortikosterona na konsolidaciju i pozivanje memorije kada je prisutna emocionalna komponenta (Okuda et al., 2004). S obzirom da je kao deo protokola u našem istraživanju postojala faza habituacije, sam izostanak poboljšanja memorije u NORT protokolu nakon akutno primenjenog ACTH tretmana per se je u skladu sa gore navedenim rezultatima. Pozitivan efekat primene kortikosterona nakon trening faze na konsolidaciju memorije potvrđen je i u drugim animalnim modelima uključujući ispitivanja prostorne memorije i memorije uslovljavanja strahom (Sandi et al., 1997; Hui et al., 2004). Sandi i saradnici su ispitivanjem efekat primene kortikosterona odmah nakon trening faze pokazali pozitivan efekat na pozivanje prostorne memorije, odnosno značajno skraćanje vremena pronalaženja platforme u Morisovom vodenom lavirintu i retenciju memorije sedam dana nakon trening faze (Sandi et al., 1997). Dodatno administracija kortikosterona nakon trening faze u ton-šok testu, u klasičnom testu uslovljavanja strahom poboljšala je retenciju memorije u 24h testu (Hui et al., 2004). Pored toga, de Quervain i saradnici su pokazali da stres utiče na pozivanje dugoročne prostorne memorije samo ukoliko je primenjen 30 minuta pre retencionog testiranja, dok efekat izostaje ukoliko je stres primenjen 2 minuta ili 4 sata pre samog testiranja, gde su ovi rezultati u direktnoj korelaciji sa nivom kortikosterona u serumu pacova ukazujući na ulogu nadbubrežne žlezde. Daljom primenom kortikosterona pre retencionog testiranja, potvrđen je doznao zavisni negativni efekat same primene kortikosterona pred retenciono testiranje na pozivanje memorije, pri čemu je efekat izostao pri najnižoj dozi od 0,3 mg/kg kortikosterona (de Quervain et al., 1998). U skladu sa ovim istraživanjem akutno primenjen ACTH hormon 30 minuta pre test faze u našem istraživanju nije pokazao prokognitivni efekat na pozivanje neprostorne memorije u testu prepoznavanja novog objekta, dok NORT protokol korišćen u ovom istraživanju nije mogao da detektuje potencijalna oštećenja memorije, uz ograničenje da u našem istraživanju nakon akutnih tretmana nije određivan nivo kortikosterona u plazmi.

Istraživanja uticaja rep-šok stresa na memoriju prepoznavanja novog objekta ukazuju pre svega na negativan efekat stresa, odnosno da stres dovodi do oštećenja memorije životinja (Baker i Kim, 2002; Park et al., 2017). Ispitivanjem uticaja stresa na memoriju prepoznavanja novog objekta Baker i Kim su pokazali da rep-šok stres primenjen pre trening faze (60 rep-šok stimulusa) dovodi do značajnog oštećenja dugoročne memorije prepoznavanja (3h interval), dok je samo oštećenje reverzibilne prirode. Sa druge strane, stres nije pokazao uticaj na kratkoročnu memoriju (5min interval) prepoznavanja novog objekta (Baker i Kim, 2002). Pored toga efekat uticaja stresa izazvanog rep-šok testom potvrđen je i od strane Park-a i saradnika, koji su potvrdili efekat stresa na dugoročnu memoriju prepoznavanja, odnosno da dolazi do smanjenje preference za novim objektom u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Park et al., 2017). Uzimajući u obzir navedena istraživanja protokoli dugoročne memorije su postavljeni tako da kontrolna grupa životinja može da zapamti trening fazu, za razliku od protokola sa 24h inter-intervalom gde se očekuje da kontrolna grupa životinja nije zapamtila trening fazu. Stoga, su rezultati našeg istraživanja koji ukazuju da akutno i dugoročno primenjen ACTH per se nije doveo do poboljšanja memorije u NORT protokolu, u skladu sa gore navedenim istraživanjima, s tim što sam efekat na oštećenje memorije nije moguće evaluirati u protokolu sa 24h inter-intervalom.

Pored gore navedenih istraživanja dve grupe istraživača su ispitivale uticaj duže primene stresa na memoriju prepoznavanja novog objekta. Rezultati ovih istraživanja ukazuju da stres ograničenjem primenjivan 6h svakog dana u trajanju od sedam dana, dovodi do oštećenja dugoročne memorije prepoznavanja kod muških pacova u protokolu sa 4h inter-intervalom

(Bowman et al., 2009; Gomez et al., 2013). Dodatno, dugoročno primenjivan kortikosterona u trajanju od 14 dana doveo je do postepenog opadanja retencije prostorne memorije ispitivano u Morisovom vodenom lavirintu, sa značajnim opadanjem počevši od četvrtog dana nakon obustave primene kortikosterona (Sato et al., 2010). Suprotno tome, dugoročno izlaganje stresu hladnoćom 2h svakog dana u trajanju od pet dana nije pokazalo efekat na kratkoročnu memoriju prepoznavanja niti na prostornu memoriju, nezavisno od pola životinja, iako je nivo kortikosterona bio povećan kod pacova muškog pola (El Marzouki et al., 2021). Dodatno, u ispitivanju efekta primene buke u trajanju od 21 dan uz različite uslove čuvanja životinja, pojedinačno ili u paru, dobijeni su interesantni rezultati. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da kod životinja koje su bile izložene samo stresu bukom nije bilo efekta na performans, odnosno ove životinje su u test fazi provele više vremena istražujući novi objekat identično kontrolnoj grupi, dok životinje koje su grupno čuvane nezavisno od faktora stresa bukom nisu pokazale da prave razliku između objekta ni u protokolu sa 2,5h ni u protokolu sa 4h inter-intervalom (Beck i Luine, 2002), ukazujući na kompleksan efekat koji zavisi od karakteristika stresa.

Određeni broj istraživača bavio se i ispitivanjem direktnog efekta melanokortina na učenje i pamćenje, ispitivanjem pre svega efekata različitih analoga ACTH hormona u prekliničkim studijama učenja i pamćenja. Hock i saradnici su ispitivali efekat ACTH₍₄₋₉₎ analog u nizu različitih testova gde rezultati ukazuju da je ACTH₍₄₋₉₎ analog smanjio anamnestički efekat elektrokonvulzivnog šoka primenjenog posle trening faze i primene skopolamina pre trening faze u testu pasivnog izbegavanja (eng. *passive avoidance test*), zatim je poboljšao performanse u testu aktivnog izbegavanja i u kružnom lavirintu (eng. *radial maze test*), što ukazuje na poboljšanje retencije kod miševa i pacova (Hock et al., 1988). Pored toga, pokazano je da intraperitonealno injekciono primenjen ACTH₍₄₋₉₎ analoga pre ili nakon učenja može da dovede do poboljšanja skladištenja olfaktornih informacija (Roman et al., 1989). Silachev i saradnici su ispitivali efekat drugog analoga ACTH, ACTH₍₄₋₇₎, na prostornu memoriju kod pacova kod kojih je fototrombozom izazvane ishemijskim lezijama prefrontalnog korteksa. Pokazano je da ACTH analog primenjivan tokom prvih 6 dana nakon ishemije može da oporavi mogućnost učenje ispitivano Morisovim vodenim lavirintom, bez značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu (Silachev et al., 2009). Shodno našem saznanju, ispitivanje samog efekta analoga ACTH hormona na memoriju prepoznavanja u animalnim modelima trenutno nije dostupno u literaturi.

5.3. Uticaj magnezijuma na parametre neurogeneze i sinaptogeneze u hipokampusu pacova

Rezultati druge faze ove doktorske disertacije ukazuju da dugoročna suplementacija magnezijumom kod pacova utiče na molekularnu strukturu *dentate gyrus* regiona hipokampusa. U *dentate gyrus* regionu hipokampusa životinja koje su primale magnezijum rastvoren u vodi za piće u trajanju od 28 dana pokazana je povećana količina BDNF proteina, štaviše povećana količina proteina bila je prisutna i kod grupe životinja koja je primala kombinaciju ACTH/Mg tretmana, u poređenju sa kontrolnom i ACTH tretiranom grupom životinja. Dobijeni rezultati pozitivnog efekta magnezijuma na količinu BDNF proteina su u skladu sa rezultatima dobijenim u bihejvioralnim testovima, odnosno ukazuju na povezanost količine BDNF proteina u hipokampusu i memorije prepoznavanja. Dodatno iako samostalan tretman magnezijumom nije uticao na gustinu ćelija koje eksprimiraju DCX, tretman magnezijumom smanjio je efekat

aktivacije HPA osovine, odnosno gustina ćelija koje eksprimiraju DCX u ACTH/Mg tretiranoj grupi životinja ne pokazuju značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Stoga se i efekat magnezijuma na količinu nezrelih neurona može povezati sa pozitivnim rezultatima memorijskih testova. Efekat magnezijuma na količinu GAP-43 proteina u hipokampusu bio je prisutan uz povećanu aktivnost HPA osovine, odnosno životinje koje su primale kombinaciju tretmana pokazale su povećanu količinu GAP-43 proteina u *dentate gyrus* regionu hipokampusa.

Osnovne moždane funkcije učenje i pamćenje iako su oduvek privlačile veliki broj istraživača nedovoljno su istražene. Interesovanje za razumevanje mehanizama skladištenja informacija, odnosno istraživanje potencijalnih terapija koje bi mogle da utiču na kodiranje informacija, svakako će biti sve veće uzimajući u obzir pre svega sve veću zastupljenost pacijenata sa kognitivnim oštećenjem, uključujući i pacijente sa AD. Prihvaćen mehanizam kodiranja informacija u centralnom nervnom sistemu uključuje promene u jačini konekcija između samih neurona (Martin et al., 2000; Takeuchi et al., 2014), dok je sve više dokaza da je za kasnu fazu dugoročne potencijacije i za dugoročnu memoriju neophodna sinteza novih proteina (Lu et al., 2008). Dodatno, uloga hipokampusa i celog medijalno temporalnog režnja na formiranje memorije je poznata od sredine 20.veka, gde bi upravo i proces neurogeneze koji je prisutan u hipokampusu čitavog života mogao imati značajnu ulogu.

Proteini iz familije neutrofina se smatraju značajnim regulatorima preživljavanja i diferencijacije neurona (Huang i Reichardt, 2001; Bekinschtein et al., 2014), gde je sve veći broj dokaza koji ukazuju upravo na ulogu sinteze BDNF proteina u hipokampusu, tačnije na potencijalno ključnu ulogu BDNF proteina u sinaptičkoj plastičnosti i adultnoj neurogenezi (Lu et al., 2008; Meng et al., 2011; Bekinschtein et al., 2014; Korte et al., 1998; Cunha et al., 2010). BDNF protein sve poznate efekte ostvaruje putem receptora tipa tirozin kinaze za koje se vezuje visokim afinitetom – TrkB i koji su široko rasprostranjeni u subregionima hipokampusa i u prednjem mozgu, iako se vezuje i za neutrofinske p75^{NTR} receptore slabim afinitetom (Lu et al., 2008; Bekinschtein et al., 2014; Cunha et al., 2010). Nedostatak BDNF proteina ili blokiranje TrkB receptora doveli su do promena u dugoročnoj potencijaciji (Korte et al., 1998), što ukazuje upravo na ključnu ulogu liganda za TrkB receptore u uspostavljanju dugoročne memorije. Štaviše povećana ekspresije informacione RNK za BDNF povezana je u nizu studija sa učenjem i pamćenjem (Pang i Lu, 2004). U prekliničkoj studiji pokazano je povećano oslobađanje BDNF proteina u *dentate gyrus* regionu hipokampusa i peririnalnom korteksu u testovima prepoznavanja novog objekta, ukazujući na ulogu upravo BDNF signalnog puta u konsolidaciji memorije prepoznavanja (Callaghan i Kelly, 2012). Pored toga pogoršanje memorije prepoznavanja i prostorne memorije bilo je prisutno kod odraslih životinja kojima je specifično uklonjen BDNF gen u hipokampusu ukazujući upravo na ulogu BDNF proteina najverovatnije u procesima kodiranja i/ili konsolidacije memorije (Heldt et al., 2007). Stoga nije iznenađujuće da je uloga BDNF proteina ispitivana u prekliničkim i kliničkim studijama AD (Budni et al., 2015). Štaviše Peng i saradnici su pokazali vezu između smanjenja količine BDNF proteina i proBDNF proteina kod pacijenta sa AD i opadanja kognitivnog skora (Peng et al., 2005), ukazujući na ulogu BDNF proteina u kognitivnim oštećenjima kod pacijenta sa AD. U skladu sa ovim rezultatima terapijski potencijal uticanja na količinu BDNF proteina, koji uključuju i ushodnu regulaciju informacione RNK, uveliko se razmatra u terapiji AD (Amidfar et al., 2020). Uzimajući u obzir gore pomenuta istraživanja pozitivan efekat dugoročnog tretmana magnezijumom u našem istraživanju na memoriju prepoznavanja životinja koji je pokazan u NORT testu, može da se poveže sa povećanom količinom BDNF proteina u hipokampusu. Međutim iako postoji značajan broj prekliničkih studija koje su ispitivane efekte tretmana magnezijumom na memoriju, veza sa

količinom BDNF proteina je slabo istražena. U skladu sa našim rezultatima poboljšanje memorije nakon dugoročnog tretmana magnezijum-L-treonatom povezano je sa povećanjem količine BDNF proteina u hipokampusu (Slutsky et al., 2010) i prefrontalnom korteksu (Abumaria et al., 2011), uz izostanak efekta na količinu proteina u amigdali regionu (Abumaria et al., 2011). Pored toga pozitivan efekat magnezijuma u obliku magnezijum-sulfata na količinu BDNF proteina u hipokampusu pokazan je i ACTH modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive (Petrović et al., 2018).

