

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena M. Petrović

**UTICAJ MAGNEZIJUMA NA PONAŠANJE,
NEUROENDOKRINE I PROMENE NA
MIOKARDU UZROKOVANE
HIPERAKTIVNOŠĆU OSOVINE
HIPOTALAMUS-HIPOFIZA-NADBUBREG KOD
PACOVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena M. Petrović

**UTICAJ MAGNEZIJUMA NA PONAŠANJE,
NEUROENDOKRINE I PROMENE NA
MIOKARDU UZROKOVANE
HIPERAKTIVNOŠĆU OSOVINE
HIPOTALAMUS-HIPOFIZA-NADBUBREG KOD
PACOVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Jelena M. Petrović

**EFFECTS OF MAGNESIUM ON BEHAVIOR,
NEUROENDOCRINE AND CHANGES IN
MYOCARDIUM INDUCED BY HYPERACTIVITY
OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-
ADRENAL AXIS IN RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

ČLANOVI KOMISIJE:

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

Dr Magnus Ingelman-Sundberg
gostujući redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Milica Labudović-Borović
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr Bojana Pejušković
docent, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Dr Marin Jukić
docent, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski 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, u okviru projekta u oblasti medicine broj 175036, pod nazivom „Biomarkeri oštećenja i disfunkcije organa“, finansiranog od Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Deo istraživanja je sproveden na Katedri za Fiziologiju i Farmakologiju, Karolinska Instituta i na Institutu za Histologiju i Embriologiju "Aleksandar Đ. Kostić", Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Veliku zahvalnost dugujem

Prof. dr Vesni Pešić, mom profesoru i mentoru, na ukazanom poverenju, sjajnim idejama, ogromnoj pomoći, razumevanju i podršci u svakom trenutku. Prof. Pešić je sa puno ljubavi i uz veliko zalaganje u svim fazama rukovodila izradom ove disertacije.

Prof. dr Magnusu Ingelman-Sundberg na ukazanom poverenju, velikom zalaganju, toploj dobrodošlici i divnom iskustvu, tokom mog boravka na Karolinska Institutu.

Prof. dr Milici Labudović-Borović na sjajnim idejama, velikom trudu, zalaganju i pomoći tokom izrade doktorske disertacije.

Doc. dr Bojani Pejušković na velikoj podršci, inspiraciji, pomoći i divnoj saradnji.

Doc. dr Marinu Jukiću na kritičkom pristupu u tumačenju rezultata, svim dobronamernim sugestijama i sjajnim idejama.

Prof. dr Volkeru Lauschke, mom supervizoru tokom boravka na Karolinska Institutu, na sjajnim idejama, neprocenjivoj pomoći, ogromnom trudu i zalaganju.

Profesorima dr Svetlani Ignjatović, dr Zorici Bulat, dr Jeleni Kotur-Stevuljević, dr Dušku Mirkoviću i dr Neli Puškaš na velikoj pomoći, angažovanju i divnoj saradnji.

Prof. dr Bosiljki Plećaš-Solarović i prof. dr Miodragu Nedeljkoviću na velikoj podršci, sjajnim idejama i toploj reči.

Mojim dragim prijateljima i kolegama sa Karolinska Instituta Joanne, Sabine, Vlasia, Asa, Tracey, Nuria i Yitian na velikoj podršci, svim sugestijama, i druženju, uz vas je sve bilo lepše.

Mojim divnim kolegama sa Katedre za Fiziologiju Bojanu, Dušanki, Ani, Nikoli, Gorani i Filipu na odličnoj saradnji, prijateljstvu, pomoći i velikoj podršci u svim fazama izrade ove disertacije.

Tokom eksperimentalnog rada veliku podršku, pomoć i prijateljski savet uvek su pružale Verica Spasojević i Jelena Stefanović.

Doktorsku disertaciju želim da posvetim mojim najmilijima: mami Marini, tati Goranu, baki Stojanki, ujaku Draganu, deki Tomislavu i mom Nebojši. Hvala vam na beskrajnoj ljubavi, podršci i požrtvovanosti.

Uticaj magnezijuma na ponašanje, neuroendokrine i promene na miokardu uzrokovane hiperaktivnošću osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg kod pacova

Sažetak

Depresija pogađa 322 miliona ljudi u svetu i jedan od neurobioloških mehanizama koji doprinosi manifestaciji je hiperaktivnost ose hipotalamus-hipofiza-nadbubreg (HPA). Rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja je dvostruko povišen kod depresivnih osoba. Poznato je da deficit magnezijuma (Mg) može indukovati hiperaktivnost HPA ose. Cilj istraživanja bio je da se u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive, indukovane ACTH tretmanom (10 µg/dan, 21 dan) ispituju bihevioralni efekti primene Mg (300 mg magnezijuma/L vode za piće, 28 dana) i uticaj na parametre HPA osovine i neurogeneze kod pacova. Drugi cilj bio je da se ispituju kardioprotektivni efekti Mg i uticaj na proliferaciju kardiomiocita. Treći cilj bio je da se odrede *in vitro* efekti ACTH u trodimenzionalnom modelu sferoida humanih kardiomiocita. Rezultati istraživanja su pokazali da je u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive Mg ostvario anksiolitički i antidepresivni efekat kod mužjaka Wistar pacova. Mg je suprimirao hiperaktivnost HPA ose, što se manifestovalo smanjenjem nivoa kortikosterona i IL-6 u plazmi. Pored toga, Mg je delovao inhibitory na proliferaciju fibroblasta i endotelnih ćelija, ali i deponovanje endomizijalnog kolagena u srcu, indukovanih ACTH tretmanom. Takođe, ACTH i Mg su delovali stimulatorno na proliferaciju kardiomiocita. U *in vitro* modelu, visoka koncentracija ACTH nije uticala na apoptozu, ali je indukovala porast ATP u kardiomiocitima. Rezultati ukazuju da antidepresivni efekat Mg nastupa zahvaljujući supresiji hiperaktivnosti HPA ose i stimulaciji neurogeneze. Magnezijum deluje i kardioprotektivno i inhibira razvoj fibroze miokarda, indukovane primenom ACTH. U modelu sferoida, visoka koncentracija ACTH izaziva hipertrofiju kardiomiocita.

Ključne reči: magnezijum, adrenokortikotropni hormon, depresivni poremećaj, HPA osovine, neurogeneza, model hiperaktivnosti HPA osovine/depresivnog ponašanja, depresija rezistentna na terapiju, fibroza miokarda, proliferacija kardiomiocita, model sferoida

Naučna oblast: Farmakologija

Uža naučna oblast: Neurofarmakologija i Farmakologija kardiovaskularnog sistema

Effects of magnesium on behavior, neuroendocrine and changes in myocardium induced by hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats

Abstract

Depression affects 322 million people worldwide and one of the underlying neurobiological mechanisms involves hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. People who suffer from depression show a two-fold increased risk of cardiovascular disease. Studies have shown that magnesium deficiency can provoke HPA axis hyperactivity. The aim of our research was to examine the effects of Mg treatment (300 mg/L, 28 days) on behavioral changes and parameters of HPA axis and neurogenesis in rats, in a model of depressive-like behavior induced by chronic administration of adrenocorticotrophic hormone (10 µg/day, 21 days) and resistant to tricyclic antidepressants. Our second aim was to explore cardioprotective effects of Mg, as well as changes in cardiomyocyte proliferation. The third aim was to investigate *in vitro* effects of ACTH exposure on human cardiomyocytes in a 3D model of spheroids. Results have shown that Mg exerts anxiolytic and antidepressant effects in male Wistar rats, in a model of depressive-like behavior resistant to tricyclic antidepressants. Furthermore, Mg suppressed proliferation of fibroblasts and endothelial cells and endomysial collagen deposition evoked by ACTH treatment. ACTH and Mg treatment promoted cardiomyocyte proliferation. In our *in vitro* model, exposure to high ACTH concentration did not alter level of cardiomyocyte apoptosis, however, an increase in ATP was observed. Mg exerts anxiolytic- and antidepressant-like effects and possible underpinning mechanisms involve attenuated HPA axis hyperactivity and increase in neurogenesis. Moreover, Mg attenuates ACTH-evoked cardiac fibrosis in rats, whereas *in vitro* exposure to high concentrations of ACTH induces changes that potentially reflect cardiomyocyte hypertrophy.

Keywords: magnesium, adrenocorticotrophic hormone, depressive disorder, HPA axis, neurogenesis, model of HPA axis hyperactivity/depressive behavior, treatment resistant depression, cardiac fibrosis, cardiomyocyte proliferation, spheroid model

Scientific field: Pharmacology

Specific scientific field: Neuropharmacology and Cardiovascular pharmacology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Magnezijum	1
1.1.1. Magnezijum- homeostaza i fiziološke uloge	1
1.1.2. Magnezijum i ishrana.....	4
1.1.3. Određivanje nivoa magnezijuma, hipomagnezemija i hipermagnezemija	5
1.1.4. Modulatorena uloga magnezijuma u regulaciji aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza- nadbubrežna žlezda	6
1.1.5. Uloga magnezijuma u etiopatogenezi depresivnog poremećaja	7
1.2. Depresivni poremećaj i hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina	7
1.2.1. Stres i hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina.....	7
1.2.2. Hiperaktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine u etiopatogenezi depresivnog poremećaja	9
1.2.3. Epidemiologija, klinička slika i terapija depresivnog poremećaja	9
1.2.4. Depresivni poremećaj i hiperaktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine: neuroendokrine i neuroimune interakcije	13
1.2.5. Depresivni poremećaj, hiperaktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine i proces neurogeneze	15
1.2.6. Poremećaj homeostaze bioelemenata u etiopatogenezi depresije.....	17
1.2.7. Eksperimentalni modeli hiperaktivnosti hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine i depresivnog ponašanja	18
1.3. Depresivni poremećaj i kardiovaskularna oboljenja.....	18
1.3.1. Neurobiološki mehanizmi u etiopatogenezi depresivnog poremećaja i kardiovaskularnih oboljenja.....	18
1.3.2. Trodimenzionalni <i>in vitro</i> modeli ćelijskih kultura kardiomiocita	20
2. CILJEVI RADA.....	22
3. MATERIJAL I METODE	24
3.1. Eksperimentalne životinje.....	24
3.2. Eksperimentalni protokol.....	24

3.3. Hemijske supstance korišćene u tretmanima	27
3.4. Protokoli bihevioralnih eksperimenata	28
3.4.1. Test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT)	28
3.4.2. Test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST)	29
3.5. Određivanje koncentracije kateholamina i serotonina metodom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (Reversed phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)	29
3.5.1. Određivanje koncentracije kateholamina u plazmi eksperimentalnih životinja metodom HPLC	30
3.5.2. Određivanje koncentracije serotonina u serumu eksperimentalnih životinja metodom HPLC	30
3.6. Određivanje kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja metodom tečne hromatografije-elektrosprej jonizacije-tandem masene spektrometrije	31
3.7. Određivanje koncentracije ACTH u plazmi eksperimentalnih životinja ELISA metodom....	31
3.8. Određivanje koncentracije IL-6 u plazmi eksperimentalnih životinja primenom ELISA metode.....	32
3.9. Imunohistohemijska analiza parametara neurogeneze u hipokampusu	33
3.10. Određivanje biometala u prefrontalnom korteksu eksperimentalnih životinja metodom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije	34
3.11. Imunohistohemijska analiza ekspresije parametara proliferacije i anti-apoptotskog markera Bcl-2 u miokardu	35
3.12. Određivanje dijametra kardiomiocita i praćenje intersticijalne fibroze miokarda kod eksperimentalnih životinja	36
3.13. Određivanje vijabilnosti kardiomiocita u ćelijskim kulturama.....	37
3.14. Određivanje kaspaze 3 u sferoidima humanih kardiomiocita	37
3.15. Imunohistohemijska analiza sferoida kardiomiocita.....	37
3.16. Izolacija RNK humanih kardiomiocita ćelijskih kultura i lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (Real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)	38
3.16.1. Ekstrakcija RNK humanih kardiomiocita 2D i 3D ćelijskih kultura	38
3.16.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)	39
3.16.3. Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (RT-PCR).....	39
3.17. Statistička obrada rezultata	39

4. REZULTATI.....	41
4.1. Prva eksperimentalna faza	41
4.1.1. Efekti primene ACTH i Mg na telesnu i masu nadbubrežne žlezde eksperimentalnih životinja.....	41
4.1.2. Uticaj hronične primene magnezijuma na promene u ponašanju životinja u modelu depresije rezistentne na primenu tricikličnih antidepresiva	42
4.1.3. Efekti hronične primene magnezijuma i akutnog stresa na nivo biogenih amina u plazmi životinja u modelu depresije rezistentne na primenu tricikličnih antidepresiva.....	44
4.1.4. Efekti ponavljane primene magnezijuma i izlaganja eksperimentalnih životinja forsiranom plivanju na parametre aktivnosti HPA ose u modelu depresije rezistentne na primenu tricikličnih antidepresiva	47
4.1.5. Uticaj hronične primene magnezijuma na parametre hipokampalne neurogeneze u modelu depresije rezistentne na primenu tricikličnih antidepresiva	50
4.2. Druga eksperimentalna faza.....	52
4.2.1. Efekti dugotrajne primene magnezijuma na homeostazu bioeleminata u prefrontalnom korteksu životinja u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive.....	52
4.2.2. Korelacije između bihevioralnih parametara i koncentracija hormona u plazmi mužjaka pacova	55
4.2.3. Efekti hronične primene magnezijuma i dugotrajnog izlaganja tretmanu sa adrenokortikotropnim hormonom na parametre fibroze u srcu mužjaka pacova	57
4.2.4. Uticaj hronične primene magnezijuma na proliferaciju i dijametar kardiomiocita u modelu depresije indukovane tretmanom adrenokortikotropnim hormonom mužjaka pacova.....	60
4.3. Treća eksperimentalna faza.....	62
4.3.1. Uticaj različitih uslova za <i>in vitro</i> kultivaciju na vijabilnost i fenotip kardiomiocita formiranih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija	62
4.3.2. Ispitivanje potencijalnih efekata ACTH na vijabilnost i gensku ekspresiju kardiomiocita formiranih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija u <i>in vitro</i> modelu sferoida.....	67
5. DISKUSIJA	70
5.1. Uticaj hroničnog tretmana magnezijumom na ponašanje mužjaka pacova u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive	70
5.2. Hronična primena magnezijuma stimuliše neurogenezu u hipokampusu u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive	76
5.3. Uticaj hronične primene magnezijuma na nivo biogenih amina u plazmi u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive	83

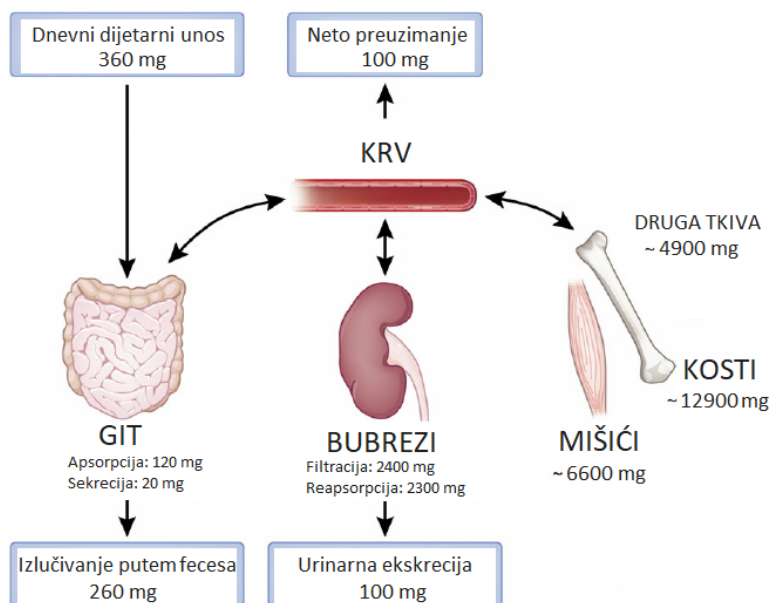
5.4. Efekti hronične primene magnezijuma na parametre aktivnosti HPA osovine u plazmi eksperimentalnih životinja u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive	86
5.5. Efekti hroničnog tretmana magnezijumom na telesnu masu, apsolutnu i relativnu masu adrenalnih žlezda u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive	91
5.6. Ispitivanje uticaja hroničnog tretmana magnezijumom na nivo bioelemenata u prefrontalnom korteksu mužjaka pacova u modelu depresivnog ponašanja	94
5.7. Hronična suplementacija magnezijumom suprimira razvoj intersticijalne fibroze miokarda indukovane adrenokortikotropnim hormonom u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive	96
5.8. Hronična primena magnezijuma inhibira vaskularno remodelovanje u malim krvnim sudovima srca indukovano adrenokortikotropnim hormonom kod mužjaka pacova	100
5.9. Efekti hronične primene magnezijuma i adrenokortikotropnog hormona na proliferativnu aktivnost i dijametar kardiomiocita u modelu depresivnog ponašanja	103
5.10. Razvoj i implementacija 3D modela sferoida srčanih mišićnih ćelija i ispitivanje <i>in vitro</i> efekata ACTH na humane kardiomiocite.....	107
6. ZAKLJUČAK	110
7. LITERATURA.....	112
8. PRILOZI	143
Lista skraćenica i oznaka	143
9. BIOGRAFIJA	149
10. IZJAVE	150
Изјава о ауторству.....	150
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	151
Изјава о коришћењу.....	152

1. UVOD

1.1. Magnezijum

1.1.1. Magnezijum- homeostaza i fiziološke uloge

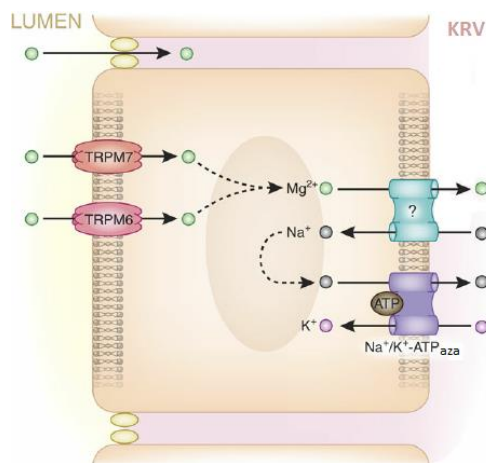
Magnezijum (Mg) je esencijalni element, drugi po zastupljenosti intracelularni katjon u humanom organizmu. Pripada grupi zemno-alkalnih metala i neophodan je za očuvanje zdravlja, pre svega nervnog, koštano-mišićnog i kardiovaskularnog sistema (Fawcett i sar., 1999; de Baaij i sar., 2015). U sastav humanog organizma ulazi prosečno 24 g magnezijuma i najvećim delom lokalizovan je intracelularno, dok se svega 1% nalazi ekstracelularno (Reddy i sar., 2018). Magnezijum je pretežno zastupljen u kostima (53%), zatim mišićima (27%) i mekim tkivima (19%). U serumu se nalazi približno 0,3% od ukupne količine magnezijuma u organizmu i postoje tri oblika: jonizovani (60%), vezan za proteine plazme (30%), pretežno albumin, i u obliku kompleksa koje gradi sa anjonima poput citrata i fosfata (10%). Koncentracija magnezijuma u serumu zdravih osoba iznosi 0,75-0,95 mmol/L i održava se zahvaljujući ravnoteži između intestinalne apsorpcije, ekskrecije putem bubrega, kao i mobilizacije po potrebi, iz najvećeg depoa u organizmu- kostiju (Reddy i sar., 2018).



Slika 1. Homeostaza magnezijuma u organizmu: dnevni dijetarni unos, intestinalna apsorpcija, tkivna distribucija i eliminacija (preuzeto iz reference de Baaij i sar., 2012).

Apsorpcija magnezijuma se odvija u distalnom jejunumu, ileumu i kolonu, varira i iznosi približno 30–50% od unete količine. Međutim, u uslovima smanjenog unosa može da se poveća i dostigne 80% (de Baaij i sar., 2012). Naime, kod sisara, u gastrointestinalnom traktu postoje dva puta apsorpcije: paracelularni (na ovaj način se transportuje 80-90% magnezijuma) i transcelularni put. Paracelularni transport se odvija pasivnim mehanizmom i podrazumeva prolazak magnezijuma između susednih epitelnih ćelija (de Baaij i sar., 2012). Transcelularni transport se odvija zahvaljujući kanalima za magnezijum - TRPM6 i TRPM7 (eng. transient receptor potential channel melastatin member 6 and 7), koji su prisutni na luminalnoj membrani enterocita. Protein TRPM7 pokazuje ubikvitarnu ekspresiju, dok je TRPM6 otkriven u distalnim delovima tankog creva i u kolonu. Do danas, nisu identifikovani proteini odgovorni za aktivni transport magnezijuma preko

bazolateralne membrane enterocita, međutim, pretpostavlja se da zavisi od gradijenta koncentracije za jon natrijuma, kao i aktivnosti Na^+/K^+ -ATPaze na toj membrani. Pokazano je da apsorpciju magnezijuma u gastrointestinalnom traktu reguliše vitamin D_3 hormon delujući stimulatorno. Shodno tome, pacijenti koji pate od hronične bubrežne insuficijencije često imaju snižene koncentracije vitamin D_3 hormona i prateću hipomagnezemiju (de Baaij i sar., 2012).



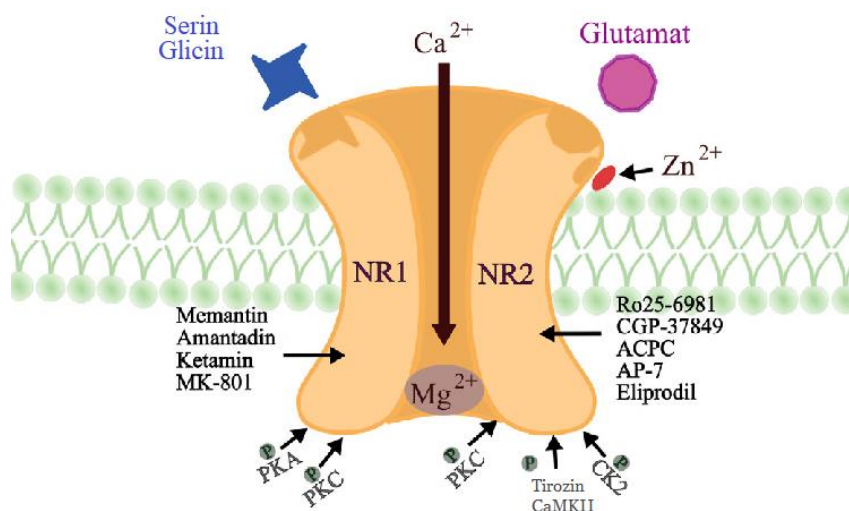
Slika 2. Shematski prikaz intestinalne apsorpcije magnezijuma, uključujući transcelularni i paracelularni transport. Paracelularni mehanizam podrazumeva prolazak magnezijuma između susednih enterocita, najverovatnije posredstvom kladina. U transcelularni transport su uključeni proteini TRPM6 i TRPM7 (eng. *transient receptor potential channel melastatin member 6 and 7*), detektovani na apikalnoj membrani enterocita. Nisu identifikovani proteini koji učestvuju u transportu magnezijuma na bazolateralnoj strani, međutim, smatra se da ovo kretanje zavisi od rada natrijum-kalijumove pumpe (preuzeto iz reference de Baaij i sar., 2012).

Pored intestinalne apsorpcije, faktor koji značajno utiče na koncentraciju magnezijuma u serumu je metabolizam u kostima. Naime, magnezijum se vezuje za površinu kristala hidroksiapatita u kostima, povećava rastvorljivost fosfata i kalcijuma u njima i na taj način utiče na formiranje i veličinu kristala, samim tim i na gustinu i snagu kostiju. U stanju deficijencije, približno 30% magnezijuma deponovanog u kostima može da se mobilise i pređe iz kostiju u krv (de Baaij i sar., 2015; Reddy i sar., 2018). Pored toga, magnezijum je jedan od faktora koji indukuju proliferaciju osteoblasta i inhibiraju oslobađanje proinflammatoryh molekula, poput interleukina (IL)-1 β , faktora nekroze tumora α (eng. tumor necrosis factor, TNF- α) i supstance P, koji stimulišu aktivaciju osteoklasta. Samim tim, hipomagnezemija se dovodi u vezu sa povišenim rizikom od razvoja osteoporoze (de Baaij i sar., 2015). Treći faktor koji učestvuje u održavanju homeostaze magnezijuma je bubrežna ekskrecija. U bubrežnim glomerulima dnevno se filtrira približno 2400 mg magnezijuma i potom se 90–95% reapsorbuje duž nefrona, tako da se urinom izluči oko 100 mg ovog jona. Reapsorpcija u bubrezima se najvećim delom odvija u debelom uzlaznom kraku Henleove petlje (70%), dok se u proksimalnom tubulu reapsorbuje svega 10–25% i u distalnom tubulu oko 10% filtriranog magnezijuma. U ascendentnom delu Henleove petlje magnezijum se reapsorbuje paracelularnim putem, pasivnim mehanizmom, zahvaljujući prisustvu proteina kladina 16 i 19 koji formiraju tesne veze selektivno propustljive za određene katjone. Na kraju, u distalnom izvijanom tubulu reapsorpcija se odvija transcelularnim putem i ključnu ulogu u ovom procesu ostvaruju TRPM6 kanali za magnezijum lokalizovani na apikalnoj membrani. Epidermalni faktor rasta (eng. epidermal growth factor, EGF), insulin i estrogene povećavaju membransku ekspresiju, kao i aktivnost TRPM6 kanala u distalnom tubulu i na taj način stimulišu reapsorpciju magnezijuma. Pored toga, kao faktori koji učestvuju u regulaciji renalne ekskrecije ovog

bioelementa navode se ekstracelularna pH, ATP, oksidativni stres i sam jon magnezijuma (de Baaij i sar., 2015).

U humanom organizmu magnezijum je bioelement neophodan za odvijanje velikog broja ćelijskih, biohemijskih procesa i kao kofaktor od esencijalnog je značaja za aktivnost preko 600 enzima. U navedene enzime ubrajaju se Na^+/K^+ -ATPaza, adenilat ciklaza, aldolaza, fosfoglicerat kinaza, piruvat kinaza, heksokinaza, kreatin kinaza, fosfofruktokinaza, DNK i RNK polimeraze i mnogi drugi (Gröber i sar., 2015). Magnezijum je značajan faktor u kontroli ćelijske proliferacije. Naime, ovaj bioelement učestvuje u procesima DNK replikacije i reparacije, RNK transkripcije, sinteze aminokiselina i proteina, kao i u aerobnoj i anaerobnoj produkciji energije. Magnezijum je esencijalna komponenta i učestvuje u stabilizaciji tercijarnih struktura DNK i RNK vezivanjem negativno naelektrisanih molekula azota i kiseonika unutar polinukleotidnih lanaca. Pored toga, vezuje se za manji žleb DNK molekula i na taj način ispoljava protektivni efekat, čineći DNK lanac manje dostupnim slobodnim radikalima kiseonika (de Baaij i sar., 2015). Magnezijum ispoljava jednu od ključnih uloga u kontroli transmembranskog transporta jona - kalcijuma, natrijuma i kalijuma, i od fiziološkog je značaja za prenos akcionog potencijala, oslobađanje neurotransmitera, mišićnu kontrakciju/relaksaciju, vazomotorni tonus i srčani ritam (Fawcett i sar., 1999; de Baaij i sar., 2015; Gröber i sar., 2015). Smatra se da u mnogim procesima magnezijum ima svojstva prirodnog antagoniste kalcijuma. U kardiovaskularnom sistemu modulacijom kalijumovih i inhibicijom kalcijumovih voltažno-zavisnih kanala, T-tipa (eng. transient-type, T-type) i L-tipa (eng. long-lasting type, L-type), magnezijum ispoljava protektivna, antiaritmijaska svojstva i utiče na ekscitabilnost kardiomiocita (Williams i sar., 1997; Mubagwa i sar., 2007). Takođe, jedan je od faktora koji deluju inhibitory na aktivaciju i agregaciju trombocita, dok, sa druge strane, pospešuje stvaranje azot monoksida (NO) i njime posredovanu vazodilataciju (Severino i sar., 2019). U centralnom nervnom sistemu (CNS) magnezijum umanjuje ekscitaciju neurona s obzirom da ispoljava ulogu negativnog alosternog modulatora glutamatnih N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora. Naime, NMDA receptori su jonotropni receptori, selektivno propustljivi za jone kalcijuma i natrijuma, i ekstracelularni magnezijum blokira njihov kanal kada se ćelija nalazi u stanju mirovanja (potencijal membrane u mirovanju) (de Baaij i sar., 2015; Severino i sar., 2019). Pomenuti efekat magnezijuma, odnosno blokada kanala NMDA receptora, prestaje pri depolarizaciji ćelije. Transmisija posredstvom NMDA receptora odgovorna je za plastičnost sinapsi, i stoga ima ulogu u učenju i pamćenju (Serita i sar., 2019).

Poslednjih decenija NMDA receptori su dospeli u fokus istraživanja, nakon otkrića da njihov nekompetitivni antagonist ketamin ispoljava antidepresivni efekat svega nekoliko sati nakon primene kod pacijenata kod kojih je prethodno ustanovljena depresija rezistentna na terapiju (eng. treatment resistant depression, TRD) (Berman i sar., 2000). Usledile su brojne prekliničke i kliničke studije koje su potvrdile efikasnost, kao i opravdanost primene ketamina kod osoba koje boluju od TRD i/ili pokazuju suicidalne misli i ideje (Zarate i sar., 2006; Diazgranados i sar., 2010; Zarate i sar., 2012; Murrough i sar., 2013; Chen i sar., 2019). Prihvaćena je hipoteza, po kojoj molekularni supstrat za antidepresivni efekat predstavlja blokada NMDA receptora prisutnih na GABAergičkim neuronima u prefrontalnom korteksu (eng. prefrontal cortex, PFC). Kao posledica ove blokade inhibitornih neurona, prestaje inhibicija piramidnih neurona, povećava se oslobađanje glutamata, kao i signalizacija posredstvom njegovih AMPA receptora (receptor α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline), što dovodi do porasta dugotrajne potencijacije (eng. long-term potentiation, LTP) i omogućava sinaptičku plastičnost (Abdallah i sar., 2016).