Uzimajući u obzir da je pokazano da se u *dentate gyrus* regionu hipokampusa proces neurogeneze odvija i u adultnom dobu (Altman i Das, 1965; Cameron i Gould, 1996), određeni broj studija se bavio vezom između stvaranja novih neurona i učenja i pamćenja (Cameron i Glover, 2015). Rana preklinička ispitivanja ukazala su na ulogu adultne neurogeneze u uspostavljanju memorije traga uslovljenog strahom, dok je efekat izostao u testovima prostorne memorije, kontekstom uslovljenog straha, istraživanja novog konteksta i anksioznog ponašanja (Shors et al., 2001; Shors et al., 2002), što može da ukaže da je za različite memorijske zadatke neophodna različita količina novih neurona ili da ipak za neke memorijske zadatke nisu potrebni novi neuroni. Interesantno je da je korišćenjem specijalno genetski modifikovanih miševa pokazano da su nezreli neuroni uključeni i neophodni za akviziciju prostornog učenja, međutim nisu neophodni za pozivanje prethodno skladištene dugoročne memorije (Vukovic et al., 2013). Dodatno pokazano je da stimulacija adultne neurogeneze poboljšava rezultate specifičnih kognitivnih zadataka, odnosno životinje efikasnije prave razliku između dva slična konteksta (Sahay et al., 2011). U skladu sa ovim rezultatima inhibicija adultne neurogeneze u *dentate gyrus* regionu hipokampusa dovodi do deficita kognitivnih funkcija zavisnih od hipokampusa, uključujući deficit memorije prepoznavanja i prostorne memorije (Hossain et al., 2020). DCX je protein povezan sa mikrotubulima, koji utiče na stabilizaciju i vezivanje mikrotubula (Horesh et al., 1999), sa krucijalnom ulogom u migraciji prekursora neurona tokom razvoja centralnog nervnog sistema (Brown et al., 2003). Međutim pokazano je da je DCX protein prisutan i u adultnom dobu u *dentate gyrus* regionu hipokampusa, odnosno da se može koristiti kao marker adultne neurogeneze, kao rani marker neuralne diferencijacije, pošto ulazi u sastav progenitorskih i nezrelih neuralnih ćelija dok je nedetektabilan u zrelih neuronima (Brown et al., 2003; Hossain et al., 2020). Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da četvoronedeljni tretman magnezijumom povećava nivo nezrelih neurona, odnosno povećava nivo adultne neurogeneze, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u memorijskim testovima prepoznavanja. Dodatno efekat tretmana magnezijumom na nivo DCX pozitivnih ćelija izraženiji je u uslovima HPA aktivacije, odnosno uslovima kada je pokazano smanjenje prisustva DCX pozitivnih ćelija. Efekat magnezijuma u našem istraživanju u skladu je sa *in vitro* rezultatima koji ukazuju da proliferacija neuralnih stem ćelija hipokampusa životinja zavisi od ekstracelularne koncentracije magnezijuma (Jia, Mou et al., 2016), odnosno povećan nivo ekstracelularnog magnezijuma povećava diferencijaciju neuralne ćelijske linije dok suprimira diferencijaciju glija ćelijske linije (Liao et al., 2017). Štaviše u prekliničkim ispitivanjima tretman magnezijum-L-treonatom uticao je na povećanje proliferacije neuralnih stem ćelija kod mladih i starih životinja, bez efekta pražnjenja neuralnih rezervi (Jia, Liu et al., 2016). Sam četvoronedeljni tretman magnezijum-L-treonatom pokazao je povećanje BrdU+ i Ki67+ ćelija u hipokampusu mladih miševa ukazujući na povećanu proliferaciju neuralnih stem ćelija, dok je povećanje DCX+ ćelija ukazalo na povećanu diferencijaciju neurona. Efekat tretmana i na proliferaciju i na diferencijaciju je bio prisutan i kod starih životinja nakon tretmana MgT u trajanju od 12 meseci (Jia, Liu et al., 2016). Svakako najinteresantnija za naše istraživanje jeste studija koja je ukazala 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).

Interesantan je i protein otkriven sredinom sedamdesetih godina prošlog veka GAP-43 ili neuromodulin, koji se u neuralnim sinapsama nalazi u presinaptičkoj ćeliji vezan za membranu. Tokom vremena GAP-43 protein je povezan sa regulacijom rasta aksonskih završetaka, regulacijom organizacije citoskeleta u nervnim završetcima, oslobađanjem neurotransmitera, dok se sve više povezuje sa sinaptičkom potencijacijom i neurogenezom (pregled: Benowitz i Routtenberg, 1997; Denny, 2006). U *in vitro* istraživanjima pokazano je da dugoročna potencijacija dovodi do fosforilacija GAP-43 proteina, supstrata protein kinaze C, koja opstaje najmanje sat vremena ukazujući time na ulogu presinaptičkog mehanizma u održavanju LTP (Gianotti et al., 1992). Sama fosforilacija GAP-43 proteina korelira sa oslobađanjem neurotransmitera u sinaptičkoj pukotini (Dekker et al., 1989), te se potencijalne promene u fosforilaciji GAP-43 proteina mogu povezati sa promenama u oslobađanju neurotransmiteru. Pored toga *in vitro* studije su ukazale da iako GAP-43 protein nije neophodan za indukciju LTP, povećana fosforilacija GAP-43 proteina poboljšava kratkoročnu i dugoročnu potencijaciju (Hulo et al., 2002). Sa druge strane nedostatak ekspresije GAP-43 proteina u *in vitro* i *in vivo* studijama uticao je na proces neurogeneze, dok je sam nedostatak jednog alela kod heterozigotnih GAP-43(+/-) miševa ukazao na dinamičnu ulogu upravo GAP-43 proteina na proces neurogeneze u hipokampusu kod postnatalnih i odraslih životinja (Latchney et al., 2014). U ćelijskoj liniji GAP-43 *knock-out* miševa dolazi do poremećaja proliferacije prekusura, inhibicije neuralne diferencijacije i povećanja apoptoze nezrelih neurona, dok je inhibicija proliferacije prekusura prisutna i *in-vivo* u korteksu GAP-43 *knock-out* miševa (Mani et al., 2001). Štaviše u prekliničkoj studiji pokazano je oštećenje prostorne memorije kod miševa sa abnormalnim GAP-43 genom, uz povećanje anksioznosti i sa stresom povezanog promenjenog ponašanja (Zaccaria et al., 2010). Dodatno kod heterozigotnih GAP-43 miševa pokazano je oštećenje memorije uslovljavanja strahom zavisno od konteksta, bez efekta na memoriju uslovljavanja tragom, nociceptivnim ili audio tragom, uz duplu redukciju GAP-43 proteina u hipokampusu (Rekart et al., 2005). Međutim suprotno pomenutim istraživanjima u eksperimentu u kome je ispitivana prekomerna ekspresija GAP-43 fosforilisane forme, pokazano je da se životinje mogu podeliti u „pametne“ i „glupe“ sa stanovišta prostorne memorije, gde su životinje sa lošijim rezultatima bihejvioralnih testova pokazale 50% veću količinu GAP43 proteina u hipokampusu (Holahan et al., 2007). Ovi rezultati ukazuje da iako povećana ekspresija GAP-43 proteina može da poboljša memoriju, prekomerna ekspresija može da ima suprotni efekat, i da dovede do opterećenja neuroplastičnosti (Holahan et al., 2007), koja se dovodi u vezu sa AD (Mesulam, 2000). Efekat povećanja koncentracije magnezijuma na funkcionalne sinaptičke konekcije jeste ispitivan, međutim koliko je nama poznato ovo je prvo ispitivanje efekta magnezijuma na nivo GAP-43 proteina, kao faktora sinaptičke plastičnosti i neurogeneze, koji daje osnovu za dalja ispitivanja. Pre svega zbog činjenica da je kod pacijenta sa AD *post mortem* pokazano opadanje količine GAP-43 proteina u hipokampusu i frontalnom korteksu (Bogdanovic et al., 2000), a da je upravo koncentracija GAP-43 proteina u cerebrospinalnoj tečnosti marker sinaptičke disfunkcije kod AD (Qiang et al., 2022).

5.4. Uticaj aktivacije HPA osovine na parametre neurogeneze i sinaptogeneze u hipokampusu pacova

Iako akutna i dugoročna HPA aktivacija nisu dovele do poboljšanja memorije, dugoročna aktivacija HPA osovine dovela je do određenih promena u strukturi hipokampusa. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da je kod životinja tretiranih dugoročno ACTH hormonom prisutno smanjenje gustine ćelija koje eksprimiraju DCX, odnosno prisutno je smanjenje broja nezrelih neurona. S obzirom na činjenicu da NORT test korišćen u ovom istraživanju ne može da detektuje potencijalna oštećenja memorije ne može se isključiti potencijalno negativan efekat tretmana ACTH hormonom na memoriju životinja. Sa druge strane dugoročna aktivacija HPA osovine nije uticala na količinu BDNF i GAP-43 proteina u *dentate gyrus* regionu hipokampusu životinja, što je u skladu sa rezultatima bihejvioralnih testova.

Kako je hipokampus struktura u kojoj se proces neurogeneze odvija tokom čitavog života, odnosno novi neuroni se stvaraju iz progenitorskih ćelija koje polaze kroz procese proliferacije, preživljavanja i diferencijacije, jasno je da veliki broj faktora može da utiče na ove procese. Hipokampus sadrži veliki broj glukokortikoidnih i mineralokortikoidnih receptora a kako sam efekat glukokortikoida na procese učenja i pamćenja nije konzistentan, nije začuđujući veliki broj studija sprovedenih sa ciljem istraživanja efekata stresa i glukokortikoida na procese neurogeneze. Stoga je sam efekat aktivacije HPA osovine kroz pre svega efekat glukokortikoida ispitivan u svim fazama adultne neurogeneze (Cameron i Gould, 1996; Gould et al., 1992; Wong i Herbert, 2004; Wong i Herbert, 2006). Gould i saradnici su pokazali da u uslovima bez glukokortikoida odstranjivanjem nadbubrežne žlezde dolazi do povećanja proliferacija ćelija u *dentate gyrus* regionu odraslih životinja, dolazi do povećanja i prekusura neurona i glija ćelija, dok davanje kortikosterona prevenira ovaj efekat (Gould et al., 1992), ukazujući na inhibitorni ulogu glukokortikoida. Sličan efekat je prisutan i nakon izlaganja životinja prirodnom stresoru, mirisu predatora, kada dolazi do smanjenja proliferacije ćelija u hipokampusu, dok efekat izostaje kod životinja kojima je uklonjena nadbubrežna žlezda, ukazujući na glukokortikoidima zavisian efekat (Tanapat et al., 2001). U daljim istraživanjima pokazano je da je uticaj adenektomije nešto kompleksniji, odnosno da različito utiče na ćelije koje su u različitim fazama procesa neurogeneze, odnosno da se povećava broj nezrelih neurona uz povećanje apoptoze zrelih neurona (Cameron i Gould, 1996). Pored toga, interesantan je efekat kortikosterona na proces neurogeneze kada je praćen uporedno pre i posle mitoze, međutim iako je efekat na proliferaciju bio u skladu sa gore pomenutim istraživanjima, smanjeno preživljavanje nezrelih neurona prisutno je kako u uslovima adenektomije tako i u uslovima povećanog nivo kortikosterona ukazujući na možda ključnu ulogu upravo endokrinog okruženja u kome ćelije proliferišu na samo preživljavanje ćelija (Wong i Herbert, 2004). U daljim prekliničkim istraživanjima sličan efekat glukokortikoida pokazan je i na diferencijaciju progenitorskih ćelija u neurone, gde je pokazano da povećan nivo kortikosterona dovodi do smanjenja stvaranja neurona u adultnom hipokampusu, dok adenektomija dovodi do porasta broja novih neurona (Wong i Herbert, 2006). Kako su neuralne stem ćelije multipotentne ćelije svakako je značajno dalje ispitivanje efekta glukokortikoida i na diferencijaciju neuralnih stem ćelija u smeru glija ćelija. Chetty i saradnici su pokazali *in vitro* da glukokortikoidi povećavaju stvaranje upravo oligodendrocita uz smanjenje stvaranja neurona, dok je efekat preveniran blokadom glukokortikoidnih receptora (Chetty et al., 2014). Isti efekat bio je prisutan i u *in vivo* ispitivanju, gde je izlaganje životinja stresu imobilizacijom ili aplikacijom glukokortikoida u trajanju od sedam dana dovelo do smanjenja neurogeneze u hipokampusu uz povećano stvaranje oligodendrocita, međutim iako je proces neurogeneze nakon sedam dana od prestanka tretmana

vraćen na kontrolni nivo, efekat na stvaranja oligodendrocita nije bio reverzibilne prirode (Chetty et al., 2014). Interesantno je da iako je dugoročni tretman kortikosteronom doveo do smanjenja broja nezrelih DCX+ neurona u *dentate gyrus* regionu, dugoročni tretman kortikosteronom doveo je do blago poboljšanja prostorne memorije zavisne od hipokampusa (Workman et al., 2015). Svakako bi jedno od objašnjenja moglo da se zasniva na činjenici da je dugoročni tretman kortikosteronom prekinut dan pre trening faze, uzimajući u obzir supresiju endogene HPA aktivnosti. Gore pomenuta istraživanja ukazuju na pre svega inhibicioni efekat stresa posredstvom glukokortikoida na proces neurogeneze, kroz inhibiciju proliferacije i diferencijacije novih neurona. Dodatno kako i naše istraživanje ukazuje da HPA aktivacija dovodi do smanjenja broja nezrelih neurona, otvara se potreba za sprovođenjem daljih ispitivanja efekata HPA aktivacije u protokolima koji mogu da detektuje oštećenja memorije.