Slika 3. Shematski prikaz N-metil-D-aspartat (NMDA) glutamatergičkih receptora. U sastav NMDA receptorskog kompleksa ulaze tri različite subjedinice: NR1-3. Funkcionalni NMDA receptori su heterotetrameri i sadrže vezujuće mesto za glutamat, za ko-agonistu: serin ili glicin, kao i odvojeno cink (Zn^{2+}) vezujuće mesto na proteinskom kompleksu. Pri mirovnom potencijalu membrane, magnezijum (Mg^{2+}), kao negativni alosterni modulator, blokira poru kanala NMDA receptora. Prilikom depolarizacije i aktivacije NMDA receptora, blokada posredovana ekstracelularnim jonima magnezijuma prestaje i kalcijum (Ca^{2+}) ulazi u ćeliju. Farmakološki aktivne supstance (memantin, amantadin, eliprodil, dizocilpin ili MK-801) uključujući i molekule sa antidepresivnim svojstvima, poput ketamina, ostvaruju efekte posredstvom NMDA receptora (*preuzeto iz reference: Réus i sar., 2016*).

1.1.2. Magnezijum i ishrana

Poslednjih decenija raste broj studija koje upućuju na smanjen unos magnezijuma u odnosu na preporučeni, kod značajnog procenta populacije Evrope i Sjedinjenih Američkih Država. Faktori koji tome doprinose su kisele kiše koje dovode do promena u sastavu zemljišta i smanjene zastupljenosti magnezijuma u lancu ishrane, kao i savremeni procesi koji se primenjuju prilikom obrade namirnica, naročito žitarica, i uzrokuju značajan gubitak magnezijuma (80–90%) (Fawcett i sar., 1999; de Baaij i sar., 2015; Gröber i sar., 2015). Sa druge strane, namirnice koje odlikuje visok sadržaj magnezijuma su: zeleno lisnato povrće (brokoli, kelj, spanać), celo zrno žitarica, crna čokolada, seme bundeve, soja, kikiriki, badem, indijski orah i avokado. Takođe, mineralna voda bogata magnezijumom predstavlja jedan od glavnih izvora ovog bioelementa (Gröber i sar., 2015).

Na zahtev Evropske komisije, na panel diskusiji o dijetetskim proizvodima, ishrani i alergijama, održanoj 2015. godine, uspostavljene su referentne vrednosti za preporučeni dnevni unos magnezijuma (Tabela I) (EFSA, 2015).

Tabela I. Referentne vrednosti za adekvatan dnevni unos magnezijuma.

Godine	Preporučeni dnevni unos magnezijuma (mg/dan)	
	Muškarci	Žene
7-11 meseci	80	80
1-3 godine	170	170
3-10 godina	230	230
10-18 godina	300	250
≥ 18 godina	350	300

Preuzeto iz: *EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015.*

1.1.3. Određivanje nivoa magnezijuma, hipomagnezemija i hipermagnezemija

Određivanje koncentracije magnezijuma u serumu predstavlja najdostupniju metodu koja se danas rutinski primenjuje u cilju procene statusa Mg u organizmu. Analiza nivoa magnezijuma u serumu podrazumeva primenu jedne od metoda: fotometrije, fluorimetrije, plamene emisije spektroskopije i atomske apsorpcione spektrometrije kao referentne metode (Reddy i sar., 2018). Korišćenje uzoraka seruma ima prednost u odnosu na plazmu, jer *in vitro* antikoagulansi koji se koriste u kliničkoj praksi potencijalno interferiraju sa rezultatima analize. Primera radi, citrati vezuju jone Ca, ali istovremeno i Mg, i sa njima grade komplekse, što utiče na ishod fluorimetrijskih i kolorimetrijskih procedura. Pored toga, interferencije pokazuju i hemoliza, bilirubin, lipemija, kao i visok nivo fosfata u krvi. Međutim, nivo magnezijuma u serumu/plazmi ne reflektuje uvek deficit Mg u organizmu. Kliničke studije su pokazale da je kod određenih subpopulacija pacijenata, uključujući osobe koje pate od dijabetesa, hroničnog alkoholizma ili sindroma malapsorpcije intracelularna koncentracija Mg značajno smanjena, dok je nivo Mg u serumu u okviru fiziološkog opsega (Rude, 1993; Nadler i Rude, 1995). Shodno tome, smatra se da koncentracija ovog bioelementa u serumu/plazmi nije adekvatan pokazatelj statusa Mg u organizmu i u velikom broju slučajeva deficijencija ostaje nedijagnostikovana. Ispitivanja su sprovedena u cilju utvrđivanja potencijalne koristi od određivanja nivoa Mg u drugim biološkim uzorcima. Primenom nuklearne magnetne rezonance i fluorescentne metode izvršena je analiza koncentracije slobodnog magnezijuma u eritrocitima, limfocitima i trombocitima (Rude, 1993; Nadler i Rude, 1995). S obzirom da je u mišićima prisutno blizu 30% ukupnog Mg, nekoliko studija je obuhvatilo praćenje nivoa intracelularnog Mg u skeletnim mišićnim ćelijama. Pokazano je da je kod kardiovaskularnih pacijenata podvrgnutih operaciji na srcu nivo Mg u skeletnim mišićima bolji prediktor koncentracije Mg u miokardu, u odnosu na nivo Mg u limfocitima ili serumu (Moller i sar., 1991). Međutim, opisane procedure su invazivne i/ili skupe, zahtevaju odgovarajuću ekspertizu, i prema dostupnim literaturnim podacima njihova primena i određivanje intracelularne koncentracije Mg nisu opravdani u cilju rutinske procene statusa Mg u organizmu.

Hipomagnezemija predstavlja stanje koje karakteriše serumska koncentracija magnezijuma manja od 0,75 mmol/L. Etiološki faktori i/ili stanja koja dovode do razvoja hipomagnezemije obuhvataju:

- smanjen unos (nutritivni disbalans, totalna parenteralna ishrana, alkoholizam);
- gastrointestinalnu malapsorpciju (ulcerozni kolitis, Kronova bolest);
- povećan gubitak putem gastrointestinalnog trakta (povraćanje, dijareja, primena laksativa) ili bubrega (kongenitalni i stečeni defekti tubula, glomerulonefritis, pijelonefritis, bubrežna insuficijencija, dijabetes);
- srčanu insuficijenciju, insulinsku rezistenciju, pankreatitis, akutna i hronična oboljenja jetre, metaboličku acidozu, maligna oboljenja;
- neželjene efekte koji se javljaju tokom primene određenih lekova, uključujući: inhibitore protonске pumpe, aminoglikozide, diuretike, agoniste beta receptora, digoksin, ciklosporin, cisplatin, foskarnet, takrolimus, kao i
- stanja koja prate povećane potrebe organizma (tokom perioda rasta, trudnoće) (DiNicolantonio i sar., 2018; Reddy i sar., 2018).

U jednoj studiji je primećeno da je na odeljenju intenzivne nege kod 65% pacijenata prisutna hipomagnezemija (Ryzen, 1989). Vormann (2003) ističe da incidenca pojave hipomagnezemije u opštoj populaciji varira između 5% i 8%, dok kod mladih žena, starosti 18-22 god. incidenca dostiže

20%. Povrh toga, neophodno je razmotriti rezultate jednog opsežnog istraživanja, koje je obuhvatilo više od 16 000 ispitanika u Nemačkoj, i ukazuje da prevalenca hipomagnezemije u opštoj populaciji iznosi 14,5% (Schimatschek i Rempis, 2001). Patofiziološke posledice hipomagnezemije uključuju: hipokalcemiju, koja se manifestuje porastom neuromišićne nadražljivosti; smanjenu aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze, praćenu hipokalemijom i energetski deficit u ćelijama. Klinički simptomi i znaci hipomagnezemije variraju u zavisnosti od stepena deficijencije. Rani, nespecifični pokazatelji su ataksija, fotosenzitivnost, gubitak apetita, hiperrefleksija, iritabilnost, letargija, bol ili hiperalgezija, tinitus, vertigo, umor i slabost mišića. Ako je prisutna veoma izražena deficijencija ovog bioelementa u organizmu, mogu se javiti anksioznost, glavobolja, agitacija, tremor, mišićni spazam, parestezija, tetanija, konvulzije i aritmije (tahikardija, ventrikularne ekstrasistole, torsades de pointes) (Fawcett i sar., 1999; Gröber i sar., 2015; DiNicolantonio i sar., 2018; Reddy i sar., 2018).

Intoksikacija magnezijumom i hipermagnezemija, kao posledica, se veoma retko sreću u kliničkoj praksi, i to prevashodno kod pacijenata koje pate od hronične bubrežne insuficijencije (Gröber i sar., 2015). Hipermagnezemija se definiše kao stanje koje odlikuje porast koncentracije magnezijuma u serumu iznad 1,1 mmol/L i praćena je mučninom, povraćanjem, letargijom, mišićnom slabošću, bradikardijom, glavoboljom i crvenilom (Reddy i sar., 2018).

U literaturi postoje preporuke koje se mogu razmatrati prilikom određivanja serumskog nivoa jonskog magnezijuma:

- koncentracija Mg u serumu $<0,82$ mmol/L i urinarna ekskrecija koja iznosi 40–80 mg magnezijuma/dan, nedvosmisleno ukazuju na deficijenciju ovog bioelementa u organizmu (Costello i sar., 2016);
- jedna grupa eksperata savetuje uvođenje suplementacije magnezijumom ako je koncentracija ovog katjona u serumu $<0,9$ mmol/L i pacijent ispoljava simptome deficijencije Mg; sa druge strane, preporuka je da se uvede Mg suplementacija i u odsustvu simptoma, ako je nivo magnezijuma u serumu $<0,8$ mmol/L (Liebscher i Liebscher, 2004);
- koncentracija Mg u serumu $>0,95$ mmol/L upućuje na povišen rizik ili potencijalno prisustvo hipermagnezemije, prema grupi autora (DiNicolantonio i sar., 2018).

1.1.4. Modulatorna uloga magnezijuma u regulaciji aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda

Poslednjih godina, preklinička i klinička ispitivanja upućuju na interakciju koja postoji između magnezijuma i osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (eng. hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis), kao i na značaj održavanja homeostaze ovog bioelementa u organizmu za pravilnu funkciju HPA ose (Singewald i sar., 2004; Sartori i sar., 2012; Zogović i sar., 2014; Dmitrašinović i sar., 2016). Pokazano je da restrikcija unosa magnezijuma kod miševa, odnosno dijetetski režim kojim se zadovoljava približno 10% dnevnih potreba (50 mg magnezijuma/kg hrane), uzrokuje poremećaj funkcije HPA ose praćen bihevioralnim karakteristikama depresivnog i anksioznog fenotipa. Promene opisane kod eksperimentalnih životinja obuhvataju: povećanje nivoa iRNK za prepro-CRF (kortikotropin-oslobađajući faktor/hormon; eng. corticotropin releasing factor, CRF) u paraventrikularnom jedru (eng. paraventricular nucleus, PVN) hipotalamusa, porast koncentracije ACTH u plazmi, produženo vreme imobilnosti životinja u toku testa forsiranog plivanja (eng. forced swim test, FST), što upućuje na depresivni fenotip. Pored toga, u testu otvorenog polja (eng. open field test, OFT) zabeležen je smanjen broj ulazaka, kao i skraćeno vreme provedeno u centralnom delu polja, što

zajedno ukazuje na proanksiogeni efekat deplecije magnezijuma. Pored toga, *in vitro* ispitivanja su otkrila da dodatak magnezijum hlorida ćelijskoj kulturi neurona pacova inhibira oslobađanje CRF posredovano glutamatom (Cratty i Birkle, 1999).

Sa druge strane, kliničke studije su pokazale da hronična suplementacija magnezijumom (2 x 250 mg magnezijuma/dan, 28 dana) kod studenata i sportista (amaterskih ragbi igrača) značajno snižava nivo kortizola i interleukina 6 (IL-6) u serumu (Zogović i sar., 2014; Dmitrašinović i sar., 2016).

1.1.5. Uloga magnezijuma u etiopatogenezi depresivnog poremećaja

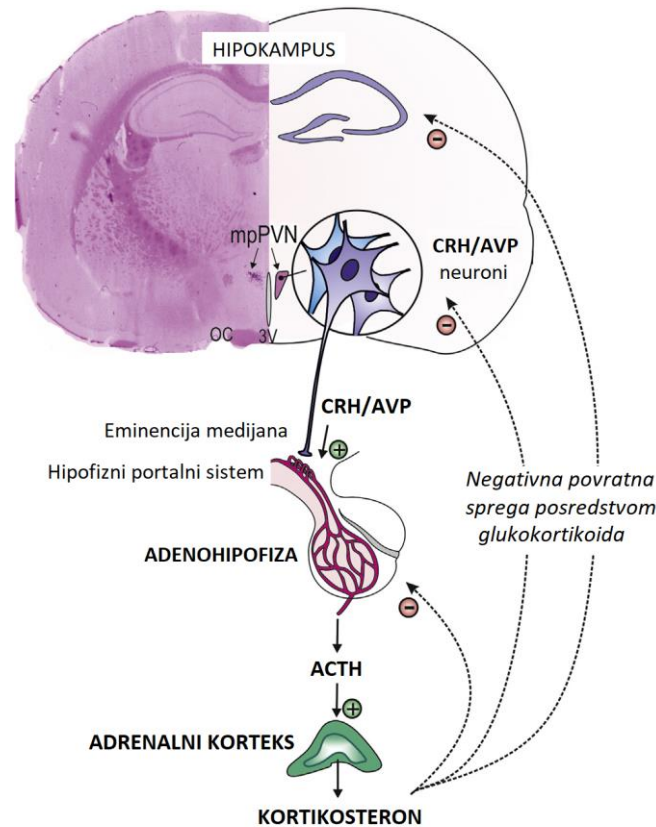
Imajući u vidu vezu između aktivnosti HPA osovine i afektivnih poremećaja, u studijama je praćen uticaj homeostaze magnezijuma, kao i efekat primene Mg suplemenata na depresivnu simptomatologiju. Naime, u Hordaland Health Study (zapadna Norveška), koja je obuhvatila 5708 ispitanika, starosti 46-49 ili 70-74 godina, pokazana je inverzna korelacija između unosa magnezijuma i simptoma depresije (Jacka i sar., 2009). Nasuprot tome, u epidemiološkoj studiji, sprovedenoj na uzorku od 12 939 ispitanika, studenata završne godine univerziteta u Španiji, nije uočena veza između unosa magnezijuma i rizika od razvoja depresije (Derom i sar., 2012). Međutim, potrebno je istaći da su učesnici studije bile osobe starosti $37,6 \pm 11,7$ godina, koje na početku istraživanja nisu bolovale od depresije, kardiovaskularnih bolesti ili malignih oboljenja, kao i da je incidenca pojave hipomagnezemije značajno veća kod starijih ljudi. Pored toga, u navedenom ispitivanju, i u grupi sa najnižim unosom magnezijuma, unos ovog bioelementa je u proseku bio veći od 250 mg/dan (Derom i sar., 2012). Sa druge strane, kliničke studije u kojima su ispitivani terapijski efekti i mogućnost primene suplemenata magnezijuma kod osoba koje pate od depresivnih poremećaja, pružile su oprečne rezultate. Rajizadeh i sar. (2017) su u randomizovanom, dvostruko slepom i placebo kontrolisanom istraživanju pokazali terapijsku efikasnost i antidepresivne efekte magnezijuma kod subpopulacije depresivnih pacijenata. Naime, u pomenutoj studiji magnezijum oksid (2 x 250 mg magnezijuma/dan, 8 nedelja) je doveo do poboljšanja depresivne simptomatologije, praćene uz pomoć Bekove skale za procenu depresivnosti, kod pacijenata sa dijagnozom depresije i hipomagnezemije (Rajizadeh i sar., 2017). Nasuprot tome, augmentacija magnezijumom (3 x 40 mg/dan, 8 nedelja) odnosno primena fluoksetina i magnezijuma kod obolelih od teške depresije, uprkos poboljšanju i nižem skor na Hamiltonovoj skali za procenu depresivnosti, nije pokazala statistički značajan efekat u poređenju sa fluoksetinom i placebo (Ryszewska-Pokraśniewicz i sar., 2018). Glavni nedostaci ove studije su mali broj ispitanika (ukupno 37, od kojih je 17 primalo fluoksetin i magnezijum) i izbor soli magnezijuma (magnezijum aspartat).

1.2. Depresivni poremećaj i hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina

1.2.1. Stres i hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina

Stres se poslednjih godina često navodi kao jedan od najvećih izazova savremenog života. Bilo da je reč o stresu emotivne ili fizičke prirode, poput sepse ili traume, smatra se da značajno utiče na sve aspekte života i doprinosi razvoju brojnih psihosomatskih oboljenja (Dimsdale, 2008). U sklopu fiziološkog odgovora organizma na stres javlja se aktivacija HPA osovine i simpato-adrenalnog sistema (eng. sympatho-adrenal system, SAS). Naime, prilikom delovanja stresora, iz paraventricularnog jedra hipotalamusa oslobađaju se CRF i arginin-vazopresin (eng. arginine vasopressin, AVP) koji potom stimulišu sintezu i sekreciju ACTH (Gold i Chrousos, 2002). Nakon oslobađanja iz kortikotropnih ćelija adenohipofize, ACTH deluje na koru nadbubrežne žlezde i

povećava sintezu i sekreciju kortizola, glavnog glukokortikoida kod čoveka (kortikosteron je glavni glukokortikoid kod glodara). Glukokortikoidi pripadaju klasi steroidnih hormona i kao liposolubilni molekuli lako prolaze kroz plazma membrane i krvno-moždanu barijeru. Glukokortikoidi svoje efekte ispoljavaju preko dva tipa receptora, glukokortikoidnih (GR) i mineralokortikoidnih (MR). Nakon oslobađanja, glukokortikoidi inhibiraju dalju sekreciju CRF i ACTH i na taj način, zahvaljujući mehanizmu negativne povratne sprege regulišu, odnosno smanjuju sopstvenu sintezu i sekreciju. Pored HPA osovine, aktivira se simpato-adrenalni sistem, što se manifestuje oslobađanjem noradrenalina iz *locus coeruleus* i povećanom sekrecijom adrenalina i noradrenalina iz hromafinih ćelija srži nadbubrežne žlezde (Gold, 2015).



Slika 4. Prikaz neuroendokrinih komponenti, kao i regulacije aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (HPA). Prilikom izlaganja stresu, neuroni medijalnog parvocelularnog paraventricularnog jedra (mpPVN) hipotalamusa sekretuju kortikotropin oslobađajući hormon (CRH) i arginin-vazopresin (AVP), koji potom stimulišu lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH). Nakon oslobađanja ACTH iz adenohipofize, ovaj peptidni hormon deluje na koru nadbubrežne žlezde i stimuliše lučenje kortikosterona, glavnog hormona stresa kod glodara. Kortikosteron deluje posredstvom svojih glukokortikoidnih receptora (ekspimiranih u adenohipofizi, PVN i hipokampusu) i negativnom povratnom spregom ograničava aktivnost HPA ose (*preuzeto iz reference Brunton, 2016*).

U uslovima akutnog stresa, glukokortikoidi su neophodni za preživljavanje, omogućavaju mobilizaciju energije i odgovor organizma u cilju održavanja homeostaze, u situaciji koja se percipira kao preteća. Akutno, njihovi metabolički efekti su pretežno katabolički. Najizraženiji efekti kortizola su stimulacija glukoneogeneze u jetri i supresija razgradnje glukoze, što rezultuje hiperglikemijom. Pored toga, kortizol utiče na metabolizam masti povećanjem lipolize, kao i oslobađanja masnih kiselina iz masnog tkiva, što dovodi do porasta njihove koncentracije u krvi i

povećanog korišćenja kao izvora energije. Na metabolizam proteina ispoljava kataboličko delovanje u svim ćelijama, izuzev u hepatocitima i kardiomiocitima (Oakley i Cidlowski, 2015; Stimson i sar., 2017). Katabolički efekat se ogleda u smanjenom transportu aminokiselina u ćelije, inhibiciji sinteze proteina i stimulaciji njihove razgradnje. Pored navedenih metaboličkih efekata, glukokortikoidi deluju antiinflamatorno, imunosupresivno i utiču na različite funkcije mozga, između ostalih i ponašanje. Potvrđeno je da GR odlikuje široka distribucija u mozgu i pri tom najveća gustina GR se vezuje za neurone hipotalamusa koji sintetišu CRF i kortikotropne ćelije hipofize. Sa druge strane, MR su pretežno zastupljeni u strukturama limbičkog sistema i najveća ekspresija je prisutna u hipokampusu (Sapolsky, 1990; de Kloet i sar., 2005).

1.2.2. Hiperaktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine u etiopatogenezi depresivnog poremećaja

Prilikom izlaganja stresu, javlja se adaptivni odgovor organizma u obliku aktivacije HPA osovine i simpatoadrenalnog sistema, i karakterišu ga porast koncentracije ACTH, kortizola i kateholamina u krvi. Međutim, u uslovima hroničnog stresa ili nakon traumatičnih događaja, kod osoba sa genetskom predispozicijom, izloženost visokom nivou glukokortikoida ispoljava brojne negativne efekte i remeti funkciju HPA osovine (van Bodegom i sar., 2017). Pokazano je da HPA osa ima značajnu ulogu u regulaciji afektivnog ponašanja i njena hiperaktivnost se često pominje kao neurobiološki supstrat u osnovi poremećaja raspoloženja, kao što su anksiozni poremećaji, veliki depresivni i bipolarni poremećaj (Krishnan i Nestler, 2008; Chen i sar., 2015). Naime, u velikom broju ispitivanja pokazana je hiperaktivnost HPA ose, kao i poremećaj funkcije simpatoadrenalnog sistema kod ovih pacijenata (Dronjak i sar., 2004; Johnson i sar., 2006; Zhao i sar., 2008; Jovanović i sar., 2014). Kod depresivnih pacijenata, hiperkortizolemija se manifestuje kroz poremećaj funkcije negativne povratne sprege, povećano oslobađanje CRF i pojačanu osetljivost nadbubrežne žlezde na efekte ACTH. Takođe, kod osoba koje pate od Kušingovog sindroma, oboljenja praćenog veoma visokim koncentracijama kortizola u plazmi, kliničku sliku često odlikuje depresivna simptomatologija (Nestler i sar., 2002; de Kloet i sar., 2005; Brown i sar., 2005; Krishnan i Nestler, 2008). Iako je kod obolelih od depresije prisutan poremećaj HPA ose i u najvećem broju slučajeva povišen nivo kortizola, nasuprot ustaljenom mišljenju, ispitivanja su pokazala da koncentracija glukokortikoida u plazmi može biti i snižena ili nepromenjena. Na primer, atipična depresija, koju odlikuju hipersomnija i hiperfagija, je udružena sa hipokortizolemijom (Gold i Chrousos, 2002; Krishnan i Nestler, 2008).

1.2.3. Epidemiologija, klinička slika i terapija depresivnog poremećaja

Depresija (velika ili unipolarna depresija) predstavlja jedan heterogeni, psihijatrijski sindrom. Danas se smatra najučestalijim psihijatrijskim oboljenjem i poremećajem raspoloženja koji pogađa približno 322 miliona ljudi u svetu (Krishnan i Nestler, 2008; Willner i sar., 2013; Friedrich, 2017). Naime, incidenca pojave depresije iznosi 10,4% na godišnjem nivou i 20,6% tokom životnog veka, pri tom 1,5 puta češće se javlja kod žena u odnosu na muškarce (Friedrich, 2017; Hasin i sar., 2018). Dijagnoza depresivnog poremećaja se postavlja ukoliko je prisutna promena raspoloženja koju karakterišu osećaj tuge i beznada i neki od sledećih simptoma: iritabilnost, poremećaj spavanja (insomnija ili hipersomnija), izražene promene u apetitu/telesnoj masi, anhedonija, osećaj beskorisnosti i krivice, agitacija, suicidalna ideacija ili pokušaj suicida. Neophodno je da navedeni simptomi traju minimum dve nedelje i da značajno utiču na posao, porodične i odnose sa partnerom i prijateljima (Nestler i sar., 2002; Belmaker i Agam, 2008). Depresiju karakteriše duboko negativna percepcija sveta, sebe i sopstvenih vrednosti i budućnosti. Naime, kod osoba koje pate od ovog oboljenja pažnja je pretežno usmerena ka negativnom aspektu,

prisutne su negativne misli i poremećaj u emocionalnoj i kognitivnoj kontroli. Smatra se da se opisani simptomi javljaju kao posledica funkcionalnih, kao i neuroanatomskih promena, prvenstveno atrofije hipokampusa i prefrontalnog korteksa i hipertrofije amigdala (Duman i Duman, 2015).

Postoji nekoliko hipoteza uz pomoć kojih se objašnjavaju patofiziološki mehanizmi, kao i signalni putevi u osnovi ovog oboljenja. Smatra se da genetska predispozicija povećava rizik za razvoj depresivnog poremećaja i da doprinos nasledne osnove iznosi približno 37% (Belmaker i Agam, 2008). Međutim, uprkos velikim naporima i primeni GWAS (eng. Genome-wide association studies) u istraživanju, nisu otkriveni geni čiji se polimorfizam dovodi u vezu sa nastankom bolesti (López-León i sar., 2008).

Precipitirajući faktor za manifestaciju depresivnog poremećaja, odnosno pojavu prve epizode depresije može biti endokrino oboljenje (hipotiroidizam, hiperkortizolemija), prisustvo maligniteta (adenokarcinom pankreasa, rak dojke), neželjeni efekat lekova (interferon α , izotretinoin) ili trauma glave. Međutim, najčešće je u pitanju stres, koji može biti hronične prirode usled nezaposlenosti, siromaštva i neskladnih odnosa u porodici, ili akutne prirode - razvod, smrt voljene osobe ili gubitak posla. Neophodno je istaći da stres kao faktor rizika, sam po sebi nije dovoljan da dovede do pojave depresivnog poremećaja. Pored genetske predispozicije i izloženosti stresu (naročito u ranom razdoblju i periodu razvoja i adolescencije), pokazano je da određene crte ličnosti doprinose nastanku depresije. Smatra se da je neuroticizam, kao crta ličnosti, jedan od najznačajnijih faktora rizika, koji interreaguje sa socijalnim i kognitivnim faktorima (Compass i sar., 2004; Willner i sar., 2013). Naime, negativne misli, kao jedna od karakteristika osoba koje pate od depresije, reflektuju aktivaciju negativne "kognitivne šeme", koja se razvila u ranom detinjstvu kao posledica fizičkog ili emotivnog zlostavljanja (Beck i Alford, 2009).

Depresivni poremećaj se smatra vodećim uzrokom onesposobljenosti širom sveta i terapija predstavlja veliki izazov, kako sa kliničkog aspekta, tako i za farmaceutsku industriju (Willner i sar., 2013; Friedrich, 2017). Uprkos tome što su lekovi koji se danas primenjuju, uključujući inhibitore monoamino oksidaze, triciklične antidepresive i inhibitore selektivnog preuzimanja serotonina, otkriveni i uvedeni u terapiju pre više decenija, njihov mehanizam delovanja još uvek nije u potpunosti rasvetljen. Pored toga, sa terapijskog aspekta, neophodno je uzeti u obzir i da remisija nastupa 3 do 7 nedelja od početka primene, antidepresivi imaju širok spektar neželjenih efekata (seksualna disfunkcija, insomnija, mučnina, dijareja, opstipacija, hipertenzija, produžen QT interval) i bolest ima hroničan tok (Fedgchin i sar., 2019). Posebnu zabrinutost izaziva činjenica da kod trećine pacijenata nema adekvatnog terapijskog odgovora i remisija izostaje. Depresija rezistentna na terapiju (eng. treatment-resistant depression, TRD) se dijagnostikuje ukoliko kod pacijenta simptomi depresije perzistiraju i nakon upotrebe dva antidepresiva, različitih mehanizama delovanja, uz primenu adekvatne doze i odgovarajuće dužine terapije (Walker i sar., 2013).

Farmakoterapijske klase antidepresiva, mehanizam delovanja, kao i neželjeni efekti prikazani su u Tabeli II (Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, 2011).

Tabela II. Farmakoterapijske klase, mehanizam delovanja i najznačajniji neželjeni efekti antidepresiva (preuzeto iz referenci: Ferguson, 2001; Vanderkooy i sar., 2002; Khawam i sar., 2006).

Farmakoterapijska klasa	Mehanizam delovanja	Predstavnici	Najznačajniji neželjeni efekti
Selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (<i>Selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs</i>)	Inhibicija serotoninskog transportera na presinaptičkoj membrani i povećanje nivoa serotonina u sinaptičkoj pukotini	Fluoksetin, fluvoksamin, citalopram, escitalopram, sertralin, paroksetin	Seksualna disfunkcija, poremećaji spavanja (somnolencija ili insomnija), mučnina, povraćanje, promene apetita, glavobolja
Inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina i noradrenalina (<i>Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors, SNRIs</i>)	Inhibicija ponovnog preuzimanja serotonina i noradrenalina u presinaptički završetak	Venlafaksin, duloksetin, milnacipran	Seksualna disfunkcija, poremećaji spavanja, mučnina, povraćanje, tahikardija, hipertenzija
Inhibitor preuzimanja noradrenalina i dopamina (<i>Norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor, NDRI</i>)	Inhibicija transportnih proteina na presinaptičkoj membrani i povećanje nivoa noradrenalina i dopamina u sinapsi	Bupropion	Insomnija, glavobolja, iritabilnost, agitacija, tremor, mučnina
Inhibitor preuzimanja noradrenalina (<i>Norepinephrine reuptake inhibitor, NERI</i>)	Inhibicija transportnog proteina i ponovnog preuzimanja noradrenalina u presinaptički završetak	Reboksetin	Insomnija, vrtoglavica, agitacija, anksioznost, suvoća usta, ortostatska hipotenzija
Inhibitor preuzimanja serotonina i parcijalni agonista serotoninskih receptora	Inhibitor serotoninskog transportera i parcijalni agonista presinaptičkih 5-HT _{1A} receptora	Vilazodon	Insomnija, vrtoglavica, mučnina, povraćanje, dijareja, suvoća usta
Antagonista adrenergičkih i serotonergičkih receptora	Antagonista presinaptičkih α_2 receptora i antagonista serotonergičkih 5-HT ₂ i 5-HT ₃ receptora, što povećava noradrenergičku i serotonergičku transmisiju	Mirtazapin	Sedacija, povećanje telesne težine, vrtoglavica, suvoća usta, konstipacija
Inhibitori preuzimanja serotonina i antagonisti serotoninskih receptora	Inhibicija serotoninskog transportera i antagonizam na nivou serotonergičkih	Trazodon, nefazodon	Sedacija, ortostatska hipotenzija, vrtoglavica, glavobolja, mučnina, opstipacija, suvoća usta