Pored efekta glukokortikoida na proces neurogeneze, istražuje se i efekat na neuralnu plastičnost gde je prihvaćeno da je za optimalnu dugoročnu potencijaciju neophodan blago povišen nivo glukokortikoida, dok ekstremno visok nivo kortikosterona deluje negativno na LTP i dovodi do snažne LTD (de Kloet et al., 1999; Lupien et al., 2007). Pored toga kao što je već pominjano postoji uverenje da kasna faza dugoročne potencijacije i dugoročna memorija zahtevaju sintezu novih proteina (Lu et al., 2008). S tim u vezi podaci o efektu stresa i glukokortikoida na ekspresiju BDNF proteina u hipokampusu, samim tim i na neuralnu plastičnost, nisu konzistentni. Pokazano je da ponovljeni stres imobilizacijom utiče negativno na nivo iRNK za BDNF u hipokampusu, sa najizraženijem efektom u *dentate gyrus* regionu, uz činjenicu da je efekat tranzitorne prirode pa je za vraćanje na normalan nivo potrebno 24h (Smith et al., 1995). Dodatno smanjen nivo BDNF proteina u hipokampusu bio je prisutan i nakon dugoročnog ponovljenog stresa imobilizacijom u trajanju od 14 i 21 dan (Xu et al., 2006; Radahmadi et al., 2015), dok rezultati ukazuju na reverzibilnu prirodu ovog efekta. Suprotno ovim istraživanjima stres imobilizacijom različite dužine trajanja pokazao je inicijalno lošije rezultate memorijskih testova uz porast ekspresije BDNF gena, dok se kod produženog stresa rezultat memorijskih testova poboljšao uz normalan nivo BDNF gena, ukazujući na potencijalnu negativnu korelaciju (Nooshinfara et al., 2011). Iako je pokazano da socijalna izolacija kod životinja smanjuje ekspresiju iRNK za BDNF u DG regionu hipokampusa (Djouma et al., 2006), Meng i saradnici su pokazali da socijalna izolacija u periodu adolescencije životinja utiče na ekspresiju BDNF proteina u adultnom dobu, odnosno kod životinja koje su bile socijalno izolovane tokom života povećana je ekspresija BDNF proteina u različitim moždanim regionima u adultnom dobu, uključujući i *dentate gyrus* region (Meng et al., 2011). Međutim u našem istraživanju aktivacija HPA osovine dugoročnim tretmanom ACTH hormonom nije pokazala efekat na količinu BDNF proteina u hipokampusu, što je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive (Petrović et al., 2018). Sličan efekat dobijen je u uslovima adrenaletomije kada nedostatak glukokortikoida nije uticao na nivo iRNK za BDNF protein u DG regionu u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Chao i McEwen, 1994). U prilog našim rezultatima je i preklinička studija u kojoj stres imobilizacijom u subhroničnom protokolu nije doveo do poboljšanja memorije prepoznavanja novog objekta, uz izostanak efekta na ekspresiju gena za BDNF protein u hipokampusu (Roustazade et al., 2022). Dodatno u istraživanju efekta akutnog i hroničnog stresa imobilizacijom na markere sinaptičke plastičnosti, efekat na nivo GAP-43 proteina i BDNF proteina u hipokampusu je izostao (Rosenbrock et al., 2005). Sličan efekat je pokazan u još jednom istraživanju, gde stres imobilizacijom u trajanju od 21 dan nije doveo do promene u BDNF proteinu u DG regionu hipokampusa dok je nivo GAP-43 proteina bio blago smanjen u CA3 regionu, uz izostanak efekat u DG regionu (Kuroda i McEwen, 1998). Iako je pokazano da nedostatak glukokortikoida kod

životinja dovodi do povećanog nivoa iRNK za GAP-43 u CA1 i CA3 regionu hipokampusa, isti efekat je izostao u *dentate gyrus* regionu (Chao et al., 1992; Chao i McEwen, 1994). U skladu sa ovim rezultatima u modelu nepredviđenog blago hroničnog stresa pokazano je smanjenje neurogeneze u DG regionu hipokampusa, uz opadanje GAP-43 pozitivnih ćelija u CA3 regionu hipokampusa, što je koreliralo sa depresivnim ponašanjem (Zavvari et al., 2020). Pregledom dostupnih radova može se zaključiti da stres i glukokortikoidi utiču na nivo GAP-43 proteina u CA1 i CA3 regionima hipokampusa, dok efekat izostaje na nivou DG regiona, što je potvrđeno i u našem istraživanju.

5.5. Uticaj dugoročnih tretmana na ekspresiju α 2A-adrenergičkih receptora u *Locus ceruleus*-u

Noradrenergički sistem lociran u LC ima veliki broj projekcija u različitim moždanim regionima, uključujući i projekcije ka limbičkom sistemu, hipokampusu i amigdali (Benarroch, 2018) i ka PVN hipotalamusa (Wang et al., 2017). Stoga ne čudi interesovanje istraživača za ulogu LC i noradrenergičkih neurona u procesima učenja i formiranja memorije, odnosno uloge noradrenalina kao potencijalno značajnog modulatora memorije (Takeuchi et al., 2016; Seo et al., 2021; Lemon et al., 2009; Khakpour-Taleghani et al., 2008). Bilateralna inaktivacija LC ukazala je na kompleksnost uloge LC u pomenutim procesima. Naime, nedostatak aktivnosti LC doveo je do oštećenja pozivanja i retencije memorije, i oštećenja konsolidacije memorije u slučaju kada je oštećenje LC neposredno nakon treninga, dok je izostao efekat na akviziciju memorije u testu učenja inhibitornog izbegavanja (eng. *inhibitory avoidance learning*; Khakpour-Taleghani et al., 2008). U svojim ispitivanjima Lemon i saradnici takođe su ukazali na ulogu neurona LC u kodiranju prostorne memorije zavisne od hipokampusa, odnosno pokazali su da aktivacija neurona LC stimuluše LTD u SC-CA1 sinapsama posredstvom beta-adrenergičkih receptora, dok je pozitivan efekat na prostornu memoriju praćen povećanjem nivoa noradrenalina u CA1 regionu hipokampusa (Lemon et al., 2009). Štaviše, primećena je bitna uloga i noradrenergičkih konekcija iz LC ka *dentate gyrus* regionu hipokampusa na formiranja memorije u testu gde je učenje povezano sa strahom (Seo et al., 2021). Suprotno gore pomenutim istraživanjima, pokazano je da akutna aktivacija LC-DG konekcija uz povećanje nivoa (koncentracije) noradrenalina dovodi do smanjenja diskriminacije konteksta, što je u skladu sa rezultatima koji ukazuju da stres zadržavanjem dovodi do smanjenja diskriminacije (Seo et al., 2021). Međutim efekat stresa dovodi i do redukcije generalnog „zamrzavanja“ životinja ukazujući na ulogu različitih sistema u efektu stresa na memoriju životinja, ne samo LC-DG konekcija (Seo et al., 2021). Dodatno u ispitivanju efekata primene antagoniste i agoniste beta-adrenergičkih receptora kod mladih i starih životinja na procese učenja i pamćenja, sproveden je niz bihevioralnih testova koji su ukazali na ulogu upravo noradrenergičkih neurona u procesima učenja i pamćenja, uz izražen efekat pogoršanja kod starih životinja primenom beta blokatora (Evans et al., 2021).

Kako bi se ispitao uticaj tretmana na noradrenergički sistem u ponsu, *locus ceruleus*-u, obzirom da se neuroni u LC aktiviraju kao odgovor na novi predmet (Vankov et al., 1995), u okviru ove doktorske disertacije praćena je ekspresija α 2A-adrenergičkih receptora. Iako sva tri tipa alpha-2-adrenergičkih receptora α 2A-AR, α 2B-AR i α 2C-AR pokazuju autoinhibitorni efekat, pokazano je da odsustvo gena za α 2A-AR kod miševa dovodi do najznačajnijih izmena u regulaciji oslobađanja neurotransmitera sinaptičkog nervnog sistema (Altman et al., 1999). Uzimajući u

obzir da je LC moždani region koji ima ulogu u odgovoru na stres, povezanost između LC i hipotalamusa ispitivana je u prekliničkim studijama depresije. U modelu hroničnim stresom izazvane depresije pokazano je smanjenje nivoa (koncentracije) noradrenalina u PVN hipotalamusa, dok je primena blokatora α 2A-adrenergičkih receptora dovela do suprotnog efekta na nivo noradrenalina (Wang et al., 2017). Dodatno, hronični stres je doveo da povećanja ekspresije α 2A-AR u hipotalamusu, a blokada receptora uticala je na smanjenje ovog efekta (Wang et al., 2017). U skladu sa ovim nalazima, rezultat ove doktorske disertacije ukazuje da tretman ACTH hormonom dovodi do povećanja ekspresije α 2A-adrenergičkih receptora. Uzimajući u obzir da blokada α 2A-adrenergičkih receptora dovodi do poboljšanja konsolidacije memorije, dok aktivacija istih receptora dovodi do gubitka memorije (Gibbs et al., 2010), izostanak poboljšanja memorije nakon ACTH tretmana u NORT testu može se objasniti i povećanjem inhibicije noradrenergičkih signala iz LC ka hipokampusu. Pored toga, povećanje ekspresije autoinhibitornih receptora može biti posledica adaptabilnog odgovora na dugoročnu aktivaciju HPA osovine, s obzirom da je u studijama hroničnog stresa pokazano povećanje bazalne aktivnosti noradrenergičkih neurona u LC (Mana i Grace, 1997).

Deficit magnezijuma u ishrani kod životinja narušava neurotransmisiju, prevashodno glutamatergičku ali i noradrenergičku neurotransmisiju (Spasov et al., 2009). Pozitivan uticaj magnezijuma na vreme imobilnosti u FST testu koji ukazuje na potencijalno antidepresivni efekat magnezijuma, posredovan je monoaminskim sistemima uključujući i noradrenergički sistem, odnosno α 1 i α 2 adrenergičke receptore (Cardoso et al., 2009). Međutim, od značaja je da rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da tretman magnezijumu u trajanju od četiri nedelje dovodi do povećanje ekspresije α 2A-adrenergičkih receptora u LC. Uzimajući u obzir da je u ACTH modelu depresije kod životinja pokazano povećanje koncentracije adrenalina i noradrenalina u plazmi kod životinja nakon izlaganja akutnom stresu u formi FST-a, bez razlike u koncentraciji adrenalina u poređenju sa kontrolnom grupom (Petrović et al., 2018), može se pretpostaviti da je efekat na autoinhibitorne receptore adaptabilne prirode.

5.6. Promene nivoa parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite nakon ACTH tretmana, protektivni efekat magnezijuma

U drugoj fazi ove doktorske disertacije istraživali smo promene u parametrima oksidativnog statusa kao i integritet DNK molekula kod pacova nakon dugoročne primene ACTH hormona, jednog od ključnih molekularnih medijatora neuroendokrine HPA osovine i sistemskog stresa. Pored toga, istraživali smo protektivni efekat četvoronedeljne suplementacije magnezijumom na povišen nivo oksidativnog statusa i na oksidativna DNK oštećenja.

Naime dugoročni ACTH tretman kod životinja oponaša hronični fiziološki stres, što uzrokuje poremećaj funkcije HPA osovine i dovodi do bihevioralnih poremećaja (Kitamura et al., 2002; Kitamura et al., 2008; Kitamura et al., 2010; Kim et al., 2016). Kao što je već diskutovano, pokazano je da dugoročna ACTH primena (10 μ g po danu, 21 dan) kod pacova uzrokuje depresiji slično ponašanje praćeno hiperaktivnošću HPA osovine, koja se manifestuje kroz povišen nivo glukokortikoida u plazmi (Petrović et al., 2018). Stoga je u ovom istraživanju implementiran prethodno opisan model hroničnog stresa i depresije (Kitamura et al., 2002; Kitamura et al., 2008; Kitamura et al., 2010; Kim et al., 2016; Petrović et al., 2018) i rezultati ukazuju da je

dugoročno izlaganje egzogenom ACTH hormonu kod pacova dovelo do porasta nivoa superoksid anjona i signifikantnog smanjenja aktivnosti enzima čistača slobodnih radikala SOD u plazmi. Dobijeni rezultati ukazuju da ACTH tretman narušava signalni put povezan sa redoksom i povećava štetne efekte superoksid anjona kod životinja, što potencijalno može doprineti štetnim metaboličkim efektima ACTH hormona. U skladu sa našim rezultatima, u prekliničkom modelu ACTH hormonom izazvane hipertenzije detektovan je u plazmi povećan nivo produkta lipidne peroksidacije F₂-izoprostana, uz povećanu aortnu superoksid anjon produkciju (Zhang et al., 2005). Pretpostavka je da centralnu ulogu u efektu ACTH hormona na redoks balans ima NADPH oksidaza zavisani signalni put (Zhang et al., 2005). U prethodnoj deceniji, u velikom broju studija pokazano je da oštećena redoks homeostaza u mozgu dovodi do oštećenja i smanjuje preživljavanje neurona, ukazujući na uzajamno dejstvo sa neuroinflamacijom jednim od ključnih mehanizama koji je između ostalog uključen u patogenezu depresije (Bakunina et al., 2015; Dang et al., 2019). Svakako bi trebalo pomenuti da je povećanje markera oksidativnog stresa, kao što su MDA i F₂-izoprostan, i oštećenje antioksidativnog odbrambenog sistema, odnosno smanjenje koncentracije askorbinske kiseline, glutantion peroksidaze i SOD enzima, primećeno kod depresivnih pacijenata (Black et al., 2015; Maes et al., 2011; Lindqvist et al., 2017; Bajpai et al., 2014; Lopresti et al., 2014; Palta et al., 2014; Maes et al., 2012). Pretpostavka je da povećana produkcija ROS-a i RNS-a u mozgu dovodi do mitohondrijalne disfunkcije, povećane aktivnosti mikroglija i neuralne smrti, što doprinosi manifestaciji depresije, iako je nekoliko aspekta molekularne osnove ove pretpostavke i dalje neotkriveno (de Munter et al., 2021; Maes et al., 2012; Cline et al., 2015; Liu i Dudley, 2020).

Brojni dokazi dobijeni u *in vivo* i *in vitro* modelima ukazuju da su hormoni stresa, prvenstveno glukokortikoidi povezani sa povećanom produkcijom ROS-a i RNS-a u različitim tipovima ćelija (Iuchi et al., 2003; Flint et al., 2007; Zafir i Banu, 2009; Flaherty et al., 2017). U skladu sa našim rezultatima, Stanić i saradnici su pokazali da hronična primena kortikosterona kod pacova redukuje SOD aktivnost u plazmi (Stanić et al., 2016). Štaviše prekliničke studije ukazuju da izlaganje fizičkom i emocionalnom stresu, uključujući „emocionalni” ultrazvučni stres, socijalnu paradigmu, zadržavanje ili imobilizaciju, i hroničnu egzogenu administraciju glukokortikoida, može da redukuje aktivnosti antioksidativnih enzima, uključujući SOD, glutantion-S-transferazu, glutantion reduktazu i katalazu u mozgu, srcu, jetri i plazmi (Zafir i Banu, 2009; Patki et al., 2013; Stanić et al., 2016). Dodatno, rezultati ovih studija ukazali su na signifikantno povećanje proteinskog karbonil sadržaja, što ukazuje na oksidativna oštećenja proteina i povećanje koncentracije malondialdehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije, nakon stresa (Liu et al., 1996; Zafir i Banu, 2009; de Munter et al., 2021). Pored toga nakon izlaganja stresu glukokortikoidima posredovanim signalnim putem dolazi do neuralnih oštećenja, gde potencijalni mehanizmi uključuju nedostatak glukoze, pogoršanje glutamatom izazvane ekscitotoksičnosti i inhibiciju uklanjanja glutamata (Goodman et al., 1996; Perez-Nievas et al., 2007). Interesantno je da su ovi mehanizmi povezani sa preteranom produkcijom ROS, RNS i inflamatornih medijatora u mozgu, pa se povišen nivo kortikosterona u plazmi razmatra kao potencijalni prediktor povećanog oksidativnog stresa u mozgu (Perez-Nievas et al., 2007). U daljim ispitivanjima povećanje oksidativnog oštećenja u hipokampusu povezano je sa oštećenjem prostorne memorije. Naime Sato i saradnici pokazali su da povećana aktivnost HPA osovine, tretmanom kortikosteronom u trajanju od 14 dana, povećava oksidativna oštećenja u hipokampusu povećanjem lipidne peroksidacije i oksidacije proteina skoro dva i tri puta više u odnosu na kontrolnu grupu životinja, i smanjenjem aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, katalaze i glutantion peroksidaze, što rezultuje smanjenjem memorijske funkcije skoro 60% ispitivano Morisovim vodenim lavirintom (Sato et al., 2010).