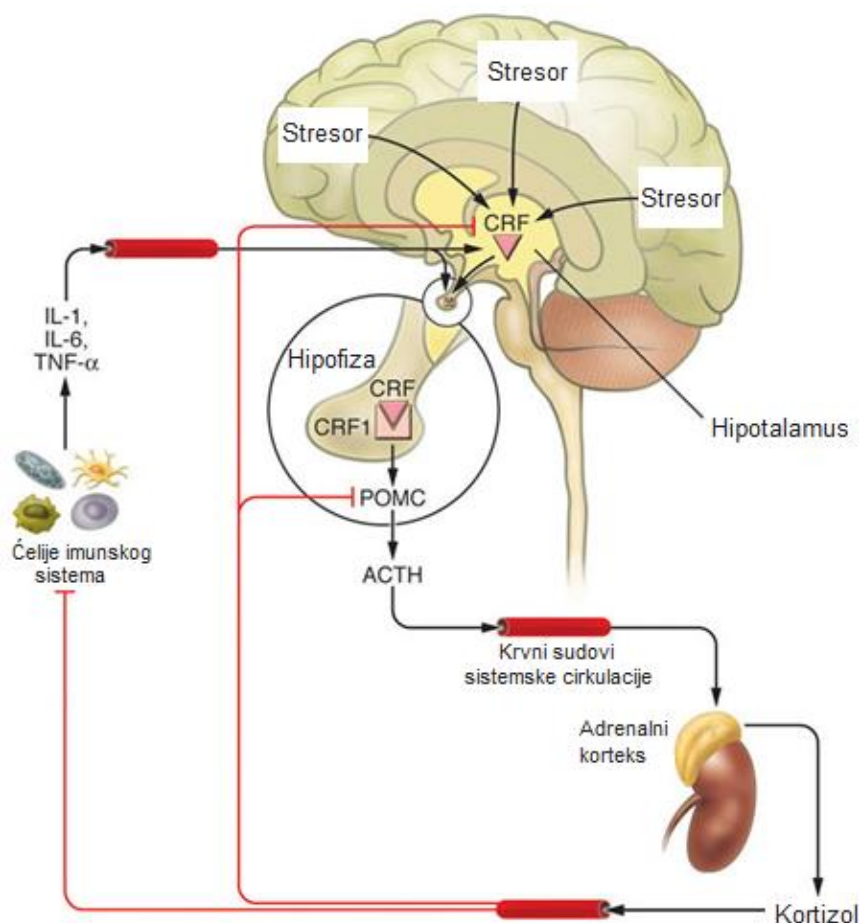
	postsinaptičkih 5-HT _{2A} receptora		
Inhibitor monoamino oksidaze (<i>Monoamine oxidase inhibitor, MAOI</i>)	Reverzibilna inhibicija enzima monoamino oksidaze A i povećanje nivoa noradrenalina, serotonina i dopamina u sinapsama	Moklobemid	Mučnina, dijareja, konstipacija, suvoća usta, insomnija, glavobolja, agitacija, suicidalna ideacija
Triciklični antidepresivi (<i>Tricyclic antidepressants, TCAs</i>)	Inhibicija ponovnog preuzimanja noradrenalina i serotonina, kao i kompetitivni antagonizam na nivou muskarinskih, histaminskih i α_1 i α_2 adrenergičkih receptora	Amitriptilin, nortriptilin, protriptilin, imipramin, desipramin, trimipramin, klomipramin, doksepin, amoksapin, maprotilin	Sedacija, povećanje telesne težine, suvoća usta, mučnina, konstipacija, urinarna retencija, zamagljen vid, ortostatska hipotenzija, tahikardija, atrioventrikularni blok, produžen QT interval, konfuzija, suicidalna ideacija
Tetraciklični antidepresivi (<i>Tetracyclic antidepressants, TeCAs</i>)	Antagonizam na nivou presinaptičkih α_2 adrenergičkih, kao i histaminskih H ₁ receptora i povećanje noradrenergičke i serotonergičke transmisije	Mianserin	Sedacija, porast telesne težine, sindrom nemirnih nogu, pojava edema, produžen QT interval, konvulzije, suicidalna ideacija
Agonista melatoninskih i antagonist serotoninskih receptora	Agonista melatoninskih i antagonist serotoninskih 5-HT _{2C} receptora	Agomelatin	Glavobolja, vrtoglavica, insomnija, somnolencija, mučnina, dijareja, konstipacija, anksioznost
Atipični antidepresivi	Modulacija glutamatergičke transmisije	Tianeptin	Sedacija, insomnija, vrtoglavica, palpitacije, tahikardija, produžen QT interval, suicidalna ideacija

Pored pomenutih farmakoterapijskih klasa i antidepresiva registrovanih u Srbiji, Američka agencija za hranu i lekove (eng. Food and Drug Administration, FDA) i Evropska komisija (eng. European Commission, EC) su 2019. godine odobrile primenu esketamina u obliku nazalnog spreja (Spravato, Janssen) u kombinaciji sa oralnim antidepresivom kod pacijenata koji boluju od TRD (Kim i sar., 2019; Mahase, 2019). Ushićenje, kao i široku primenu ketamina u terapiji depresivnih poremećaja u velikoj meri ograničavaju neželjeni efekti, uključujući i potencijal zloupotrebe (Fedgchin i sar., 2019). Ketamin je derivat fenciklidina, sintetičke droge koja je još poznata kao PCP (eng. phencyclidine) ili anđeoski prah (eng. "angel dust"). Fenciklidin uzrokuje stanje koje karakterišu delirijum, halucinacije, insomnija i agitacija (Dinis-Oliveira, 2017). U poređenju sa ketaminom, fenciklidin ima potentniji halucinogeni efekat. U randomizovanoj, dvostruko slepoj kliničkoj studiji pod nazivom SUSTAIN-2, u kojoj je praćena dugoročna bezbednost primene nazalnog spreja esketamina, pokazano je da su veoma česta neželjena dejstva bile vrtoglavica (32,9%), disocijacija (27,6%), mučnina (25,1%), i glavobolja (24,9%) (Wajs i sar., 2020). U ovom, kao i u prethodnim istraživanjima, opisani su i kardiovaskularni neželjeni efekti, uključujući porast

krvnog pritiska, tahikardiju i palpitacije (Doherty i sar., 2020). Uprkos tome što se smatra da je rizik od ozbiljnih kardiovaskularnih događaja kod osoba bez prethodne istorije kardiovaskularnih oboljenja i kod pacijenata sa kontrolisanom hipertenzijom relativno nizak, neophodno je pažljivo praćenje kardiovaskularnih parametara kod svih pacijenata koji su na terapiji esketaminom. Potrebno je istaći da su prilikom ispitivanja bezbednosti primene esketamina, na samom početku iz studije isključeni pacijenti sa nekontrolisanom hipertenzijom ($>140/>90$ mmHg), istorijom hipertenzivnih kriza, ili klinički značajnim abnormalnostima na elektrokardiogramu (EKG) (Doherty i sar., 2020). Pored toga, u ranijim istraživanjima, tokom primene ketamina/esketamina u terapiji TRD, opisani su: kratkotrajna sedacija, anksioznost praćena agitacijom, prolazne deluzije, panika, apatija, akutni kognitivni deficiti (poremećaj koncentracije, konfuzija i poremećaj pamćenja), nesanica, umor, i pri dugotrajnoj primeni razvoj intersticijalnog cistitisa i u slučaju zloupotrebe – zavisnost (Morgan i sar., 2010, 2012; Sanacora i sar., 2017; Short i sar., 2018; Wajs i sar., 2020). Neosporno je da postoji ogromna potreba za novim terapijskim agensom/pristupom, koji bi posedovao terapijsku efikasnost ketamina, uz poboljšanu tolerabilnost i bezbedniji profil neželjenih efekata.

1.2.4. Depresivni poremećaj i hiperaktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine: neuroendokrine i neuroimune interakcije

U cilju boljeg razumevanja neurobioloških mehanizama, značajan broj studija osvrnuo se na neuroendokrine i neuroimune interakcije, odnosno vezu koja postoji između HPA osovine, imunskog sistema i depresivnog poremećaja (Krishnan i Nestler, 2008). U skladu sa jednom od postojećih hipoteza, inflamacija i citokini, kao humoralni medijatori imunskog odgovora, imaju ulogu u etiopatogenezi depresije kod određenih subpopulacija pacijenata, ali ne kod svih. Smatra se da specifične subpopulacije depresivnih pacijenata karakteriše prisustvo hronične inflamacije niskog stepena udružene sa psihosocijalnim stresom (Wang i sar., 2019). Primera radi, inflamacija ima značajnu ulogu u etiopatogenezi depresivnog poremećaja kod osoba koje ispoljavaju simptome poput hiperfagije, hipersomnije i hroničnog umora (de Kluiver i sar., 2019). U meta-analizi koja je obuhvatila 82 studije, Köhler i sar. (2017) su došli do zaključka da su kod osoba koje pate od depresije značajno povećane koncentracije IL-6, faktora nekroze tumora- α (eng. tumor necrosis factor- α , TNF- α), interleukina-10 (eng. interleukin-10, IL-10), solubilnog receptora za IL-2, hemokin (C-C) liganda 2 (eng. chemokine (C-C) ligand 2, CCL-2), IL-13, IL-18, IL-12 i solubilnog TNF receptora 2 (eng. soluble TNF receptor 2) u poređenju sa zdravim dobrovoljcima. Takođe, pokazano je da terapija antidepresivima smanjuje perifernu inflamaciju, kao i nivo IL-6, TNF- α , IL-10 i CCL-2 (Köhler i sar., 2017). Sa druge strane, terapijska primena inflamatornog citokina interferona α (IFN- α) može dovesti do ispoljavanja simptoma depresije kod osoba koje u svojoj anamnezi nemaju epizode depresije (Miller i Raison, 2016).



Slika 5. Neuroendokrine i neuroimunske interakcije: regulacija aktivnosti osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (HPA). U uslovima akutnog stresa, kortikotropin oslobađajući faktor (CRF) deluje posredstvom CRF1 receptora i stimuliše lučenje pro-opiomelanokortina (eng. *pro-opiomelanocortin*, POMC), prekursora adrenokortikotropnog hormona (ACTH). ACTH stimuliše sintezu i oslobađanje kortizola iz kore nadbubrežne žlezde. Kortizol ispoljava imunosupresorni efekat, što se manifestuje promenama u ekspresiji interleukina-6 (IL-6), faktora nekroze tumora- α (TNF- α) i interleukina-1 (IL-1), dok pomenuti proinflamatorni citokini pospešuju aktivaciju HPA ose (*preuzeto iz reference Slominski, 2007*).

Naime, prilikom sistemske i/ili lokalne inflamacije, oslobođeni citokini, prevashodno IL-6, IL-1 i TNF- α , stimulišu aktivnost HPA ose (Bethin i sar., 2000). Pokazano je da prilikom aktivacije imunskog sistema poseban značaj ima IL-6, koji utiče na funkciju HPA osovine delujući stimulatorno na hipotalamus, hipofizu i nadbubrežne žlezde, povećavajući sekreciju CRF, ACTH i kortizola. Smatra se da IL-6 povećava osetljivost adrenalne žlezde na ACTH, kao i da IL-6 može delovati stimulatorno na HPA osu, nezavisno od CRF (Bethin i sar., 2000; Brotman i sar., 2007; Žarković i sar., 2008).

Sa druge strane, imunomodulatorna uloga CNS-a se ogleda u aktivaciji HPA ose, posredovanoj stresom, i oslobađanju glukokortikoida koji potom ispoljavaju inhibitorni efekat na transkripciju proinflamatornih i gena antivirusnog programa (Irwin i Cole, 2011). Imunosupresivno i antiinflamatorno delovanje kortizola ostvaruje se zahvaljujući: vezivanju aktiviranih GR za promotorski region i inhibiciji transkripcije odgovarajućih gena; indukciji antiinflamatornih gena, poput *NFKBIA*, koji kodira I κ B α (eng. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) i negenomskim efektima. Stupanjem u antagonističku interakciju sa

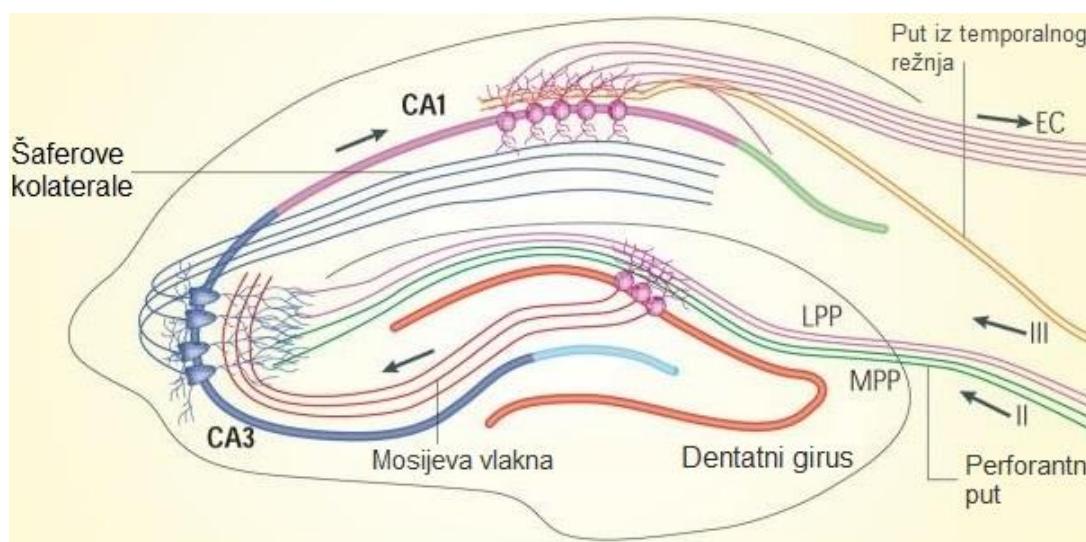
proinflamatornim transkripcionim faktorima, poput nuklearnog faktora κ B (eng. nuclear factor κ B, NF- κ B) i protein aktivatora 1 (eng. activator protein 1, AP-1) ostvaruju se negenomski efekti (Irwin i Cole, 2011). Paradoksalno, analiza profila transkripta cirkulišućih leukocita pokazala je povećanu ekspresiju proinflamatornih gena imunskog odgovora kod osoba dugoročno izloženih socijalnom stresu (smrtonosna bolest supružnika, nizak socio-ekonomski status, post-traumatski stresni poremećaj, socijalna izolacija), uprkos normalnom ili povišenom nivou kortizola. Smatra se da ova pojava odražava funkcionalnu desenzitizaciju GR i rezistenciju na glukokortikoide (Miller i Raison, 2016). Jedan od mehanizama nastanka ovih promena na molekularnom nivou predstavlja izmenjena fosforilacija GR u uslovima stresa. Naime, signalizacija posredstvom GR regulisana je zahvaljujući fosforilaciji receptora koja se odigrava pod uticajem c-Jun N-terminalne kinaze (eng. c-Jun N-terminal kinase, JNK) i ciklin-zavisnih kinaza (eng. cyclin-dependent kinases, CDKs). Fosforilacija GR na mestu S211 (serin 211), posredstvom CDKs, povećava ulazak GR u jedro i transkripcionu aktivnost, dok fosforilacija na mestu S226 (serin 226), posredstvom JNK, suprimira transkripcionu aktivnost i pospešuje prelazak GR u citoplazmu (Adžić i sar., 2009). Kod osoba koje boluju od depresije povećana je fosforilacija GR na mestu S226 i snižen je odnos fosfo-GR-S211/fosfo-GR-S226 u jedru, što ukazuje na smanjenu transkripcionu aktivnost GR kod ovih pacijenata (Simić i sar., 2013). Pored toga, u *post mortem* studijama je pokazano da je kod osoba koje su bile žrtve zlostavljanja u detinjstvu i kasnije počinile samoubistvo, povećana metilacija promotorskog regiona GR i smanjena ekspresija iRNK za GR, što ukazuje da i epigenetske promene utiču na ekspresiju GR i funkciju HPA ose (McGowan i sar., 2009; Anacker i sar., 2011).

1.2.5. Depresivni poremećaj, hiperaktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine i proces neurogeneze

Pored negativne povratne sprege koja se ostvaruje posredstvom glukokortikoida, aktivnost HPA osovine regulišu amigdaloidna jedra i hipokampus. Amigdaloidna jedra predstavljaju subkortikalnu sivu masu, bademastog oblika, i ispoljavaju ulogu u obradi različitih emocija, kao i u odgovoru organizma na averzivne stimuluse i u kondicioniranju straha. Veliki broj studija, posvećen ispitivanju funkcije amigdala, potvrdio je njihov značaj u etiopatogenezi anksioznih i depresivnog poremećaja. Naime, zahvaljujući centralnoj aktivaciji hipotalamusa, amigdale ispoljavaju ekscitatornu kontrolu nad HPA osom, stimulišući njenu aktivnost i uzrokujući porast nivoa cirkulišućeg kortizola. Kortizol deluje posredstvom pozitivne povratne sprege i stimuliše dalju aktivnost amigdala (Willner i sar., 2013). Nasuprot tome, hipokampus je struktura koja ispoljava inhibitornu kontrolu i ograničava aktivnost HPA osovine. Hipokampus je neuroanatomska struktura limbičkog sistema koja ima ulogu u učenju, formiranju deklarativne memorije, donošenju odluka i regulaciji ponašanja, uključujući uspostavljanje i održavanje socijalnih veza i ispoljavanje empatije (Rubin i sar., 2014). U anatomskom smislu, sastoji se od dentatnog girusa (eng. dentate gyrus, DG), Amonovog roga (Cornu Ammonis, četiri područja: CA1, CA2, CA3 i CA4) i regiona koji nosi naziv subiculum (Wible, 2013). Pored toga, hipokampus odlikuje visoka gustina glukokortikoidnih receptora i usled toga izražena osetljivost na efekte kortizola (Sapolsky, 1990; Workman i sar., 2014). U uslovima hroničnog stresa i dugotrajne izloženosti visokom nivou glukokortikoida javljaju se morfološka i funkcionalna oštećenja hipokampusa koja se manifestuju odumiranjem neurona i smanjenjem broja sinapsi (Sheline, 1996; Sheline i sar., 1999, 2003; Campbell i Macqueen, 2004; Workman i sar., 2014). Posledično, smanjuje se inhibitorna kontrola posredstvom hipokampusa i javlja se hiperaktivnost HPA osovine. Brojne prekliničke i kliničke studije su pokazale da se tokom starenja smanjuje volumen hipokampusa, kao i kod različitih neuropsihijatrijskih oboljenja, uključujući Alchajmerovu bolest, šizofreniju i depresivni poremećaj. Smatra se da je kod osoba koje pate od depresije smanjenje volumena, odnosno atrofija hipokampusa, direktna posledica delovanja glukokortikoida i povećane signalizacije posredstvom GR. Povrh toga, u modelima hroničnog stresa i kod pacijenata, pokazano je da jedan od efekata

aktivacije GR podrazumeva supresiju procesa adultne neurogeneze u granularnom i subgranularnom sloju (eng. subgranular zone, SGZ) dentatnog girusa (Wong i Herbert, 2004; Mineur i sar., 2007; Lucassen i sar., 2010; Hanson i sar., 2011; Samuels i Hen, 2011; Petrik i sar., 2012; Willner i sar., 2013). Inhibicija neurogeneze je primećena kod različitih vrsta, uključujući glodare (Alonso i sar., 2004; Mineur i sar., 2007; Willner i sar., 2013), primata (Gould i sar., 1998; Perera i sar., 2011; Willner i sar., 2013), ali i ljude, zahvaljujući *post mortem* analizama uzoraka tkiva hipokampusa pacijenata koji su patili od depresije (Lucassen i sar., 2010; Willner i sar., 2013). Međutim, smatra se da je zapravo priroda stresora odlučujući faktor koji će usloviti efekte na proces neurogeneze. Ukoliko je u pitanju stres nad kojim jedinka nema osećaj kontrole, neurogeneza u hipokampusu će biti inhibirana. Sa druge strane, ukoliko je reč o stresu koji se može kontrolisati, kao što su učenje i fizička aktivnost, neurogeneza će biti stimulisana (Saaltink i Vreugdenhil, 2014).

Naime, proces adultne neurogeneze obezbeđuje strukturnu i funkcionalnu plastičnost hipokampusa (Toda i sar., 2018). Podrazumeva deobu neuralnih stem ćelija SGZ odraslih jedinki, diferencijaciju i migraciju neuroblasta/nezrelih neurona i kasnu postmitotsku fazu sazrevanja koja uključuje rast i grananje dendrita i aksona i formiranje sinapsi (Saaltink i Vreugdenhil, 2014). Hronično izlaganje stresu i visokom nivou glukokortikoida utiče na sve faze ovog procesa: na proliferaciju ćelija, preživljavanje neurona i njihovu funkcionalnost (Willner i sar., 2013).



Slika 6. Shematski prikaz hipokampusa glodara, uključujući i složene projekcije neurona. Neuroni drugog sloja entorhinalnog korteksa (eng. *entorhinal cortex*, EC) projektuju svoje aksona i ostvaruju veze sa neuronima dentatnog girusa (DG) posredstvom perforantnog puta koji uključuje lateralni perforantni put (eng. *lateral perforant pathway*, LPP) i medijalni perforantni put (eng. *medial perforant pathway*, MPP). Ćelije DG šalju svoje projekcije i formiraju sinapse sa piramidalnim neuronima CA3 (*Cornu Ammonis 3*) regiona, koji dalje, preko Šaferovih kolaterala, ostvaruju veze sa piramidalnim neuronima CA1 (*Cornu Ammonis 1*) regije (preuzeto iz reference Deng i sar., 2010).

U najvećem broju studija formiranje i sazrevanje novih neurona, kao i proces sinaptogeneze, u hipokampusu, proučavani su merenjima ekspresije nuklearnog faktora Ki-67 i neurotrofičnog faktora poreklom iz mozga (eng. brain-derived neurotrophic factor, BDNF) (Dwivedi i sar., 2003; Huang i sar., 2008; Meis i sar., 2012; Gebara i sar., 2013; Suri i Vaidya, 2013). Antigen Ki-67 je nuklearni protein, marker ćelijske proliferacije koji se široko primenjuje u istraživanju, razvoju novih lekova i dijagnostici. Ekspresija Ki-67 je vezana za sve aktivne faze ćelijskog ciklusa,

odnosno kasnu G1, S, G2 i M fazu (Bologna-Molina i sar., 2013). BDNF je jedan od najviše proučavanih proteina članova familije neurotrofina i smatra se da je u nervnom sistemu jedan od najznačajnijih molekulskih medijatora razvoja, sinaptičke transmisije, sinaptičke plastičnosti i neurogeneze (Malberg i sar., 2000; Scaccianoce i sar., 2006; Li i sar., 2006). Signalizacija posredstvom BDNF stimuliše proliferaciju, preživljavanje, kao i sazrevanje novih neurona u hipokampusu odraslih jedinki. U skladu sa jednom od prihvaćenih hipoteza, štetni efekti glukokortikoida nastupaju upravo kao posledica njihovog uticaja na BDNF signalizaciju (Suri i Vaidya, 2013). Naime, poznato je da stres i glukokortikoidi smanjuju ekspresiju iRNK i proteina BDNF u hipokampusu (Duman i Monteggia, 2006). Navedeni fenomen je najpre zabeležen u animalnim modelima stresa, odnosno depresivnog poremećaja, poput modela socijalne izolacije, imobilizacije, maternalne deprivacije i modela koji se zasniva na egzogenoj primeni glukokortikoida (Duman i Monteggia, 2006). Potom je analizom tkiva hipokampusa depresivnih pacijenata, koji su počinili samoubistvo, utvrđeno da je i kod njih smanjen nivo iRNK i BDNF proteina u ovoj regiji mozga (Chen i sar., 2001; Dwivedi i sar., 2003; Karege i sar., 2005; Duman i Monteggia, 2006). Interesantno je da je primena antidepresiva, poput selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina, inhibitora preuzimanja noradrenalina i tricikličnih antidepresiva, u animalnim modelima, kao i kod depresivnih pacijenata, delovala stimulatorno na proliferaciju i diferencijaciju ćelija u DG i normalizovala nivo iRNK i BDNF proteina u hipokampusu (Duman i Monteggia, 2006).

1.2.6. Poremećaj homeostaze bioeleminata u etiopatogenezi depresije

Uprkos činjenici da je monoaminska hipoteza nastala pedesetih godina prošlog veka, patofiziološki mehanizmi u osnovi depresivnog poremećaja su kompleksni i heterogeni i ostaju u velikoj meri nerazjašnjeni. Pored pretpostavke o poremećaju monoaminske neurotransmisije i depleciji monoamina (noradrenalina, serotonina i dopamina), danas je poznato da neurobiološki supstrat u osnovi bolesti čine i promene u glutamatergičkoj i GABA-ergičkoj transmisiji, supresija neurogeneze i atrofija neurona kortikalne i limbičke regije (Nestler i sar., 2002; Duman, 2014; Duman i sar., 2019). Pored svega navedenog, pominje se i izvestan udeo bioeleminata, odnosno poremećaj njihove homeostaze koji doprinosi razvoju depresivne simptomatologije. Naime, pored magnezijuma i uloga koje ispoljava u modulaciji aktivnosti HPA ose i NMDA glutamatergičkih receptora, ispitan je potencijalni značaj drugih bioeleminata, poput bakra (Cu), cinka (Zn) i gvožđa (Fe).

Bakar je bioelement koji ima svojstvo kofaktora brojnih enzima uključenih u metabolizam monoaminskih neurotransmitera i njegov deficit kod glodara za posledicu ima, između ostalog, i smanjenu aktivnost dopamin β -hidroksilaze. Dopamin β -hidroksilaza je enzim koji učestvuje u sintezi noradrenalina i njegova redukovana funkcija će dovesti do pada nivoa noradrenalina i poremećaja noradrenergičke transmisije u mozgu (Prohaska i Smith, 1982; Młyniec i sar., 2015). Pored toga, u prekliničkim studijama je pokazano da redukovani unos cinka kod životinja ima prodepresivni efekat (Tassabehji i sar., 2008; Whittle i sar., 2009; Młyniec i Nowak, 2012). Sa druge strane, nakon izlaganja stresu, kod eksperimentalnih životinja su opisani poremećaj metabolizma gvožđa i povećano deponovanje ovog biometala u hipokampusu, prefrontalnom korteksu i strijatumu (Wang i sar., 2008; Zhao i sar., 2013). Međutim, primena navedenih bioeleminata kao biomarkera nije opravdana i neophodna su dalja ispitivanja u cilju rasvetljavanja njihove uloge u etiopatogenezi depresije, kao i analize promena u homeostazi, eventualno prisutnih kod obolelih.

1.2.7. Eksperimentalni modeli hiperaktivnosti hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine i depresivnog ponašanja

Značajan pomak u istraživanju neurobiologije depresije, kao i otkriću potencijalnih, novih antidepresiva, omogućen je zahvaljujući primeni animalnih modela. Eksperimentalni modeli depresije pretežno se zasnivaju na izlaganju životinja, najčešće glodara, hroničnom stresu ili primeni glukokortikoida, što uzrokuje neuroendokrine i promene u ponašanju, uključujući hiperaktivnost HPA osovine kao jednu od ključnih karakteristika depresivnog poremećaja, opisanu kod velikog broja pacijenata. Preklinički modeli koji se često primenjuju su model hroničnog blagog ili stresa nepredvidive prirode, ponavljana imobilizacija životinje, socijalna izolacija, socijalna subordinacija, maternalna deprivacija, dugotrajna primena glukokortikoida i indukcija neuroinflamacije primenom lipopolisaharida (eng. lipopolysaccharide, LPS) (Grippeo i sar., 2007; Zhao i sar., 2008; Donner i sar., 2012; Willner, 2016). Klinički značaj ovih modela ogleda se u činjenici da se bihevioralne i neuroendokrine promene, koje se javljaju kod životinja, povlače nakon primene antidepresiva. Međutim, primećeno je da ponavljana primena ACTH kod glodara (3, 7, 14 ili 21 dan) uzrokuje promene u ponašanju životinja koje su fenotipski analogne depresiji rezistentnoj na primenu tricikličnih antidepresiva. Naime, dugotrajna primena ACTH kod glodara ispoljila je supresivni efekat na proliferaciju ćelija i proces neurogeneze u SGZ hipokampusa i uzrokovala je hiperaktivnost HPA ose koja se manifestovala porastom nivoa glukokortikoida u krvi (Kitamura i sar., 2002a, 2011; Miyake i sar., 2014). Takođe, uprkos tome što primena tricikličnih antidepresiva, imipramina ili desipramina, značajno skraćuje vreme imobilnosti, u toku testa forsiranog plivanja (eng. forced swim test, FST), ovaj efekat izostaje ukoliko su životinje prethodno tretirane sa ACTH (Kitamura i sar., 2002a, 2008, 2014; Kim i sar., 2016).

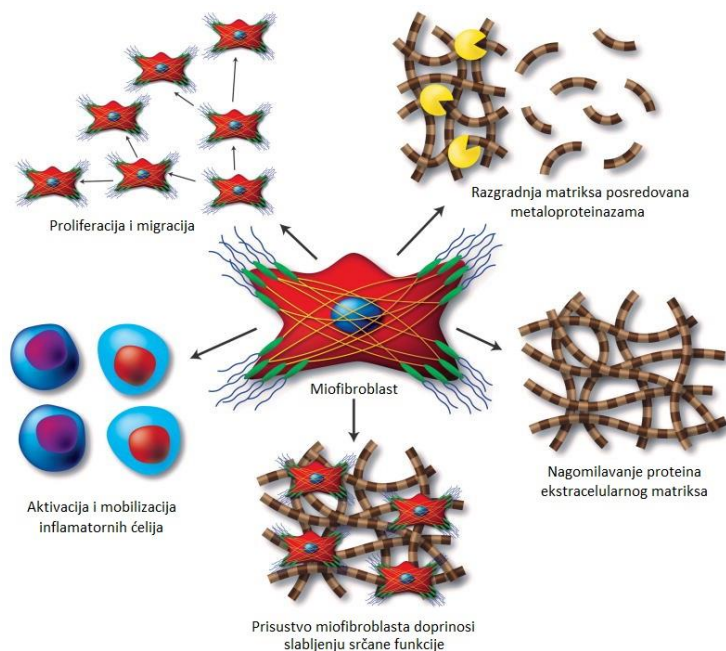
1.3. Depresivni poremećaj i kardiovaskularna oboljenja

1.3.1. Neurobiološki mehanizmi u etiopatogenezi depresivnog poremećaja i kardiovaskularnih oboljenja

Od davnina se pominje veza između stresa i kardiovaskularnih bolesti (KVB). Stres, u širem smislu reči, doprinosi razvoju i progresiji mnogih psihosomatskih oboljenja, uključujući i KVB, međutim, poslednjih godina postavlja se pitanje kliničkog značaja, kao i neurobioloških mehanizama koji ih povezuju.