Koliko je nama poznato, prvi put je pokazano u ovom istraživanju da tretman magnezijumom ublažava štetne efekte ACTH hormona na delikatan balans između oksidanasa i antioksidativnog odbrambenog mehanizma. Suplementacija magnezijumom je dovela do signifikantnog smanjenja nivoa superoksid anjona uz povećanje aktivnosti SOD enzima u ACTH/Mg tretiranoj grupi pacova, pokazujući protektivan efekat na prekomernu produkciju ROS-a i oslabljen antioksidativni odbrambeni mehanizam. Iako nije bilo razlike u nivou produkata oksidacije proteina između kontrolne grupe i ACTH tretirane grupe životinja, tretman magnezijumom je značajno smanjio nivo produkata oksidacije proteina. U skladu sa ovim zapažanjem je i povećana aktivnost PON1 enzima kod životinja dugoročno tretiranih magnezijumom u poređenju sa ACTH grupom.

Veza između magnezijuma i oksidativnog stresa je opisana međutim literaturni podaci koji podržavaju pozitivne efekte magnezijuma na redoks homeostazu i genomsku stabilnost, kao i potencijalna terapijska upotreba ostali su dvosmisleni. Hipomagnezijemija je povezivana sa povećanim stvaranjem ROS-a i RNS-a, gde se ova veza često može detektovati kod pacijenta koji imaju hipertenziju, dijabetes i srčanu insuficijenciju (Liu i Dudley, 2020). Dodatno, nizak nivo magnezijuma u ishrani i redukovana plazma/serum nivo magnezijuma kod gojaznih ljudi se dovodi u vezu sa smanjenjem kapaciteta antioksidativnih enzima, inflamacijom, poremećenom homeostazom kalcijuma i povećanom lipidnom peroksidacijom, odnosno povećanom koncentracijom MDA (Codoner-Franch et al., 2010; Celik et al., 2011; Morais et al., 2017; Liu i Dudley, 2020). Sa druge strane preklinička studija ukazuje da dijeta sa smanjenim unosom magnezijuma (15-30 mg/kg Mg) kod C57BL/6J miševa može da dovede do dijastolne kardiomiopatije (Liu et al., 2021). Štaviše srčana patologija se javlja zajedno sa signifikatnom redukcijom ćelijskog nivoa ATP-a, mitohondrijalnom disfunkcijom i povećanom mitohondrijalnom produkcijom ROS-a u srcu. Najinteresantnije je da su sve navedene promene anulirane kada je dijeta sa normalnim sadržajem magnezijuma primenjena kod životinja (Liu et al., 2021). Pored toga, značajno zapažanje koje ide u prilog hipotezi o ulozi magnezijuma u poboljšanju antioksidativne zaštite smanjenjem ROS/RNS produkcije, potiče od studije koju su sprovedi Hans i saradnici na pacovima sa dijabetesom, koji su pokazali signifikantno povećanje markera oksidativnog stresa (Hans et al., 2003). Tretman magnezijumom u trajanju od četiri nedelje signifikantno je smanjio MDA koncentraciju u jetri i plazmi i povećao aktivnost antioksidativnih enzima kod pacova sa dijabetesom. Predloženi mehanizmi pozitivnih efekata magnezijuma u održavanju redoks homeostaze i stabilnosti genoma, potencijalno uključuju inhibiciju povećane mitohondrijalne ROS produkcije, supresiju mitohondrijalnog opterećenja kalcijumom i otvaranja mitohondrijalne permeabilne transportne pore, kao i uključivanje u endogeno ispravljanje oštećenja DNK molekula (Hartwig, 2001; Liu i Dudley, 2020).

5.7. *ex-vivo* oksidativno oštećenje DNK nakon ACTH tretmana, protektivni efekat magnezijuma

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da dugoročni ACTH tretman signifikantno povećava osetljivost perifernih limfocita na eksperimentalno izazvana oksidativna oštećenja nuklearne DNK. U prisustvu H₂O₂ kao oksidansa ACTH tretman dovodi do značajnog povećanja totalnog broja perifernih limfocita sa DNK oštećenjem, kao i povećanja broja ćelija sa umerenim i visokim DNK oštećenjem, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Dodatno, u postavci našeg istraživanja prepostavili smo da magnezijum ima bitnu ulogu u zaštiti DNK molekula od

slobodnih radikala. U skladu sa našom pretpostavkom, podaci ukazuju da tretman magnezijumom preventivno deluje na DNK oštećenja izazvana ACTH tretmanom, odnosno ACTH/Mg tretirana grupa životinja nije pokazala razliku u totalnom broju perifernih limfocita sa DNK oštećenjem, niti u broju ćelija sa umerenim i visokim DNK oštećenjem, u poređenju sa kontrolnom grupom životinja.

Dobijeni rezultati potkrepljuju rezultate iz prethodnih studija pokazujući potencijalno još jednu značajnu odliku povećanog nivoa glukokortikoida, odnosno sposobnost glukokortikoida da utiču na oksidativna DNK oštećenja. Značajno povećanje DNK oštećenja i slabljenje sistema obnavljanja DNK molekula primećeno je u istraživanjima kod različitih tipova ćelija nakon *in vitro* ili *in vivo* izlaganja kortizolu (Flaherty et al., 2017). Liu i saradnici su pokazali povećan nivo 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina u cerebralnom korteksu pacova nakon akutnog stresa imobilizacijom (Liu et al., 1996). Zatim su Consiglio i saradnici pokazali da je DNK oštećenje prisutno u hipokampusu i amigdali odmah nakon akutnog stresa izazvanog zadržavanjem ili testom forsiranog plivanja, te da je oštećenje detektabilno u hipokampusu i sedam dana nakon akutnog stresa (Consiglio et al., 2010). Pored toga skorašnje studije istakle su vezu između hroničnog psihološkog stresa i otpornosti ćelija na oksidativna DNK oštećenja (Aschbacher et al., 2013; Black et al., 2017). Dodatno u više studija dobijeni su rezultati koji ukazuju da su markeri (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozine i 8-okso-7,8-dihidrooguanozine) koji ukazuju na oksidativna RNK i DNK oštećenja pozitivno povezani sa povećanjem psihološkog stresa i nivoa kortizola (Joergensen et al., 2011; Black et al., 2017).

Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa prethodnim istraživanjem iz naše laboratorije koje je bilo bazirano na modelu depresije izazvane produženom primenom kortikosterona (100 mg/L, *per os*, 21 dan) kod pacova (Stanić et al., 2016). Interesantno je da je kortikosteron uticao na DNK integritet predominantno povećavajući osetljivost perifernih limfocita na visoki nivo oštećenja DNK bez značajnog efekta na broj ćelija sa umerenim oštećenjem, dok je ACTH hormon efekat ostvario i na ćelije sa umerenim i na ćelije sa visokim nivom oštećenja DNK. Iznenadjuće je da u odsustvu H₂O₂ ni dugoročna primena kortikosterona (Stanić et al., 2016), ni dugoročna primena ACTH hormona nisu uticala na totalni broj perifernih limfocita sa DNK oštećenjem u odnosu na kontrolnu grupu. Svakako se može spekulirati da je štetni efekat ACTH hormona na oksidativna oštećenja DNK predominantno posredovan glukokortikoidima, kao rezultat ACTH indukovanog povećanja sinteze i oslobađanja glukokortikoida.

Protektivni efekat magnezijuma na oksidativna DNK oštećenja u uslovima povećane aktivnosti HPA osovine u skladu je sa dostupnim rezultatima iz kliničke studije. Naime Petrović i saradnici su pokazali da četvoronedeljna suplementacija magnezijumom pokazuje preventivni efekat na *ex-vivo* oksidativna DNK oštećenja perifernih limfocita kod igrača ragbija, koji su pokazali signifikantno povećanje oksidativnog DNK oštećenja u odnosu na sedentarnu kontrolu (Petrović et al., 2016). Međutim, iako je veza između deficita magnezijuma i oksidativnog stresa pokrivena studijama, dostupnost studija koje istražuju mehanizam protektivnog efekta magnezijuma na genomsku stabilnost u poremećajima povezanim sa stresom je oskudna.

5.8. Uticaj magnezijuma na oksidativni status i oksidativno oštećenje DNK

U ovom istraživanju pokazali smo da suplementacija magnezijumom u trajanju od 28 dana značajno smanjuje nivo produkata oksidacije proteina. Pored toga suplementacija magnezijumom dovodi do signifikantnog smanjenja nivoa superoksid anjona i povećanja aktivnosti SOD enzima, antioksidativnog enzima, pokazujući tako protektivan efekat u uslovima povećane aktivnosti HPA osovine. Međutim efekat magnezijuma bio je prisutan samo u uslovima prekomernog stvaranja superoksid anjona i smanjene aktivnosti SOD enzima, dok je izostao u normalnim uslovima. Dodatno vrednosti totalnog oksidativnog statusa i aktivnosti paraoksonaze 1 u plazmi su ostale relativno nepromenjene kod eksperimentalnih životinja koje su primale samo četvoronedeljni tretman magnezijumom u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Sa druge strane rezultati ovog istraživanja ukazuju da dugoročni tretman magnezijumom smanjuje osetljivost DNK perifernih limfocita na oksidativna oštećenja izazvana *in vitro* izlaganjem oksidansu. Tretman magnezijumom smanjio je totalni broj ćelija sa oksidativnim DNK oštećenjem, pre svega smanjenjem ćelija sa umerenim DNK oštećenjem u poređenju sa kontrolnom grupom. Pored toga kao što je već diskutovano, magnezijum preventivno deluje i na DNK oštećenja izazvana ACTH tretmanom, smanjenjem totalnog ali i broja ćelija sa umerenim i visokim DNK oštećenjem u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Međutim ni magnezijum nije uticao na broj ćelija sa DNK oštećenjem u odsustvu H₂O₂.

Potencijal magnezijuma da redukuje ćelijska oksidativna oštećenja i da povećava aktivnost antioksidativnih enzima ispitivana je u nizu *in vitro* i *in vivo* studija. U *in vitro* ispitivanju Chen i saradnici su pokazali da magnezijum povećava aktivnost SOD enzima i katalaze, i time smanjuje oksidativna oštećenja nastala UV zračenjem (Chen et al., 2019). Međutim, rezultati iz prekliničkih studija o samom efektu tretmana magnezijumom na oksidativni status su dvosmisleni. Pokazano je da tretman magnezijumom u ko-administraciji sa selenom povećava aktivnost antioksidativnih enzima kod pacova hranjenim visoko masnom ishranom (Zhang et al., 2018), smanjuje lipidnu peroksidaciju u koštanom tkivu i jetri (Scibior et al., 2018; Scibior et al., 2013), dok deficit magnezijuma u ishrani smanjuje aktivnost antioksidativnih enzima (Kuzniar et al., 2003; Chaudhary et al., 2007). Zhang i saradnici su pokazali da tretman magnezijumom u trajanju od osam nedelja u ko-administraciji sa selenom povećava aktivnost antioksidativnog SOD enzima, dok je smanjena koncentracija MDA produkta lipidne peroksidacije u serumu (Zhang et al., 2018). U skladu sa ovim rezultatima, tretman magnezijumom u trajanju od 12 nedelja smanjio je lipidnu peroksidaciju i povećao aktivnost glutantion-S-transferaze u koštanom tkivu, međutim uz smanjenje aktivnosti SOD enzima, glutantion peroksidaze i glutantion reduktaze (Scibior et al., 2018). Povećana aktivnost glutantion-S-transferaze nakon tretmana magnezijumom pokazana je i u antioksidativnom sistemu eritrocita (Scibior i Zaporowska, 2010). Sadir i saradnici su pokazali da tretman magnezijumom u trajanju od 28 dana, nezavisno od oblika magnezijumove soli koja je korišćena MgCl₂, MgSO₄ ili MgT smanjuje koncentraciju MDA u mozgu pacova, što ukazuje dalje na smanjenu lipidnu peroksidaciju u moždanom tkivu (Sadir et al., 2019). Rezultati ovih studija ukazuju da tretman magnezijumom smanjuje lipidnu peroksidaciju u koštanom tkivu, jetri, mozgu i serumu, uz povećanje aktivnosti pre svega glutantion-S-transferaze pokazano u koštanom tkivu i eritrocitima. Međutim navedeni parametri, koncentracija MDA i aktivnost glutantion-S-transferaze nažalost nisu ispitivani u okviru našeg istraživanja. Pored navedenih istraživanja, ispitivan je i efekat hipomagnezijemije na oksidativni status kroz animalne modele smanjenog unosa magnezijuma putem ishrane. Pokazano je da deficit magnezijuma u ishrani kod Wistar pacova u trajanju od tri meseca smanjuje aktivnost antioksidativnih enzima u jetri,

smanjuje nivo neenzimskih antioksidanasa u plazmi, uz povećanu lipidnu peroksidaciju (Chaudhary et al., 2007). Sličan efekat deficita magnezijuma u ishrani je pokazan nakon 22 dana u mišijem modelu na antioksidativni sistem eritrocita, sam deficit magnezijuma u ishrani je povezan sa smanjenjem aktivnosti SOD, glutantion peroksidaze i glutantion-S-transferaze, uz smanjenje nivoa glutantiona (Kuzniar et al., 2003). Dodatno u već pominjanoj studiji Hans i saradnici su pokazali da četvoronedeljna suplementacija Mg u animalnom modelu dijabetesa povećava aktivnost SOD enzima i glutantion-S-transferaze, povećava nivo vitamina C, uz smanjenje lipidne peroksidacije (Hans et al., 2003). Izostanak efekta samostalnog tretmana magnezijumom na aktivnosti SOD enzima u našem istraživanju je iznenađenje, međutim kako je u dijabetesnom modelu i modelima deficita magnezijuma kroz ishranu ispitivan efekat niskog nivoa magnezijuma, sama kontrolna grupa je imala normalan nivo Mg, što potencijalno ukazuje na bitnost samog bazalnog nivoa magnezijuma. S tim u vezi, u prekliničkoj studiji pokazano je da tretmani magnezijum-pikolinatom i magnezijum oksidom u trajanju od 8 nedelja smanjuju oksidativni stres, smanjenjem nivoa MDA u mozgu, jetri i serumu i povećanjem aktivnosti SOD enzima i katalaze u mozgu, dok je efekat izraženiji kod životinja hranjenih visoko masnom ishranom, koja je pokazala negativan efekat na koncentraciju magnezijuma (Orhan et al., 2022). Što je u skladu sa rezultatima 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 svakako je interesantan efekat tretmana magnezijumom u našem istraživanju na smanjenje produkata oksidacije proteina, s obzirom da ispitivanje efekta magnezijuma na AOPP nije dostupno u literaturi.

Literaturni podaci ukazuju da magnezijum između ostalog ima ulogu u stabilizaciji DNK molekula, odnosno da niska koncentracija magnezijuma utiče na destabilizaciju DNK molekula (Anastassopoulou i Theophanides, 2002; Hartwig, 2001). Potencijalni efekat magnezijuma na DNK molekul uključuje održavanje strukture DNK, uticaj na tačnost DNK replikaciju, uticaj na aktivaciju procesa DNK reparacije i stimulaciju vezivanja mikrotubula (Hartwig, 2001). Pozitivan efekat magnezijuma pokazan je i u kliničkoj studiji, Petrović i saradnici su pokazali da četvoronedeljna suplementacija magnezijumom pokazuje preventivni efekat na *ex-vivo* oksidativna DNK oštećenja perifernih limfocita, pre svega ostvarujući efekat na ćelije sa visokim DNK oštećenjem u poređenju sa kontrolnom grupom životinja (Petrović et al., 2016).

Pored dostupnih studija mehanizam antioksidativnih svojstava magnezijuma je kompleksan i nedovoljno istražen, međutim trenutno ima nekoliko značajnih aspekata koje bi trebalo pomenuti. Ukoliko se osvrnemo na molekularne medijatora i puteva, pretpostavka je da supresija glutamatergičkih NMDA receptora u hipotalamusu, preko ekstracelularnog jona Mg umanjuje hiperaktivnost HPA osovine i ublažava štetne efekte ACTH hormona i kortikosterona (Cratty i Birkle, 1999; Zhou et al., 2018). Pored toga magnezijum ima ključnu ulogu u velikom broju fizioloških procesa kao blokator kalcijumovih kanala, gde je samo mala promena u intracelularnoj koncentraciji magnezijuma povezana sa poremećenim kalcijumovim putem i kalcijumovom citotoksičnošću (de Baaij et al., 2015). Literaturni podaci ukazuju da magnezijum modulira aktivnost NMDA receptora i L-tipa kalcijumovih kanala, smanjuje prekomerni ulazak kalcijuma i prevenira abnormalno povećanje intracelularne koncentracije kalcijuma (Morais et al., 2017), dok hipomagnezijemija promoviše razdvajanje oksidativne fosforilacije i mitohondrijalnu disfunkciju, dovodi do povećanja nivoa intracelularnog kalcijuma, što dalje povećava formiranje slobodnih radikala i peroksinitrila (Morais et al., 2017; Zheltova et al., 2016).

U sistemskom pregledu i meta analizi pokazano je da je nivo magnezijuma signifikatno niži u serumu i plazmi pacijenata koji imaju AD u odnosu na zdrave kontrole (Du et al., 2021), dok je sve veći broj studija koji ukazuje na vezu između oksidativnog stresa i neurodegenerativnih bolesti (Singh et al., 2019; Chiurchiù et al., 2016). U kliničkim studijama kod pacijenata sa AD i MCI pokazana je smanjena aktivnost antioksidativnih enzima i povećanje lipidne peroksidacije u serumu (Padurariu et al., 2010), zatim periferni limfociti pacijenata sa AD pokazali su drugačiju kinetiku reparacije oštećenja DNK (Leandro et al., 2013), što dalje usmerava istraživanja ka oštećenju DNK molekula kao jednim od potencijalno važnih faktora u patologiji AD (Lin et al., 2020). Pored toga u kliničkim studijama kod pacijenata sa AD pokazan je nizak nivo magnezijuma u serumu (Lemke, 1995), nizak nivo jonizujućeg slobodnog magnezijuma u plazmi koji je u korelaciji sa kognitivnim funkcijama (Barbagallo et al., 2011), i da nivo serumskog magnezijuma pokazuje vezu sa stepenom AD (Cilliler et al., 2007). U skladu sa navedenim istraživanjima, istraživanja koja se bave ispitivanjem efekta magnezijuma na oksidativni status u *in vitro* i *in vivo* modelima AD, uz praćenje efekata na kogniciju postaju sve interesantnija. Xiong i saradnici su pokazali da u *in vitro* modelu AD (amiloid- β tretirane neuralne ćelije hipokampusu) magnezijum-L-treonat prevenira oksidativni stres i apoptozu ćelija (Xiong et al., 2022). Štaviše u prekliničkoj studiji istog istraživanja tretman magnezijum-L-treonatom u trajanju od tri meseca uspeo je da poboljša kognitivne rezultate u Morisovom vodenom lavirintu, uz smanjenje oksidativnog stresa u hipokampusu i apoptoze neuralnih ćelija u mišijem modelu AD (Xiong et al., 2022). Pored toga, u kliničkom ispitivanju Balmus i saradnici su pokazali korelaciju između povećanog nivoa lipidne peroksidacije, smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima i smanjenja nivoa magnezijuma u serumu kod pacijenata sa AD i MCI (Balmuş et al., 2017).

Svakako bi trebalo osvrnuti se i na mali broj dostupnih prekliničkih studija koje su ispitivale korelaciju nivoa magnezijuma sa oksidativnim stresom i rezultatima memorijskih testova. Orhan i saradnici su pokazali da životinje hranjene visoko masnom ishranom imaju niske nivoe magnezijuma u serumu, jetri i mozgu, dok u isto vreme pokazuju povećan nivo MDA i smanjenu antioksidativnu aktivnost u mozgu, uz negativan efekat na prostornu memoriju u poređenju sa kontrolnom grupom. Štaviše tretman magnezijumom u vidu magnezijum pikolinata ili magnezijum oksida povećava nivo magnezijuma uz pozitivne efekte na memoriju i oksidativni status, smanjenjem nivoa MDA i povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (Orhan et al., 2022). Dodatno, u ispitivanju efekata dugoročnih tretmana magnezijum-L-treonatom, magnezijum-hloridom i magnezijum-sulfatom, pokazano je da pozitivan efekat na retenciju memorije ima samo magnezijum-L-treonat u većim dozama 100 mg/kg i 150 mg/kg, dozama koje su pokazale signifikatno veći nivo magnezijuma u plazmu u odnosu na druge tretirane grupe, međutim tretman magnezijumom nezavisno od oblika soli koja je korišćena, smanjuje koncentraciju MDA u mozgu pacova što ukazuje na smanjenje lipidne peroksidacije (Sadir et al., 2019).

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata i diskusije ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Aktivacija hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda 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 modulirala 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 modulirali su 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 manifestovao 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.

7. 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.

Adcock, I.M., Mumby, S., 2017. Glucocorticoids. *Handb Exp Pharmacol* 237, 171-196.

Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.

Altman, J.D., Trendelenburg, A.U., MacMillan, L., Bernstein, D., Limbird, L., Starke, K., Kobilka, B.K., Hein, L., 1999. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 56, 154-161.

Amaral, D.G., Scharfman, H.E., Lavenex, P., 2007. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163, 3-22.

Amidfar, M., de Oliveira, J., Kucharska, E., Budni, J., Kim, Y.K., 2020. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci* 257, 118020.

Anastassopoulou, J., Theophanides, T., 2002. Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Crit Rev Oncol Hematol* 42, 79-91.

Anderson, D., Yu, T.W., Phillips, B.J., Schmezer, P., 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res* 307, 261-271.

Antunes, M., Biala, G., 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13, 93-110.

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.

Auclair C., Voisin E., 1985. Nitroblue tetrazolium reduction, in: RA, G. (Ed.), *CRC Handbook Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, pp. 123-132.

Bajpai, A., Verma, A.K., Srivastava, M., Srivastava, R., 2014. Oxidative stress and major depression. *J Clin Diagn Res* 8, Cc04-07.

Baker, K.B., Kim, J.J., 2002. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem* 9, 58-65.

Bakunina, N., Pariante, C.M., Zunszain, P.A., 2015. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. *Immunology* 144, 365-373.

- Baldeiras, I., Santana, I., Proença, M.T., Garrucho, M.H., Pascoal, R., Rodrigues, A., Duro, D., Oliveira, C.R., 2008. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 15, 117-128.
- Bali, D., Singh, J.R., Singh, H., Sandhu, D., 1990. In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs. I. Hydrocortisone. *Environ Mol Mutagen* 16, 250-254.
- Balmuş, I.M., Strungaru, S.A., Ciobica, A., Nicoara, M.N., Dobrin, R., Plavan, G., Ştefănescu, C., 2017. Preliminary Data on the Interaction between Some Biometals and Oxidative Stress Status in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Patients. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 7156928.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M., Chrousos, G.P., 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17, 245-261.
- Barbagallo, M., Belvedere, M., Di Bella, G., Dominguez, L.J., 2011. Altered ionized magnesium levels in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Magnes Res* 24, S115-121.
- Barbosa, F.F., Pontes, I.M., Ribeiro, A.M., Silva, R.H., 2010. Extending possible applications of an episodic-like memory task in rats. *Behav Brain Res* 215, 326-331.
- Bass, J.J., Wilkinson, D.J., Rankin, D., Phillips, B.E., Szewczyk, N.J., Smith, K., Atherton, P.J., 2017. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 27, 4-25.
- 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.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Medina, J.H., 2014. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76 Pt C, 677-683.
- Benarroch, E.E., 2018. Locus coeruleus. *Cell Tissue Res* 373, 221-232.
- Benowitz, L.I., Routtenberg, A., 1997. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20, 84-91.
- Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., Drieu la Rochelle, C., 2006. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J Pharmacol Toxicol Methods* 54, 99-105.
- Billard, J.M., 2006. Ageing, hippocampal synaptic activity and magnesium. *Magnes Res* 19, 199-215.
- Bizon, J.L., Gallagher, M., 2005. More is less: neurogenesis and age-related cognitive decline in Long-Evans rats. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005, re2.
- Bio-techne, Immunohistochemistry (IHC) Handbook, BR_IHCguide_011617.

- 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.
- Black, C.N., Bot, M., Scheffer, P.G., Cuijpers, P., Penninx, B.W., 2015. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 51, 164-175.
- Blanke, M.L, Van Dongen, A.M.J., 2009. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor., in: AMJ, V. (Ed.), *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 2013. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. *Mol Brain* 6, 5.
- Bogdanovic, N., Davidsson, P., Volkman, I., Winblad, B., Blennow, K., 2000. Growth-associated protein GAP-43 in the frontal cortex and in the hippocampus in Alzheimer's disease: an immunohistochemical and quantitative study. *J Neural Transm (Vienna)* 107, 463-478.
- Boudaba, C., Szabó, K., Tasker, J.G., 1996. Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci* 16, 7151-7160.
- 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.
- Broadbent, N.J., Gaskin, S., Squire, L.R., Clark, R.E., 2010. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem* 17, 5-11.
- Brodziak, A., Kołat, E., Różyk-Myrta, A., 2014. In search of memory tests equivalent for experiments on animals and humans. *Med Sci Monit* 20, 2733-2739.
- Brown, J.P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, H.G., 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467, 1-10.
- Browne, K.D., Leoni, M.J., Iwata, A., Chen, X.H., Smith, D.H., 2004. Acute treatment with MgSO₄ attenuates long-term hippocampal tissue loss after brain trauma in the rat. *J Neurosci Res* 77, 878-883.
- Budni, J., Bellettini-Santos, T., Mina, F., Garcez, M.L., Zugno, A.I., 2015. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis* 6, 331-341.
- Burtscher, J., Copin, J.C., Rodrigues, J., Kumar, S.T., Chiki, A., Guillot de Suduiraut, I., Sandi, C., Lashuel, H.A., 2019. Chronic corticosterone aggravates behavioral and neuronal symptomatology in a mouse model of alpha-synuclein pathology. *Neurobiol Aging* 83, 11-20.
- Busada, J.T., Cidlowski, J.A., 2017. Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development. *Curr Top Dev Biol* 125, 147-170.
- Callaghan, C.K., Kelly Á, M., 2012. Differential BDNF signaling in dentate gyrus and perirhinal cortex during consolidation of recognition memory in the rat. *Hippocampus* 22, 2127-2135.
- Cameron, H.A., Glover, L.R., 2015. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu Rev Psychol* 66, 53-81.

- Cameron, H.A., Gould, E., 1996. Distinct populations of cells in the adult dentate gyrus undergo mitosis or apoptosis in response to adrenalectomy. *J Comp Neurol* 369, 56-63.
- Cardoso, C.C., Lobato, K.R., Binfaré, R.W., Ferreira, P.K., Rosa, A.O., Santos, A.R., Rodrigues, A.L., 2009. Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of magnesium. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33, 235-242.
- Celik, N., Andiran, N., Yilmaz, A.E., 2011. The relationship between serum magnesium levels with childhood obesity and insulin resistance: a review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab* 24, 675-678.
- Chalmers, D.T., Lovenberg, T.W., De Souza, E.B., 1995. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 15, 6340-6350.
- Chang, A.C., Cochet, M., Cohen, S.N., 1980. Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4890-4894.
- Chao, H.M., McEwen, B.S., 1994. Glucocorticoids and the expression of mRNAs for neurotrophins, their receptors and GAP-43 in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 26, 271-276.
- Chao, H.M., Spencer, R.L., Sakai, R.R., McEwen, B.S., 1992. The expression of growth-associated protein GAP-43 mRNA in the rat hippocampus in response to adrenalectomy and aging. *Mol Cell Neurosci* 3, 529-535.
- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G., 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67, 259-284.
- 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.
- Chiurchiù, V., Orlacchio, A., Maccarrone, M., 2016. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 7909380.
- Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama* 267, 1244-1252.
- Cilliler, A.E., Ozturk, S., Ozbakir, S., 2007. Serum magnesium level and clinical deterioration in Alzheimer's disease. *Gerontology* 53, 419-422.