Bolesti srca i krvnih sudova su poslednjih decenija vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta na globalnom nivou. Epidemiološka istraživanja ukazuju da u svetu godišnje oko 17,9 miliona ljudi umire usled KVB, i pri tom najčešće zbog prisustva ishemijske bolesti srca (IBS) (Mackay i Mensah, 2004; Benjamin i sar., 2018). Smatra se da je jedan od najvećih izazova današnjice prevencija i farmakoterapija remodelovanja srca. Remodelovanje obuhvata patofiziološke procese koji se javljaju u srcu, najčešće nakon infarkta miokarda (IM), odnosno promene na molekulskom i ćelijskom nivou koje se klinički manifestuju promenama u veličini, strukturi i funkciji miokarda (Azevedo i sar., 2016). Patološke promene koje oslikavaju remodelovanje srca obuhvataju apoptozu i nekrozu kardiomiocita, promene u sastavu izoenzima kontraktilnog aparata i poremećaj transporta kalcijuma, usled smanjene ekspresije L-tipa kalcijumovih kanala i rijanodinskih receptora i redukovane aktivnosti kalsekvestrina i kalmodulin kinaze. Pored toga, javlja se dilatacija komora i intersticijalna fibroza miokarda, što zajedno neminovno vodi ka ventrikularnoj disfunkciji (Azevedo i sar., 2016; Schirone i sar., 2017). Karakterične promene koje se javljaju prilikom fibroze miokarda, kao odgovor na patološki stres, podrazumevaju proliferaciju fibroblasta i diferencijaciju u miofibroblaste, povećanu sekreciju metaloproteinaza, kolagena, kao i drugih proteina

ekstracelularnog matriksa i infiltraciju inflamatornih ćelija u srcu (Travers i sar., 2016; Schirone i sar., 2017). Prema tome, tokom procesa remodelovanja srca javljaju se progresivni gubitak kardiomiocita i promene u organizaciji ekstracelularnog matriksa, praćene kompenzatornom hipertrofijom kardiomiocita i dilatacijom komora, vodeći ka razvoju srčane insuficijencije (Azevedo i sar., 2016). Klinička dijagnoza remodelovanja srca se postavlja na osnovu morfoloških promena- promena u dijametru komora, volumenu (hipertrofija ili atrofija), obliku (komore gube oblik elipse i poprimaju sferičan oblik), debljini zida srca (postaje tanji), prisustvu ožiljnog tkiva (nakon IM) i infiltrata inflamatornih ćelija (Cohn i sar., 2000; Azevedo i sar., 2016).



Slika 7. Fenotipska karakterizacija aktiviranih srčanih miofibroblasta. U sklopu odgovora na patološki stres, fibroblasti u srcu se transformišu u miofibroblaste, ćelije koje pokazuju povećanu ekspresiju proinflamatornih i profibrotskih faktora, što direktno doprinosi infiltraciji imunskih ćelija, kao i proliferaciji samih fibroblasta. Pored toga, miofibroblaste odlikuje povećana sinteza, potom i sekrecija, metaloproteinaza i drugih enzima koji razgrađuju ekstracelularni matriks, što omogućava migraciju fibroblasta i deponovanje intersticijalnog kolagena u srcu (*preuzeto iz reference Travers i sar., 2016*).

Shodno tome, veliki entuzijazam je izazvalo otkriće da pojedini kardiomiociti odraslih jedinki imaju sposobnost ponovnog ulaska u ćelijski ciklus - kariokineze i citokineze, nakon delovanja određenih stimulusa ili na primer, nakon IM (Kajstura i sar., 1998; Beltrami i sar., 2001; Li i sar., 2013; Yutzey, 2017). Pokazano je da regulatori ćelijskog ciklusa - ciklin-zavisna kinaza 1 (eng. cyclin-dependent kinase 1, CDK1), CDK4, ciklin B1 i ciklin D1, indukuju deobu terminalno diferenciranih kardiomiocita miševa, pacova, ali i humanih srčanih mišićnih ćelija. Navedeni regulatorni molekuli su indukovali proliferaciju i preživljavanje kardiomiocita u *in vitro* i *in vivo* uslovima, nakon IM, što je za posledicu imalo smanjenje veličine ožiljnog tkiva i značajno poboljšanje parametara srčane funkcije, poput ejsione frakcije, sistolnog i minutnog volumena kod glodara (Mohamed i sar., 2018). Međutim, uprkos ovom otkriću, stimulusi koji indukuju proliferaciju postmitotskih ćelija i signalni putevi, ostaju u velikoj meri nepoznati, kao i kliničke implikacije. Najvažniji limitirajući faktor fenomena indukcije proliferacije kardiomiocita, nakon fetalnog perioda, je značajan rizik od razvoja kardiomegalije i hipertrofije miokarda, što konačno vodi ka srčanoj insuficijenciji.

Pored tradicionalnih kardiovaskularnih faktora rizika, poput hipertenzije, povišenog serumskog (ukupnog i LDL) holesterola, niskog HDL holesterola, dijabetes melitusa, gojaznosti (naročito abdominalne gojaznosti), pušenja i fizičke neaktivnosti, veliki broj studija upućuje na ulogu stresa kao nezavisnog, predisponirajućeg faktora. Pokazano je da izloženost stresu, poput fizičkog i seksualnog zlostavljanja ili lošeg socioekonomskog statusa, tokom perioda odrastanja i razvoja, nosi sa sobom dvostruko veći rizik za razvoj srčanih oboljenja, u kasnijem životnom dobu. Sa druge strane, kod odraslih osoba, socijalna izolacija i osećaj usamljenosti se često navode kao uzroci hroničnog stresa i meta-analizom je pokazano da se kod ovih ljudi približno 1,5 puta povećava rizik za razvoj koronarne bolesti srca (Steptoe i Kivimäki, 2013). Pored toga, stres je jedan od najznačajnijih faktora rizika za razvoj brojnih neuropsihijatrijskih poremećaja, uključujući depresiju. Smatra se da je prisustvo depresivnog poremećaja nezavisni prediktor i da je kod ovih pacijenata 2-4 puta veći rizik za razvoj KVB (Joynt i sar., 2003). Uprkos činjenici da su signalni putevi i molekularni medijatori u osnovi patofizioloških promena nedovoljno istraženi, pretpostavlja se da hiperaktivnost HPA osovine i simpato-adrenalnog sistema doprinose nastanku KVB. Naime, hiperaktivnost HPA ose i autonomna disfunkcija, koji se manifestuju porastom koncentracije cirkulišućih ACTH, kortizola i kateholamina, su opisani kod velikog broja pacijenata koji pate od depresije. Visok nivo kortizola, tokom vremena, može dovesti do razvoja hipertenzije, endotelne disfunkcije i dalje progresije aterosklerotskih promena na krvnim sudovima (Colao i sar., 1999; Grippo i Johnson, 2002; Joynt i sar., 2003, 2004; Johnson i Grippo, 2006; Sgoifo i sar., 2015). Pored toga, metabolički poremećaji, poput insulinske rezistencije i abdominalne gojaznosti, koji se često javljaju kod obolelih od depresije, direktna su posledica porasta cirkulišućih glukokortikoida (Krishnan i Nestler, 2008). Na kraju, smatra se da je povišen nivo kortizola u plazmi nezavistan prediktor povećanog mortaliteta osoba koje pate od srčane insuficijencije (Omori i sar., 2014).

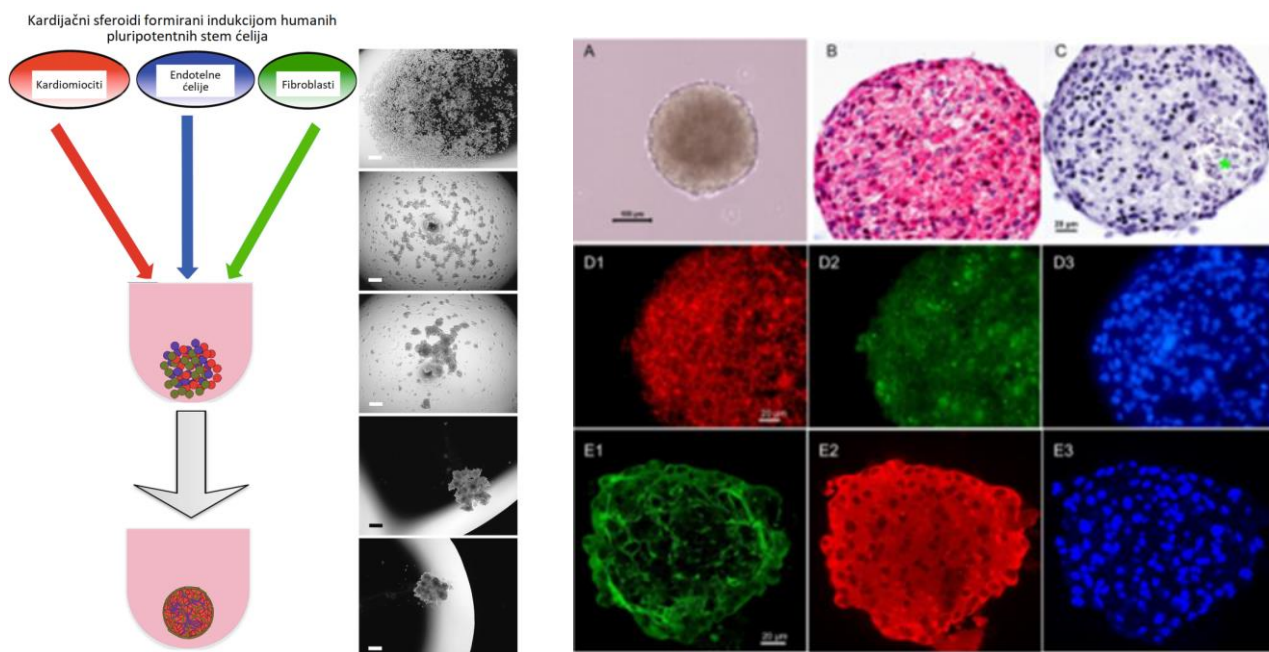
Istraživanja na životinjama su pokazala da se hronična izloženost stresu i hormonima stresa, može manifestovati i strukturnim promenama u srcu. Naime, u uslovima povišenog oksidativnog stresa, kortikosteron je indukovao razvoj fibroze miokarda kod pacova, aktivacijom MR i stimulacijom sinteze kolagena u fibroblastima (Omori i sar., 2014). Sa druge strane, u modelu depresivnog ponašanja, indukovano izlaganjem životinja hroničnom blagom stresu, nakon 8 nedelja u srcu su uočene patološke promene poput apoptoze kardiomiocita, poremećaja strukture miofibrila, mitohondrija i membrane nukleusa (Xinxing i sar., 2014).

1.3.2. Trodimenzionalni *in vitro* modeli ćelijskih kultura kardiomiocita

Pored animalnih modela, u ispitivanju signalnih puteva i patoloških mehanizama u osnovi bolesti srca, veliki značaj ima razvoj i primena ćelijskih kultura kardiomiocita. Imajući na umu dostupnost primarnih ćelija humanog porekla, poput kardiomiocita kao terminalno diferenciranih ćelija, etički i moralni aspekt njihove primene, poslednjih godina istraživanja su preusmerena na mogućnost indukcije i diferencijacije humanih pluripotentnih stem ćelija (Beauchamp i sar., 2015). Danas je primena humanih kardiomiocita formiranih indukcijom pluripotentnih stem ćelija rutinska u oblasti razvoja novih lekova, u ispitivanju efikasnosti, potencijalnih kardiotoksičnih efekata farmakoterapijskih agenasa i prilikom modelovanja KVB (Karakikes i sar., 2015; Gintant i sar., 2016).

Tradicionalni *in vitro* sistemi i upotreba ravnih, polistirenskih ploča u kojima ćelije formiraju jedan sloj - dvodimenzionalni (2D) modeli, podrazumevaju određeni rizik i ograničenja, poput nedovoljne preciznosti i osjetljivosti u studijama toksičnosti (Beauchamp i sar., 2015). U periodu između 1990. i 2006. godine, povlačenje leka sa tržišta u približno 33% slučajeva, usledilo je zbog ispoljene direktne kardiotoksičnosti (Shah, 2005; Beauchamp i sar., 2015). Otkriveno je i u većem broju studija potvrđeno da se u 2D model sistemima monokultura, različitih tipova ćelija,

javlja fenomen dediferencijacije već nakon par sati u kulturi. Pojava dediferencijacije podrazumeva promenjenu ekspresiju gena i specifičnih proteina, povećanu ekspresiju gena fetalnog programa i gubitak funkcije (Beauchamp i sar., 2015; Lauschke i sar., 2016; Bell i sar., 2017). Javila se potreba za novim sistemima u kojima bi fenotipske karakteristike i specifične ćelijske funkcije bile relativno nepromenjene, i to je uslovalo pojavu trodimenzionalnih (3D) *in vitro* modela, uključujući model sferoida.



Slika 8. Trodimenzionalni *in vitro* modeli sferoida humanih kardiomiocita. (A) Shematski prikaz procesa koji se odvija u ko-kulturi, nakon zasejavanja endotelne ćelije, kardiomiocita i fibroblasta nastalih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija. Pomenute ćelije spontano formiraju agregate vaskularizovane sferoide, koji modeluju humano srce. Pored sheme predstavljene su fotomikrografije humanih kardiomiocita, fibroblasta i endotelne ćelije u ko-kulturi, nastale korišćenjem svetlosnog mikroskopa, 0, 12, 24, 48 i 96 h nakon zasejavanja. (B) Morfologija sferoida humanih kardiomiocita (nakon tri nedelje u kulturi) je predstavljena na fotomikrografijama, zahvaljujući primeni različitih histoloških i imunohistohemijskih metoda bojenja (preuzeto iz referenci Beauchamp i sar., 2015 i Campbell i sar., 2019).

Strukturne i funkcionalne karakteristike, kao i vijabilnost ćelija tokom nekoliko nedelja u kulturi, omogućile su široku primenu 3D modela sferoida, što je izazvalo veliki pomak u istraživanju. Naime, sferoidi predstavljaju 3D ćelijske agregate koji nastaju spontano, zahvaljujući sili gravitacije, nakon zasejavanja ćelija. Prethodno definisan broj ćelija se zaseje u takozvane ultralow attachment (ULA) ploče, što omogućava formiranje sferoida optimalne veličine i difuziju kiseonika i nutrijenata do svih ćelija. Imunohistohemijska detekcija proteina (aktin, miomezin, koneksin 43 i fibronektin), analiza transkriptoma, kao i elektrofizioloških osobina (poput sposobnosti spontanog generisanja impulsa i kontrakcije), potvrdili su fenotipske i funkcionalne karakteristike, kao i prisustvo specifičnih međućelijskih veza u 3D modelima kardiomiocita nastalih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija, što pruža brojne mogućnosti njihove primene (Beauchamp i sar., 2015; Polonchuk i sar., 2017).

2. CILJEVI RADA

Eksperimentalno istraživanje sprovedeno u sklopu doktorske disertacije imalo je za prvi cilj ispitivanje efekata magnezijuma na ponašanje, neuroendokrine i parametre hipokampalne neurogeneze u modelu hroničnog stresa/depresije indukovane ponavljanom primenom adrenokortikotropnog hormona kod pacova. Drugi cilj bio je da se ispita uticaj dugotrajne primene adrenokortikotropnog hormona, jednog od glavnih medijatora stresa, na strukturu miokarda, odnosno parametre proliferacije i fibroze srca, kao i kardioprotektivna svojstva magnezijuma kod ovih životinja. Treći cilj bio je razvoj trodimenzionalnog modela ćelijskih kultura humanih kardiomiocita u svrhu određivanja potencijalnih *in vitro* efekata adrenokortikotropnog hormona na ove ćelije. Ispitivanje je bilo organizovano u tri faze.