- Clarke, J.R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., Delgado-García, J.M., 2010. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2652-2657.
- Cline, B.H., Anthony, D.C., Lysko, A., Dolgov, O., Anokhin, K., Schroeter, C., Malin, D., Kubatiev, A., Steinbusch, H.W., Lesch, K.P., Strekalova, T., 2015. Lasting downregulation of the lipid peroxidation enzymes in the prefrontal cortex of mice susceptible to stress-induced anhedonia. *Behav Brain Res* 276, 118-129.
- Codoñer-Franch, P., Boix-García, L., Simó-Jordá, R., Del Castillo-Villaescusa, C., Maset-Maldonado, J., Valls-Bellés, V., 2010. Is obesity associated with oxidative stress in children? *Int J Pediatr Obes* 5, 56-63.
- Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26, 249-261.
- 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.
- Cooray, S.N., Clark, A.J., 2011. Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Mol Cell Endocrinol* 331, 215-221.
- Costello, R., Wallace, T.C., Rosanoff, A., 2016. Magnesium. *Adv Nutr* 7, 199-201.
- Cowan, N., 2008. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res* 169, 323-338.
- Cratty, M.S., Birkle, D.L., 1999. N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated corticotropin-releasing factor (CRF) release in cultured rat amygdala neurons. *Peptides* 20, 93-100.
- Cunha, C., Brambilla, R., Thomas, K.L., 2010. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3, 1.
- Dang, R., Guo, Y.Y., Zhang, K., Jiang, P., Zhao, M.G., 2019. Predictable chronic mild stress promotes recovery from LPS-induced depression. *Mol Brain* 12, 42.
- de Baaij, J.H., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., 2015. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev* 95, 1-46.
- de Bruin, N.M., Prickaerts, J., van Loevezijn, A., Venhorst, J., de Groote, L., Houba, P., Reneerkens, O., Akkerman, S., Kruse, C.G., 2011. Two novel 5-HT₆ receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced memory deficits in the object recognition and object location tasks in Wistar rats. *Neurobiol Learn Mem* 96, 392-402.
- de Kloet, E.R., Oitzl, M.S., Joëls, M., 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22, 422-426.
- 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., Strekalova, 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.
- de Quervain, D.J., Roozendaal, B., Nitsch, R.M., McGaugh, J.L., Hock, C., 2000. Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nat Neurosci* 3, 313-314.
- DeCarli, C., 2003. Mild cognitive impairment: prevalence, prognosis, aetiology, and treatment. *Lancet Neurol* 2, 15-21.
- Dekker, L.V., De Graan, P.N., Versteeg, D.H., Oestreicher, A.B., Gispen, W.H., 1989. Phosphorylation of B-50 (GAP43) is correlated with neurotransmitter release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 52, 24-30.
- Deng, Q., Riquelme, D., Trinh, L., Low, M.J., Tomić, M., Stojilkovic, S., Aguilera, G., 2015. Rapid Glucocorticoid Feedback Inhibition of ACTH Secretion Involves Ligand-Dependent Membrane Association of Glucocorticoid Receptors. *Endocrinology* 156, 3215-3227.
- Denny, C.A., Burghardt, N.S., Schachter, D.M., Hen, R., Drew, M.R., 2012. 4- to 6-week-old adult-born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 22, 1188-1201.
- Denny, J.B., 2006. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. *Curr Neuropharmacol* 4, 293-304.
- Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A., 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 673-704.
- Ding, H., Cui, X.Y., Cui, S.Y., Ye, H., Hu, X., Zhao, H.L., Liu, Y.T., Zhang, Y.H., 2018. Depression-like behaviors induced by chronic corticosterone exposure via drinking water: Time-course analysis. *Neurosci Lett* 687, 202-206.
- Djouma, E., Card, K., Lodge, D.J., Lawrence, A.J., 2006. The CRF1 receptor antagonist, antalarmin, reverses isolation-induced up-regulation of dopamine D2 receptors in the amygdala and nucleus accumbens of fawn-hooded rats. *Eur J Neurosci* 23, 3319-3327.
- Dmitrašinović, G., Pešić, V., Stanić, D., Plećaš-Solarović, B., Dajak, M., Ignjatović, S., 2016. ACTH, Cortisol and IL-6 Levels in Athletes following Magnesium Supplementation. *J Med Biochem* 35, 375-384.
- Dominguez, L.J., Barbagallo, M., 2018. Nutritional prevention of cognitive decline and dementia. *Acta Biomed* 89, 276-290.
- Donner, N.C., Montoya, C.D., Lukkes, J.L., Lowry, C.A., 2012. Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. *Psychoneuroendocrinology* 37, 645-661.
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen, B.S., Manji, H.K., 2009. Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3543-3548.

- Du, K., Zheng, X., Ma, Z.T., Lv, J.Y., Jiang, W.J., Liu, M.Y., 2021. Association of Circulating Magnesium Levels in Patients With Alzheimer's Disease From 1991 to 2021: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci* 13, 799824.
- Eichenbaum, H., 2017. Memory: Organization and Control. *Annu Rev Psychol* 68, 19-45.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A.P., Ranganath, C., 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30, 123-152.
- 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.
- Ennaceur, A., Cavoy, A., Costa, J.C., Delacour, J., 1989. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. II: Effects of piracetam and pramiracetam. *Behav Brain Res* 33, 197-207.
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31, 47-59.
- Ennaceur, A., Meliani, K., 1992. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav Brain Res* 51, 83-92.
- Ennaceur, A., Michalikova, S., Bradford, A., Ahmed, S., 2005. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav Brain Res* 159, 247-266.
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38, 1103-1111.
- Evans, A.K., Park, H.H., Saw, N.L., Singhal, K., Ogawa, G., Leib, R.D., Shamloo, M., 2021. Age-related neuroinflammation and pathology in the locus coeruleus and hippocampus: beta-adrenergic antagonists exacerbate impairment of learning and memory in aged mice. *Neurobiol Aging* 106, 241-256.
- Farmaceutski fakultet, 2020. Katalog opreme Farmaceutskog fakulteta in: Farmaceutskog fakulteta, U.u.B.
- Fink, G., 2010. Stress: Definition and history. *Stress Sci*, 3-9.
- 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.
- Forray, M.I., Gysling, K., 2004. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev* 47, 145-160.

- Frankland, P.W., Bontempi, B., 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119-130.
- Gamallo, A., Alario, P., Gonzalez-Abad, M.J., Villanua, M.A., 1992. Acute noise stress, ACTH administration, and blood pressure alteration. *Physiol Behav* 51, 1201-1205.
- Gamallo, A., Alario, P., Villanúa, M.A., Nava, M.P., 1988. Effect of chronic stress in the blood pressure in the rat: ACTH administration. *Horm Metab Res* 20, 336-338.
- Gard, P.R., Daw, P., Mashhour, Z.S., Tran, P., 2007. Interactions of angiotensin IV and oxytocin on behaviour in mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 8, 133-138.
- Gard, P.R., Naylor, C., Ali, S., Partington, C., 2012. Blockade of pro-cognitive effects of angiotensin IV and physostigmine in mice by oxytocin antagonism. *Eur J Pharmacol* 683, 155-160.
- Gaskin, S., Tremblay, A., Mumby, D.G., 2003. Retrograde and anterograde object recognition in rats with hippocampal lesions. *Hippocampus* 13, 962-969.
- Gianotti, C., Nunzi, M.G., Gispén, W.H., Corradetti, R., 1992. Phosphorylation of the presynaptic protein B-50 (GAP-43) is increased during electrically induced long-term potentiation. *Neuron* 8, 843-848.
- Gibbs, M.E., Hutchinson, D.S., Summers, R.J., 2010. Noradrenaline release in the locus coeruleus modulates memory formation and consolidation; roles for α - and β -adrenergic receptors. *Neuroscience* 170, 1209-1222.
- 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.
- Goodman, Y., Bruce, A.J., Cheng, B., Mattson, M.P., 1996. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 66, 1836-1844.
- 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.
- Gröber, U., Schmidt, J., Kisters, K., 2015. Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients* 7, 8199-8226.
- Hallak, M., Berman, R.F., Irtenkauf, S.M., Evans, M.I., Cotton, D.B., 1992. Peripheral magnesium sulfate enters the brain and increases the threshold for hippocampal seizures in rats. *Am J Obstet Gynecol* 167, 1605-1610.
- Hallak, M., Berman, R.F., Irtenkauf, S.M., Janusz, C.A., Cotton, D.B., 1994. Magnesium sulfate treatment decreases N-methyl-D-aspartate receptor binding in the rat brain: an autoradiographic study. *J Soc Gynecol Investig* 1, 25-30.
- 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.
- Hartwig, A., 2001. Role of magnesium in genomic stability. *Mutat Res* 475, 113-121.

- Heitzer, M.D., Wolf, I.M., Sanchez, E.R., Witchel, S.F., DeFranco, D.B., 2007. Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 321-330.
- Held, K., Antonijevic, I.A., Künzel, H., Uhr, M., Wetter, T.C., Golly, I.C., Steiger, A., Murck, H., 2002. Oral Mg(2+) supplementation reverses age-related neuroendocrine and sleep EEG changes in humans. *Pharmacopsychiatry* 35, 135-143.
- 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.
- Herman, J.P., Cullinan, W.E., Morano, M.I., Akil, H., Watson, S.J., 1995. Contribution of the ventral subiculum to inhibitory regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neuroendocrinol* 7, 475-482.
- Herman, J.P., Cullinan, W.E., Young, E.A., Akil, H., Watson, S.J., 1992. Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression. *Brain Res* 592, 228-238.
- Herman, J.P., Dolgas, C.M., Carlson, S.L., 1998. Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience* 86, 449-459.
- Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K., Figueiredo, H., 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 1201-1213.
- Heuser, V.D., da Silva, J., Moriske, H.J., Dias, J.F., Yoneama, M.L., de Freitas, T.R., 2002. Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*. *Environ Mol Mutagen* 40, 227-235.
- Ho, V.M., Lee, J.A., Martin, K.C., 2011. The cell biology of synaptic plasticity. *Science* 334, 623-628.
- Hoane, M.R., 2007. Assessment of cognitive function following magnesium therapy in the traumatically injured brain. *Magnes Res* 20, 229-236.
- Hock, F.J., Gerhards, H.J., Wiemer, G., Usinger, P., Geiger, R., 1988. Learning and memory processes of an ACTH4-9 analog (ebiratide; Hoe 427) in mice and rats. *Peptides* 9, 575-581.
- Holahan, M.R., Honegger, K.S., Tabatadze, N., Routtenberg, A., 2007. GAP-43 gene expression regulates information storage. *Learn Mem* 14, 407-415.
- Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Wolf, S.G., Caspi, M., Elbaum, M., Chelly, J., Reiner, O., 1999. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* 8, 1599-1610.
- Hossain, M.M., Belkadi, A., Al-Haddad, S., Richardson, J.R., 2020. Deltamethrin Exposure Inhibits Adult Hippocampal Neurogenesis and Causes Deficits in Learning and Memory in Mice. *Toxicol Sci* 178, 347-357.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.

- 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.
- Hulo, S., Alberi, S., Laux, T., Muller, D., Caroni, P., 2002. A point mutant of GAP-43 induces enhanced short-term and long-term hippocampal plasticity. *Eur J Neurosci* 15, 1976-1982.
- 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.
- Jacobson, L., Sapolsky, R., 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12, 118-134.
- Jaggi, A.S., Bhatia, N., Kumar, N., Singh, N., Anand, P., Dhawan, R., 2011. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci* 32, 993-1005.
- 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.
- Jiang, C.L., Liu, L., Tasker, J.G., 2014. Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Front Neuroendocrinol* 35, 72-75.
- 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.
- Johnson, A.K., Cunningham, J.T., Thunhorst, R.L., 1996. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23, 183-191.
- Kalia, L.V., Kalia, S.K., Salter, M.W., 2008. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol* 7, 742-755.
- Keller-Wood, M.E., Dallman, M.F., 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5, 1-24.
- Khakpour-Taleghani, B., Lashgari, R., Aavani, T., Haghparast, A., Naderi, N., Motamedi, F., 2008. The locus coeruleus involves in consolidation and memory retrieval, but not in acquisition of inhibitory avoidance learning task. *Behav Brain Res* 189, 257-262.
- Khisroon, M., Gul, A., Khan, A., Ali, N., Zaidi, F., Rasheed, S.B., Ahmadullah, Akbar, H., 2015. Comet assay based DNA evaluation of fuel filling stations and automobile workshops workers from Khyber Pakhtunkhwa province, Pakistan. *J Occup Med Toxicol* 10, 27.
- Kim, Y., McGee, S., Czczor, J.K., Walker, A.J., Kale, R.P., Kouzani, A.Z., Walder, K., Berk, M., Tye, S.J., 2016. Nucleus accumbens deep-brain stimulation efficacy in ACTH-pretreated rats: alterations in mitochondrial function relate to antidepressant-like effects. *Transl Psychiatry* 6, e842.

- Kinzig, K.P., D'Alessio, D.A., Herman, J.P., Sakai, R.R., Vahl, T.P., Figueiredo, H.F., Murphy, E.K., Seeley, R.J., 2003. CNS glucagon-like peptide-1 receptors mediate endocrine and anxiety responses to interoceptive and psychogenic stressors. *J Neurosci* 23, 6163-6170.
- Kirkland, A.E., Sarlo, G.L., Holton, K.F., 2018. The Role of Magnesium in Neurological Disorders. *Nutrients* 10.
- Kitamura, Y., Akiyama, K., Kitagawa, K., Shibata, K., Kawasaki, H., Suemaru, K., Araki, H., Sendo, T., Gomita, Y., 2008. Chronic coadministration of carbamazepine together with imipramine produces antidepressant-like effects in an ACTH-induced animal model of treatment-resistant depression: involvement of 5-HT(2A) receptors? *Pharmacol Biochem Behav* 89, 235-240.
- 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.
- Kitamura, Y., Yagi, T., Kitagawa, K., Shinomiya, K., Kawasaki, H., Asanuma, M., Gomita, Y., 2010. Effects of bupropion on the forced swim test and release of dopamine in the nucleus accumbens in ACTH-treated rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 382, 151-158.
- Komorowski, R.W., Garcia, C.G., Wilson, A., Hattori, S., Howard, M.W., Eichenbaum, H., 2013. Ventral hippocampal neurons are shaped by experience to represent behaviorally relevant contexts. *J Neurosci* 33, 8079-8087.
- 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.
- Kotur-Stevuljevic, J., Bogavac-Stanojevic, N., Jelic-Ivanovic, Z., Stefanovic, A., Gojkovic, T., Joksic, J., Sopic, M., Gulan, B., Janac, J., Milosevic, S., 2015. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis* 241, 192-198.
- Kramer, J.H., Phillips, T.M., Weglicki, W.B., 1997. Magnesium-deficiency-enhanced post-ischemic myocardial injury is reduced by substance P receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 29, 97-110.
- Kuroda, Y., McEwen, B.S., 1998. Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 59, 35-39.
- 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.
- Lane, C.A., Hardy, J., Schott, J.M., 2018. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 25, 59-70.
- Latchney, S.E., Masiulis, I., Zaccaria, K.J., Lagace, D.C., Powell, C.M., McCasland, J.S., Eisch, A.J., 2014. Developmental and adult GAP-43 deficiency in mice dynamically alters hippocampal neurogenesis and mossy fiber volume. *Dev Neurosci* 36, 44-63.
- Leandro, G.S., Lobo, R.R., Oliveira, D.V., Moriguti, J.C., Sakamoto-Hojo, E.T., 2013. Lymphocytes of patients with Alzheimer's disease display different DNA damage repair kinetics and expression profiles of DNA repair and stress response genes. *Int J Mol Sci* 14, 12380-12400.

- Lemke, M.R., 1995. Plasma magnesium decrease and altered calcium/magnesium ratio in severe dementia of the Alzheimer type. *Biol Psychiatry* 37, 341-343.
- Lemon, N., Aydin-Abidin, S., Funke, K., Manahan-Vaughan, D., 2009. Locus coeruleus activation facilitates memory encoding and induces hippocampal LTD that depends on beta-adrenergic receptor activation. *Cereb Cortex* 19, 2827-2837.
- Leuner, B., Gould, E., Shors, T.J., 2006. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* 16, 216-224.
- 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.
- Li, Y., Ji, C.X., Mei, L.H., Qiang, J.W., Ju, S., 2017. Oral administration of trace element magnesium significantly improving the cognition and locomotion in hepatic encephalopathy rats. *Sci Rep* 7, 1817.
- 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.
- Lin, X., Kapoor, A., Gu, Y., Chow, M.J., Peng, J., Zhao, K., Tang, D., 2020. Contributions of DNA Damage to Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21.
- Lindqvist, D., Dhabhar, F.S., James, S.J., Hough, C.M., Jain, F.A., Bersani, F.S., Reus, V.I., Verhoeven, J.E., Epel, E.S., Mahan, L., Rosser, R., Wolkowitz, O.M., Mellon, S.H., 2017. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. *Psychoneuroendocrinology* 76, 197-205.
- Litvinov, D., Mahini, H., Garelnabi, M., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. *N Am J Med Sci* 4, 523-532.
- 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.
- Liu, M., Chen, F., Liu, T., Chen, F., Liu, S., Yang, J., 2017. The role of oxidative stress in influenza virus infection. *Microbes Infect* 19, 580-586.
- Liu, M., Dudley, S.C., Jr., 2020. Magnesium, Oxidative Stress, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Antioxidants (Basel)* 9.
- Liu, M., Liu, H., Feng, F., Xie, A., Kang, G.J., Zhao, Y., Hou, C.R., Zhou, X., Dudley, S.C., Jr., 2021. Magnesium Deficiency Causes a Reversible, Metabolic, Diastolic Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc* 10, e020205.
- Lopresti, A.L., Maker, G.L., Hood, S.D., Drummond, P.D., 2014. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 48, 102-111.

- Lovell, M.A., Markesbery, W.R., 2007. Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 85, 3036-3040.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- 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.
- Lupien, S.J., Maheu, F., Tu, M., Fiocco, A., Schramek, T.E., 2007. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain Cogn* 65, 209-237.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., 1997. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev* 24, 1-27.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., Heim, C., 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10, 434-445.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224, 164-175.
- Maes, M., Fišar, Z., Medina, M., Scapagnini, G., Nowak, G., Berk, M., 2012. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates--Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. *Inflammopharmacology* 20, 127-150.
- Maes, M., Galecki, P., Chang, Y.S., Berk, M., 2011. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 676-692.
- Mana, M.J., Grace, A.A., 1997. Chronic cold stress alters the basal and evoked electrophysiological activity of rat locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 81, 1055-1064.
- Mani, S., Shen, Y., Schaefer, J., Meiri, K.F., 2001. Failure to express GAP-43 during neurogenesis affects cell cycle regulation and differentiation of neural precursors and stimulates apoptosis of neurons. *Mol Cell Neurosci* 17, 54-66.
- Marrocco, I., Altieri, F., Peluso, I., 2017. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 6501046.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23, 649-711.
- McGaugh, J.L., 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287, 248-251.
- Mecocci, P., Mariani, E., Cornacchiola, V., Polidori, M.C., 2004. Antioxidants for the treatment of mild cognitive impairment. *Neurol Res* 26, 598-602.

- Medhat, E., Rashed, L., Abdelgwad, M., Aboulhoda, B.E., Khalifa, M.M., El-Din, S.S., 2020. Exercise enhances the effectiveness of vitamin D therapy in rats with Alzheimer's disease: emphasis on oxidative stress and inflammation. *Metab Brain Dis* 35, 111-120.
- Meijer, O.C., Koorneef, L.L., Kroon, J., 2018. Glucocorticoid receptor modulators. *Ann Endocrinol (Paris)* 79, 107-111.
- 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.
- Mesulam, M.M., 2000. A plasticity-based theory of the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 924, 42-52.
- Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R., 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247, 3170-3175.
- Møller, P., Wallin, H., Knudsen, L.E., 1996. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact* 102, 17-36.
- Morais, J.B., Severo, J.S., Santos, L.R., de Sousa Melo, S.R., de Oliveira Santos, R., de Oliveira, A.R., Cruz, K.J., do Nascimento Marreiro, D., 2017. Role of Magnesium in Oxidative Stress in Individuals with Obesity. *Biol Trace Elem Res* 176, 20-26.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-776.
- Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T., Cone, R.D., 1992. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257, 1248-1251.
- Mu, Y., Gage, F.H., 2011. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6, 85.
- Mumby, D.G., Tremblay, A., Lecluse, V., Lehmann, H., 2005. Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Hippocampus* 15, 1050-1056.
- Munshi, S., Loh, M.K., Ferrara, N., DeJoseph, M.R., Ritger, A., Padival, M., Record, M.J., Urban, J.H., Rosenkranz, J.A., 2020. Repeated stress induces a pro-inflammatory state, increases amygdala neuronal and microglial activation, and causes anxiety in adult male rats. *Brain Behav Immun* 84, 180-199.
- Necela, B.M., Cidlowski, J.A., 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc Am Thorac Soc* 1, 239-246.
- 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.

- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A., 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.
- 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.
- Padurariu, M., Ciobica, A., Hritcu, L., Stoica, B., Bild, W., Stefanescu, C., 2010. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 469, 6-10.
- Palta, P., Samuel, L.J., Miller, E.R., 3rd, Szanton, S.L., 2014. Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. *Psychosom Med* 76, 12-19.
- Pang, P.T., Lu, B., 2004. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev* 3, 407-430.
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383-400.
- Park, P., Volianskis, A., Sanderson, T.M., Bortolotto, Z.A., Jane, D.E., Zhuo, M., Kaang, B.K., Collingridge, G.L., 2013. NMDA receptor-dependent long-term potentiation comprises a family of temporally overlapping forms of synaptic plasticity that are induced by different patterns of stimulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130131.
- Park, S.H., Kim, Y.J., Park, J.C., Han, J.S., Choi, S.Y., 2017. Intranasal Oxytocin following Uncontrollable Stress Blocks Impairments in Hippocampal Plasticity and Recognition Memory in Stressed Rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 20, 861-866.
- 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.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E.J., Fahnstock, M., 2005. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93, 1412-1421.
- Pérez-Nievas, B.G., García-Bueno, B., Caso, J.R., Menchén, L., Leza, J.C., 2007. Corticosterone as a marker of susceptibility to oxidative/nitrosative cerebral damage after stress exposure in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32, 703-711.
- Perrin, M.H., Vale, W.W., 1999. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci* 885, 312-328.
- 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.

Peytremann, A., Nicholson, W.E., Brown, R.D., Liddle, G.W., Hardman, J.G., 1973. Comparative effects of angiotensin and ACTH on cyclic AMP and steroidogenesis in isolated bovine adrenal cells. *J Clin Invest* 52, 835-842.

Plotsky, P.M., Cunningham, E.T., Jr., Widmaier, E.P., 1989. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr Rev* 10, 437-458.

Plotsky, P.M., Sutton, S.W., Bruhn, T.O., Ferguson, A.V., 1988. Analysis of the role of angiotensin II in mediation of adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology* 122, 538-545.

Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., Chen, R., Perrin, M., Lewis, K., Sawchenko, P.E., Vale, W., 1994. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8777-8781.

Preston, A.R., Eichenbaum, H., 2013. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol* 23, R764-773.

Qiang, Q., Skudder-Hill, L., Toyota, T., Wei, W., Adachi, H., 2022. CSF GAP-43 as a biomarker of synaptic dysfunction is associated with tau pathology in Alzheimer's disease. *Sci Rep* 12, 17392.

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.

Raslau, F.D., Klein, A.P., Ulmer, J.L., Mathews, V., Mark, L.P., 2014. Memory part 1: overview. *AJNR Am J Neuroradiol* 35, 2058-2060.

Raslau, F.D., Mark, I.T., Klein, A.P., Ulmer, J.L., Mathews, V., Mark, L.P., 2015. Memory part 2: the role of the medial temporal lobe. *AJNR Am J Neuroradiol* 36, 846-849.

Rekart, J.L., Meiri, K., Routtenberg, A., 2005. Hippocampal-dependent memory is impaired in heterozygous GAP-43 knockout mice. *Hippocampus* 15, 1-7.

Richter, R.J., Furlong, C.E., 1999. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 9, 745-753.

Rivier, C., Vale, W., 1983. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305, 325-327.

Robertson, L.T., 2002. Memory and the brain. *J Dent Educ* 66, 30-42.

Rodrigues, S.M., Schafe, G.E., LeDoux, J.E., 2004. Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44, 75-91.

- Roland, B.L., Sawchenko, P.E., 1993. Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 332, 123-143.
- Roman, F., Han, D., Baudry, M., 1989. Effects of two ACTH analogs on successive odor discrimination learning in rats. *Peptides* 10, 303-307.
- Rosenbrock, H., Koros, E., Bloching, A., Podhorna, J., Borsini, F., 2005. Effect of chronic intermittent restraint stress on hippocampal expression of marker proteins for synaptic plasticity and progenitor cell proliferation in rats. *Brain Res* 1040, 55-63.
- Roustazade, R., Radahmadi, M., Yazdani, Y., 2022. Therapeutic effects of saffron extract on different memory types, anxiety, and hippocampal BDNF and TNF- α gene expressions in sub-chronically stressed rats. *Nutr Neurosci* 25, 192-206.
- Ruppersberg, J.P., Kitzing, E.v., Schoepfer, R., 1994. The mechanism of magnesium block of NMDA receptors. *Seminars in Neuroscience* 6, 87-96.
- Russell, G.M., Henley, D.E., Leendertz, J., Douthwaite, J.A., Wood, S.A., Stevens, A., Woltersdorf, W.W., Peeters, B.W., Ruigt, G.S., White, A., Veldhuis, J.D., Lightman, S.L., 2010. Rapid glucocorticoid receptor-mediated inhibition of hypothalamic-pituitary-adrenal ultradian activity in healthy males. *J Neurosci* 30, 6106-6115.
- Sadir, S., Tabassum, S., Emad, S., Liaquat, L., Batool, Z., Madiha, S., Shehzad, S., Sajid, I., Haider, S., 2019. Neurobehavioral and biochemical effects of magnesium chloride (MgCl₂), magnesium sulphate (MgSO₄) and magnesium-L-threonate (MgT) supplementation in rats: A dose dependent comparative study. *Pak J Pharm Sci* 32, 277-283.
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., Hen, R., 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466-470.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., et al., 1995. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373, 151-155.
- 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.
- Saphier, D., Feldman, S., 1987. Effects of septal and hippocampal stimuli on paraventricular nucleus neurons. *Neuroscience* 20, 749-755.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S., 1983. Corticosterone receptors decline in a site-specific manner in the aged rat brain. *Brain Res* 289, 235-240.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S., 1984. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6174-6177.
- Sapolsky, R.M., Zola-Morgan, S., Squire, L.R., 1991. Inhibition of glucocorticoid secretion by the hippocampal formation in the primate. *J Neurosci* 11, 3695-3704.

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.

Savage, S., Ma, D., 2014. III. Animal behaviour testing: memory. *Br J Anaesth* 113, 6-9.

Sawchenko, P.E., 1987. Evidence for a local site of action for glucocorticoids in inhibiting CRF and vasopressin expression in the paraventricular nucleus. *Brain Res* 403, 213-223.

Schyvens, C.G., Andrews, M.C., Tam, R., Mori, T.A., Croft, K.D., McKenzie, K.U., Whitworth, J.A., Zhang, Y., 2007. Antioxidant vitamins and adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in rats. *Clin Exp Hypertens* 29, 465-478.

Ścibior, A., 2016. Vanadium (V) and magnesium (Mg) - In vivo interactions: A review. *Chem Biol Interact* 258, 214-233.

Ścibior, A., Gołębiowska, D., Adamczyk, A., Kurus, J., Staniszevska, M., Sadok, I., 2018. Evaluation of lipid peroxidation and antioxidant defense mechanisms in the bone of rats in conditions of separate and combined administration of vanadium (V) and magnesium (Mg). *Chem Biol Interact* 284, 112-125.

Scibior, A., Gołębiowska, D., Niedźwiecka, I., 2013. Magnesium can protect against vanadium-induced lipid peroxidation in the hepatic tissue. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 802734.

Scibior, A., Zaporowska, H., 2010. Effects of combined vanadate and magnesium treatment on erythrocyte antioxidant defence system in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 30, 153-161.

Scoville, W.B., Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20, 11-21.

Sen, A.P., Gulati, A., 2010. Use of magnesium in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7, 91-99.

Seo, D.O., Zhang, E.T., Piantadosi, S.C., Marcus, D.J., Motard, L.E., Kan, B.K., Gomez, A.M., Nguyen, T.K., Xia, L., Bruchas, M.R., 2021. A locus coeruleus to dentate gyrus noradrenergic circuit modulates aversive contextual processing. *Neuron* 109, 2116-2130.e2116.

Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E., 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372-376.

Shors, T.J., Townsend, D.A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., Gould, E., 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12, 578-584.

Silachev, D.N., Shram, S.I., Shakova, F.M., Romanova, G.A., Myasoedov, N.F., 2009. Formation of spatial memory in rats with ischemic lesions to the prefrontal cortex; effects of a synthetic analog of ACTH(4-7). *Neurosci Behav Physiol* 39, 749-756.

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.

- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S., 2019. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24.
- Singh, H., Singh, J.R., Dhillon, V.S., Bali, D., Paul, H., 1994. In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs. II. Dexamethasone. *Mutat Res* 308, 89-97.
- Singh, N.P., 2005. Apoptosis assessment by the DNA diffusion assay. *Methods Mol Med* 111, 55-67.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- 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.
- Slutsky, I., Sadeghpour, S., Li, B., Liu, G., 2004. Enhancement of synaptic plasticity through chronically reduced Ca²⁺ flux during uncorrelated activity. *Neuron* 44, 835-849.
- 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.
- Smith, S.M., Vale, W.W., 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 8, 383-395.
- Sopić, M., Bogavac-Stanojević, N., Baralić, I., Kotur-Stevuljević, J., Đorđević, B., Stefanović, A., Jelić-Ivanović, Z., 2014. Effects of short- and long-term physical activity on DNA stability and oxidative stress status in young soccer players. *J Sports Med Phys Fitness* 54, 354-361.
- Spasov, A.A., Iezhitsa, I.N., Kravchenko, M.S., Kharitonova, M.V., 2009. Features of central neurotransmission in animals in conditions of dietary magnesium deficiency and after its correction. *Neurosci Behav Physiol* 39, 645-653.
- Spiers, J.G., Chen, H.J., Sernia, C., Lavidis, N.A., 2014. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Front Neurosci* 8, 456.
- Stanić, D., Plečaš-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.
- Stevens, A., White, A., 2010. ACTH: cellular peptide hormone synthesis and secretory pathways. *Results Probl Cell Differ* 50, 63-84.
- Strober, W., 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 111, A3.B.1-a3.B.3.

Takeuchi, T., Duzskiewicz, A.J., Morris, R.G., 2014. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130288.

Takeuchi, T., Duzskiewicz, A.J., Sonneborn, A., Spooner, P.A., Yamasaki, M., Watanabe, M., Smith, C.C., Fernández, G., Deisseroth, K., Greene, R.W., Morris, R.G., 2016. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* 537, 357-362.

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.

Tapp, Z.M., Godbout, J.P., Kokiko-Cochran, O.N., 2019. A Tilted Axis: Maladaptive Inflammation and HPA Axis Dysfunction Contribute to Consequences of TBI. *Front Neurol* 10, 345.

Teague, C.R., Dhabhar, F.S., Barton, R.H., Beckwith-Hall, B., Powell, J., Cobain, M., Singer, B., McEwen, B.S., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., 2007. Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in Sprague-Dawley rats. *J Proteome Res* 6, 2080-2093.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.

Timmermans, S., Souffriau, J., Libert, C., 2019. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Front Immunol* 10, 1545.

Tobin, M.K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W.G., Kim, N., Dawe, R.J., Bennett, D.A., Arfanakis, K., Lazarov, O., 2019. Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell* 24, 974-982.e973.

U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. 2015. 2015–2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition.

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J., 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394-1397.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.

Vankov, A., Hervé-Minvielle, A., Sara, S.J., 1995. Response to novelty and its rapid habituation in locus coeruleus neurons of the freely exploring rat. *Eur J Neurosci* 7, 1180-1187.

Vargas-Caballero, M., Robinson, H.P., 2004. Fast and slow voltage-dependent dynamics of magnesium block in the NMDA receptor: the asymmetric trapping block model. *J Neurosci* 24, 6171-6180.

- Veronese, N., Zurlo, A., Solmi, M., Luchini, C., Trevisan, C., Bano, G., Manzato, E., Sergi, G., Rylander, R., 2016. Magnesium Status in Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 31, 208-213.
- Vink, R., 2016. Magnesium in the CNS: recent advances and developments. *Magnes Res* 29, 95-101.
- Vukovic, J., Borlikova, G.G., Ruitenber, M.J., Robinson, G.J., Sullivan, R.K., Walker, T.L., Bartlett, P.F., 2013. Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *J Neurosci* 33, 6603-6613.
- Vyas, S., Rodrigues, A.J., Silva, J.M., Tronche, F., Almeida, O.F., Sousa, N., Sotiropoulos, I., 2016. Chronic Stress and Glucocorticoids: From Neuronal Plasticity to Neurodegeneration. *Neural Plast* 2016, 6391686.
- 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, B., Wang, Y., Wu, Q., Huang, H.P., Li, S., 2017. Effects of α 2A Adrenoceptors on Norepinephrine Secretion from the Locus Coeruleus during Chronic Stress-Induced Depression. *Front Neurosci* 11, 243.
- 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- α . *Pain Physician* 16, E563-575.
- Warburton, E.C., Barker, G.R., Brown, M.W., 2013. Investigations into the involvement of NMDA mechanisms in recognition memory. *Neuropharmacology* 74, 41-47.
- Weeden, C.S.S., Mercurio, J.C., Cameron, H.A., 2019. A role for hippocampal adult neurogenesis in shifting attention toward novel stimuli. *Behav Brain Res* 376, 112152.
- Weglicki, W.B., Phillips, T.M., Freedman, A.M., Cassidy, M.M., Dickens, B.F., 1992. Magnesium-deficiency elevates circulating levels of inflammatory cytokines and endothelin. *Mol Cell Biochem* 110, 169-173.
- Westphal, N.J., Seasholtz, A.F., 2006. CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. *Front Biosci* 11, 1878-1891.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 49, 1304-1313.
- 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.
- Wong, E.Y., Herbert, J., 2006. Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* 137, 83-92.
- Wong, Y.N., Chien, B.M., D'Mello A, P., 1994. Analysis of corticosterone in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 661, 211-218.

- 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.
- Xie, X., Shen, Q., Ma, L., Chen, Y., Zhao, B., Fu, Z., 2018. Chronic corticosterone-induced depression mediates premature aging in rats. *J Affect Disord* 229, 254-261.
- 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.
- Yegen, B. Ç., 2010. Oxytocin and hypothalamo-pituitaryadrenal axis. *Marmara Pharm. J* 14, 61-66.
- Zaccaria, K.J., Lagace, D.C., Eisch, A.J., McCasland, J.S., 2010. Resistance to change and vulnerability to stress: autistic-like features of GAP43-deficient mice. *Genes Brain Behav* 9, 985-996.
- Zafir, A., Banu, N., 2009. Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 12, 167-177.
- Zavvari, F., Nahavandi, A., Goudarzi, M., 2020. Fluoxetine attenuates stress-induced depressive-like behavior through modulation of hippocampal GAP43 and neurogenesis in male rats. *J Chem Neuroanat* 103, 101711.
- Zhang, Q., Qian, Z.Y., Zhou, P.H., Zhou, X.L., Zhang, D.L., He, N., Zhang, J., Liu, Y.H., Gu, Q., 2018. Effects of oral selenium and magnesium co-supplementation on lipid metabolism, antioxidative status, histopathological lesions, and related gene expression in rats fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis* 17, 165.
- 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.
- Zhang, Y., Jang, R., Mori, T.A., Croft, K.D., Schyvens, C.G., McKenzie, K.U., Whitworth, J.A., 2003. The anti-oxidant Tempol reverses and partially prevents adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. *J Hypertens* 21, 1513-1518.
- Zhang, Y., Li, P., Feng, J., Wu, M., 2016. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurol Sci* 37, 1039-1047.

- Zhao, Y., Ma, R., Shen, J., Su, H., Xing, D., Du, L., 2008. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur J Pharmacol* 581, 113-120.
- Zheltova, A.A., Kharitonova, M.V., Iezhitsa, I.N., Spasov, A.A., 2016. Magnesium deficiency and oxidative stress: an update. *Biomedicine (Taipei)* 6, 20.
- Zhou, J.J., Gao, Y., Zhang, X., Kosten, T.A., Li, D.P., 2018. Enhanced Hypothalamic NMDA Receptor Activity Contributes to Hyperactivity of HPA Axis in Chronic Stress in Male Rats. *Endocrinology* 159, 1537-1546.
- 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- α /NF- κ B Signaling in Rats. *Neurosci Bull* 37, 55-69.
- Zogović, D., Pešić, V., Dmitrašinović, G., Dajak, M., Plećaš, B., Batinić, B., Popović, D., Ignjatović, S., 2014. Pituitary-Gonadal, Pituitary-Adrenocortical Hormones and IL-6 Levels Following Long-Term Magnesium Supplementation in Male Students. *Journal of Medical Biochemistry* 33.

8. PRILOZI

Lista skraćenica

3D – trodimenzionalni

α2A-AR - alpha-2A adrenergički receptori

ACTH – adrenokortikotropni hormon

AD - Alchajmerova bolest

AMPA-R - α-amino-3-hidroksi-5-metilizoksazolpropionat receptor

ANOVA - analiza varijanse (statistički test)

AOPP - produkti oksidacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products*)

ATP - adenzin trifosfat

a.u. - arbitralne jedinice

AVP – arginin-vazopresin

BDNF - neurotrofični faktor poreklom iz mozga (eng. *brain-derived neurotrophic factor*)

BNST - eng. *bed nucleus of the stria terminalis*

BrdU – bromodeoksiuridin

BSA – goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumine*)

CA - Amonov rog, *cornu ammonis*

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

CRH – kortikotropin (eng. *corticotropin releasing hormone*)

CRH-BP - proteini koji vezuju kortikotropin (eng. *corticotropin-releasing hormone - binding protein*)

CRH-Rx – kortikotropni receptor

DAB – 3,3'-diaminbenzidin

DCX – *doublecortin*

DCX+PCNA+ - neuroblasti pozitivni na *doublecortin* i ćelijski proliferišući nuklearni antigen

DG - dentatni girus, *dentate gyrus*

dH₂O – destilovana voda

dHPC – dorzalni hipokampus

DI / D index - indeks diskriminacije (eng. *discrimination index*)

DN - eng. *Damaged nuclei*

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiaminotetrasirćetna kiselina

EEG - elektroencefalografija

EPM - uzdignut plus lavirint (eng. *elevated plus maze*)

f.o. – poznati ili familijarni objekat

FST - test forsiranog plivanja (eng. *forced swimming-induced stress*)

GABA - γ -aminobuterna kiselina

GAP43 - protein povezan sa rastom 43 (eng. *growth-associated protein 43*)

GC – glukokortikoidi

GLP-1 - glukagenu-sličan peptid 1 (eng. *glucogen-like peptide 1*)

GLU - glutamat

GLY – glicin

GR – glukokortikoidni receptori

GRE – promotorski deo DNK zadužen za glukokortikoidni odgovor (eng. *glucocorticoid response elements*)

H₂O₂ – vodonik peroksid

HClO₄ – perhlorna kiselina

HDCS - komet skor za visoko oštećene ćelije (eng. *highly damaged comet score*)

HNO₃ – nitratna kiselina

HPA - hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (eng. *hypothalamus-pituitary adrenal axis*)

HPC – hipokampus

HPLC – tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. *high pressure liquid chromatography*)

HRP – eng. *horseradish peroxidase*

IL-6 – interleukin 6

i.p. – intraperitonealno

iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina (RNK)

LC - *locus ceruleus*

LC-ESI-MS/MS – tečna hromatografija-elektrosprej jonizacija-tandem masena spektrometrija (eng. *liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry*)

LPH - lipotropin hormon

LMP - niska tačka topljenja (eng. *low melting point*)

LSD – test najmanje značajne razlike (eng. *least significant difference*)

LTD - dugoročna depresija (eng. *long-term depresssion*)

LTP - dugoročna potencijacija (eng. *long-term potentiation*)

MCI - blago kognitivno oštećenje

MCxR – melanokortinski receptori

MDA – malondialdehida

MDCS - komet skor za umereno oštećene ćelije (eng. *medium damaged comet score*)

Mg / MgT / MgCl₂ / MgSO₄ – magnezijum / magnezijum-L-treonat / magnezijum hlorid / magnezijum sulfat

mPFC - medijalni prefrontalni korteks

MR – mineralokortikoidni receptori

MSH - melanotropin

MTL - medijalno temporalni režanj

NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

NBT - nitro plavi tetrazolijum (eng. *nitroblue tetrazolium*)

NGF - faktor rasta neurona (eng. *neuron growth factor*)

NK-kB - nuklearni faktor kapa B (eng. *nuclear factor kappa-B*)

NMDA-R - N-metil-D-aspartat receptor

n.o. – novi objekat

NO· - azot monooksid radikal

NORT - test prepoznavanja novog objekta (eng. *novel object recognition test*)

O₂^{·-} - superoksid anjon

OH⁻ - hidroksilni anjon

OH· - hidroksilni radikal

ONOO· - peroksidnitril

p75^{NTR} – neutrofinijski receptor 75

PBS – fosfatni pufer (eng. *phosphate buffered saline*)

PC - prohormon konvertaze

PD – Parkinsonova bolest

per os - peroralno

PFC - prefrontalni korteks

POMC – proopiomelanokortin

PON1 - paraoksonaza 1

PVDF – polivinilidendifluorid

PVN - paraventrikularno jedro

RI / R index - indeks prepoznavanja (eng. *recognition index*)

RNK - ribonukleinska kiselina

RNS - reaktivne azotne vrste (eng. *reactive nitrogen species*)

ROS - reaktivne kisonične vrste (eng. *reactive oxygen species*)

s.c. – supkutano

SC-CA1 – eng. *schaffer collateral-CA1*

SDS-PAGE - natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (eng. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

S.E.M. - standardna greška

SOD - superoksid dizmutaza

SPE – kolona čvrste faze (eng. *solid phase extraction column*)

STP – kratkoročna potencijacija (eng. *short-term potentiation*)

TAS - totalni antioksidativni status

TBST – tris pufer sa tvinom (eng. *tris-buffered saline tween*)

TCS - totalni komet skor (eng. *total comet score*)

tf - vreme istraživanja poznatog objekta (eng. *familiar object exploration time*)

tn - vreme istraživanja novog objekta (eng. *novel object exploration time*)

TNF α – faktor nekroze tumora α (eng. *tumor necrosis factor α*)

TOS - totalni oksidativni status

TrkB – tropomiozin-kinazni receptor B (eng. *tropomyosin receptor kinase*)

UV – ultravijolno zračenje

vHPC – ventralni hipokampus

9. BIOGRAFIJA

Vedrana Đurić je rođena 14.04.1989. godine u Bihaću, BiH. U Beogradu je završila osnovnu školu "Ujedinjene nacije", kao nosilac diplome "Vuk Stefanović Karadžić" i XIII beogradsku gimnaziju. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2008/2009. godine, smer magistar farmacije, gde je diplomirala 2013. godine sa prosečnom ocenom 9.0. Završni rad "Uticaj grelina na strukturu timusa pacova različite starosti" odbranila je na Katedri za fiziologiju sa ocenom 10. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Državni ispit je položila u oktobru 2014. godine.

Doktorske akademske studije, modul farmakologija, upisala je 2013/2014. godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Do sada je objavila dva rada u međunarodnim časopisima i ima tri saopštenja sa međunarodnih skupova.

Na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu radila je kao stručni saradnik na Katedri za Fiziologiju u školskoj 2013/2014. godini, gde je učestvovala u izvođenju praktične nastave iz predmeta Fiziologija 1 i Fiziologija 2 i izbornog predmeta Odabrana poglavlja fiziologije. Nakon toga radila je kao stručni saradnik u kompaniji Medis Pharma, da bi karijeru nastavila kao stručni saradnik za praćenje kliničkih ispitivanja u kompanijama Novo Nordisk Pharma i PPD. Trenutno je zaposlena kao menadžer tima za klinička ispitivanje u kompaniji PPD.

10. IZJAVE

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ведрана Ђурић

Број индекса 19/13

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај хиперактивности осовине хипоталамус-хипофиза-надбубрежна жлезда и оксидативног стреса

на учење и памћење: модулаторна улога суплементације магнезијумом

- 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 кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Ведрана Ђурић

Број индекса 19/13

Студијски програм Докторске академске студије модул Фармакологија

Наслов рада Утицај хиперактивности осовине хипоталамус-хипофиза-надбубрежна жлезда и оксидативног стреса на учење и памћење: модулаторна улога суплементације магнезијумом

Ментор Проф. др Весна Пешић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај хиперактивности осовине хипоталамус-хипофиза-надбубрежна жлезда и оксидативног стреса на учење и памћење: модулаторна улога суплементације магнезијумом

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, _____

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.