U prvoj eksperimentalnoj fazi ispitivani su efekti ponavljane peroralne primene magnezijuma (300 mg magnezijuma/L vode za piće, 28 dana) na bihevioralne, kao i parametre aktivnosti HPA ose i neurogeneze u modelu hiperaktivnosti HPA ose koji se danas smatra modelom depresivnog ponašanja i indukovana je dugotrajnim tretmanom sa ACTH (10 µg/dan, 21 dan, *s.c.*). U tu svrhu ispitivani su:

- Promene u ponašanju eksperimentalnih životinja primenom testa otvorenog polja (eng. Open field test, OFT) i testa forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST).
- Promene koncentracija parametara koji oslikavaju aktivnost HPA osovine: ACTH, kortikosterona, adrenalina, noradrenalina i serotonina u krvi, kao i nivo citokina IL-6 koji ostvaruje blisku interakciju sa HPA osom. Pored toga, cilj je bio da se odrede svi pomenuti parametri u plazmi nakon izlaganja eksperimentalnih životinja akutnom stresu.
- Ekspresija biomarkera neurogeneze- molekula BDNF i Ki-67 u hipokampusu eksperimentalnih životinja, strukturi koja modulira aktivnost HPA osovine i pokazuje značajne morfološke i funkcionalne promene kod depresivnih poremećaja.

U drugoj eksperimentalnoj fazi cilj je bio da se ispita uticaj hroničnog tretmana sa ACTH (10 µg/dan, 21 dan, *s.c.*) na morfologiju srca, kao i potencijalni kardioprotektivni efekti magnezijuma (300 mg magnezijuma/L vode za piće, 28 dana). Pored toga, određivane su promene u homeostazi biometala u prefrontalnom korteksu životinja. Shodno tome, u ovoj fazi istraživanja analizirani su sledeći parametri:

- Nuklearni faktor Ki-67 i PCNA, kao markeri proliferacije kardiomiocita i dijametar kardiomiocita eksperimentalnih životinja.
- Endomizijalni kolagen i ekspresija Ki-67 i PCNA u fibroblastima, kao indikatori razvoja fibroze miokarda.
- Anti-apoptotski marker Bcl-2 i marker proliferacije Ki-67 u vaskularnim endotelnim ćelijama miokarda.
- Koncentracija bioelemenata- Mg, Cu, Zn i Fe u prefrontalnom korteksu eksperimentalnih životinja.

U trećoj eksperimentalnoj fazi razvijen je trodimenzionalni model sferoida kultura humanih kardiomiocita i u svrhu optimizacije uslova, ispitivan je uticaj različitih medijuma na vijabilnost

ćelija i fenotipske karakteristike. Potom, nakon izbora odgovarajućeg medijuma za ćelijske kulture, ispitivani su potencijalni direktni efekti različitih koncentracija ACTH na vijabilnost ćelija i gensku ekspresiju. U tu svrhu određivani su sledeći parametri:

- Nivo ATP u pojedinačnim sferoidima kardiomiocita, kao pokazatelj vijabilnosti ćelija, kao i aktivnost kaspaze 3, kao marker apoptoze.
- Genska ekspresija kardiomiocita: *MYL2* (kodira regulatorni laki lanac miozina 2), *MYL7* (kodira atrijalni laki lanac miozina 2), *PLN* (kodira fosfolamban koji reguliše aktivnost Ca-ATPaze na sarkoplazmatskom retikulumu), *NKX2.5* (kodira transkripcioni faktor neophodan za razvoj srca i funkcije sprovodnog sistema) i *Ki-67*.
- Strukturni proteini miofibrila - F-aktin i α -aktinin, kao indikatori morfoloških promena.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U istraživanju su korišćeni pacovi Wistar soja, muškog pola i starosti 8 nedelja na početku eksperimenta. Životinje su preuzete sa farme Vojnomedicinske akademije u Beogradu i odgajane su u vivarijumu Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Životinje su držane grupno (3-4 životinje u jednom kavezu) u standardnim kavezima od pleksiglasa, dimenzija 25 cm × 41 cm × 15 cm, pri sobnoj temperaturi (21±2 °C), relativnoj vlažnosti vazduha 40-70% i dnevno/noćnom ciklusu od 12 h (prostorija je bila osvetljena od 6 do 18 h, intenzitet svetla je bio 120 lx). Pored toga, životinje su imale pristup hrani i vodi *ad libitum*. Kavezi su čišćeni i prostirka je menjana tri puta nedeljno. Tokom sprovođenja eksperimenata praćen je unos hrane i vode, kao i promene u telesnoj masi životinja (merjenja su sprovedena tri puta nedeljno). Sve procedure sa oglednim životinjama su bile u skladu sa Direktivom 2010/63/EU i propisima Etičkog komiteta za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj dozvole: 323-07-00067/2015-05).

3.2. Eksperimentalni protokol

Istraživanje je sprovedeno kroz tri faze.

U prvoj fazi ispitivani su efekti dugotrajne peroralne primene Mg na ponašanje, parametre aktivnosti HPA ose i neurogeneze u animalnom modelu depresivnog ponašanja indukovano hroničnom primenom ACTH i rezistentnog na primenu tricikličnih antidepresiva. Naime, nakon primene Mg u trajanju od 28 dana i ACTH u trajanju od 21 dan ispitivane su: 1) promene u ponašanju eksperimentalnih životinja korišćenjem bihevioralnih testova; 2) koncentracije hormona u krvi: ACTH, kortikosterona, adrenalina, noradrenalina, serotonina, kao i proinflamatornog citokina IL-6 i 3) gustina i distribucija neurona u hipokampusu koji ekspimiraju BDNF i Ki-67 kao markere neurogeneze.

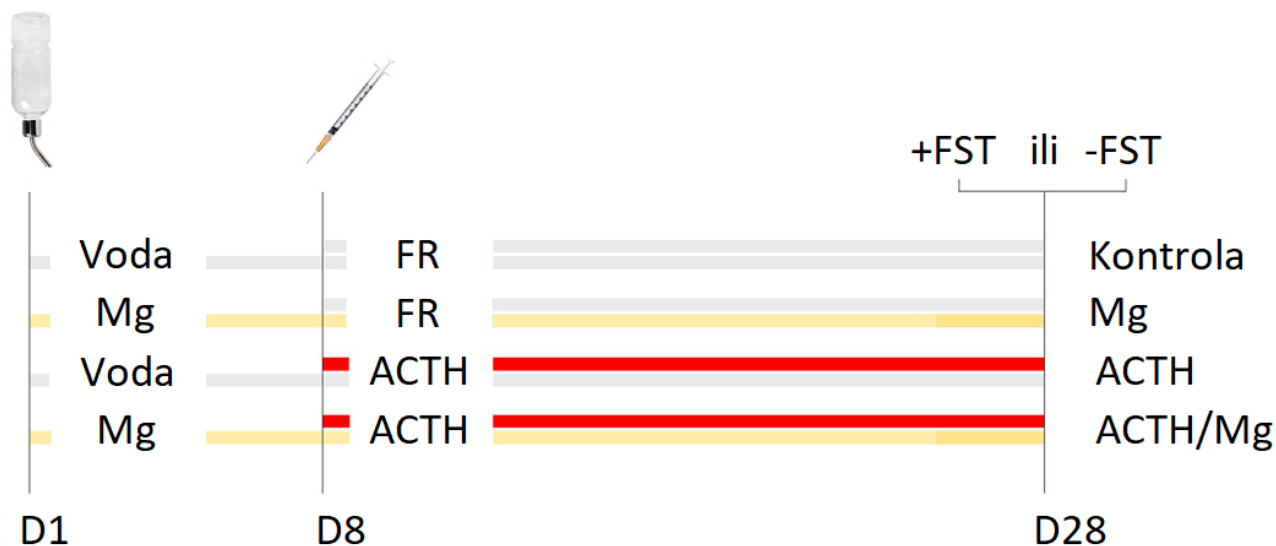
U drugoj fazi istraživanja u fokusu je bila karakterizacija efekata hronične primene ACTH na strukturu miokarda, kao i ispitivanje potencijalnih kardioprotektivnih svojstava Mg. Nakon primene Mg tokom 28 dana i ACTH u trajanju od 21 dan određivani su: 1) dijametar kardiomiocita; 2) broj ćelija- kardiomiocita, fibroblasta i vaskularnih endotelnih ćelija u srcu, koje ekspimiraju nuklearni protein Ki-67; 3) ekspresija nuklearnog antigena proliferišućih ćelija (eng. PCNA, proliferating cell nuclear antigen) u kardiomiocitima i fibroblastima; 4) broj Bcl-2 imunopozitivnih vaskularnih endotelnih ćelija, kao i 4) količina endomizijalnog kolagena u srcu. Pored toga, u prefrontalnom korteksu eksperimentalnih životinja merene su koncentracije bioelemenata, uključujući Mg, Cu, Zn i Fe i ispitivan je uticaj pomenutih tretmana na njihovu homeostazu.

U trećoj fazi istraživanja razvijen je 3D model ćelijskih kultura humanih kardiomiocita. Razvoj pomenutog 3D modela sferoida kardiomiocita uključio je i optimizaciju uslova, odnosno izbor odgovarajućeg medijuma za ćelijske kulture koji omogućava da ćelije imaju očuvanu vijabilnost i specifične fenotipske karakteristike tokom nekoliko nedelja u kulturi. Potom, ispitivani su potencijalni direktni efekti različitih koncentracija ACTH na sferoide kardiomiocita. U odgovarajućim vremenskim intervalima određivani su: 1) vijabilnost kardiomiocita merenjem koncentracije ATP-a; 2) aktivnost kaspaze 3, kao markera apoptoze; 3) ekspresija relevantnih gena u kardiomiocitima, uključujući *MYL2*, *MYL7*, *PLN*, *NKX2.5* i *Ki-67*; 4) strukturni proteini miofibrila F-aktin i α -aktinin metodom imunohistohemije.

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 100 životinja.

U sklopu prve faze istraživanja eksperimentalne životinje su randomizovanom raspodelom podeljene u četiri grupe (N=4×14) u zavisnosti od tretmana. Prva grupa životinja je dobijala magnezijum *per os* u obliku magnezijum sulfata rastvorenog u vodi za piće (300 mg magnezijuma/L, 28 dana). Druga grupa životinja je primala supkutane injekcije ACTH (10 µg/400 µL/dan, 21 dan, *s.c.*). Treća grupa je dobijala kombinaciju navedena dva tretmana (supkutane injekcije ACTH su primenjivane tokom poslednje tri nedelje primene Mg putem vode za piće, koja traje 28 dana). Četvrta grupa životinja je bila kontrolna i imala je slobodan pristup rastvaraču- vodi za piće tokom 28 dana i životinje ove grupe su, umesto ACTH, putem injekcija dobijale fiziološki rastvor (400 µL/dan, 21 dan, *s.c.*). Potom, svaka eksperimentalna grupa je bila podeljena na dve podgrupe tako da je 7 životinja, odnosno jedna podgrupa bila podvrgnuta testu otvorenog polja (eng. open field test, OFT), koji ne predstavlja značajan akutni stres za glodare, dok je druga podgrupa bila izložena testu forsiranog plivanja (eng. forced swim test, FST). Naime, u svrhu praćenja uticaja akutnog stresa, što za eksperimentalne životinje predstavlja izlaganje FST, i ispitivanja promena odgovarajućih parametara iz krvi, pacovima je 30 min nakon bihevioralnog testa uzorkovana krv.

Nakon završetka tretmana, 28-og dana eksperimenta, životinje su bile podvrgnute odgovarajućim bihevioralnim testovima (OFT ili FST) i žrtvovane primenom opšte anestezije u obliku intraperitonealne injekcije natrijum-tiopental (Nesdonal®, Roche, Švajcarska) u dozi od 50 mg/kg. U cilju praćenja prethodno navedenih parametara, životinjama je kardijačnom punkcijom uzorkovana krv i izolovani su mozak i nadbubrežne žlezde. Krv je prikupljena u hepariniziranim tubama (Eppendorf) i potom centrifugirana na 3600 rpm tokom 10 minuta na 4 °C. Plazma je izdvojena, uzorci su alikvotirani i skladišteni na -80 °C za dalje analize. Moždano tkivo je prebačeno u 3,6% rastvor formaldehida, uz dodatak fosfatnog pufera, u cilju fiksacije tkiva za imunohistohemijsku analizu. Nadbubrežne žlezde su izvađene, pažljivo je uklonjeno okolno masno i vezivno tkivo i izmerena je masa ovih organa.



Slika 9. Protokol prve eksperimentalne faze: istraživanje efekata supkutane primene adrenokortikotropnog hormona (ACTH) u dozi od 10 µg/dan i trajanju 21 dan, primene magnezijuma (Mg) putem vode za piće (300 mg magnezijuma/L, 28 dana), kao i kombinacije pomenutih tretmana kod mužjaka pacova. Nakon 28 dana (D28) od početka primene Mg, u cilju ispitivanja bihevioralnih promena, svaka eksperimentalna grupa je podeljena na dve podgrupe i životinje su izložene ili testu otvorenog polja (OFT) ili testu forsiranog plivanja (FST). FR - fiziološki rastvor.

U drugoj fazi istraživanja eksperimentalne životinje su randomizovanom raspodelom bile podeljene u četiri grupe (N=44) i izložene istim tretmanima kao životinje u prvoj fazi. Prva grupa dobijala je Mg u obliku magnezijum sulfata (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*), druga grupa primala je ACTH (10 µg/400 µL/dan, 21 dan, *s.c.*), treća grupa je bila izložena kombinovanom tretmanu koji uključuje Mg i ACTH i četvrta grupa je bila kontrolna (fiziološki rastvor 400 µL/ dan, 21 dan, *s.c.*). Životinje su 28-og dana eksperimenta *i.p.* primenom natrijum-tiopental (50 mg/kg) uvedene u opštu anesteziju i žrtvovane. U cilju određivanja relevantnih parametara životinjama su izolovani mozak i srce.

U trećoj fazi istraživanja korišćene su komercijalno dostupne ćelije, uključujući nodalne i srčane mišićne ćelije pretkomora i komora (iCell® Cardiomyocytes², Cellular Dynamics International, Inc., Sjedinjene Američke Države), formirane indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija. Navedene ćelije su zasejane u ULA ploče (Corning, Sjedinjene Američke Države) sa 96 bunarića. Gustina zasejavanja bila je 1500 vijabilnih ćelija po jednom bunariću i ćelije su zasejane u 100 µL jednog od dva medijuma:

- Plating Medium (PM; Cellular Dynamics International, Inc., Sjedinjene Američke Države),
- William's E Medium (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države) uz dodatak 2 mM L-glutamina, 100 units/mL penicilina, 100 µg/mL streptomocina, 10 µg/mL insulina, 5,5 µg/mL transferina, 6,7 ng/mL natrijum selenita, 100 nM deksametazona, B-27 suplementa, insulinu sličnog faktora rasta 1, vaskularnog endotelnog faktora rasta, faktora rasta fibroblasta 2 i transformišućeg faktora rasta beta 1 (u daljem tekstu na engleskom William's E Medium with supplements, WES).

Neposredno nakon zasejavanja ULA ploče su centrifugirane (100 x g, 2 min). Zasejani kardiomiociti i nodalne ćelije su spontano formirali kompaktne 3D ćelijske agregate – sferoide, nakon 5 dana. U cilju poređenja 2D i 3D modela ćelijskih kultura, zasejan je određeni broj ćelija u ploče (24 bunarića) koje su prethodno obložene sa 0,1 % rastvorom želatina, što predstavlja konvencionalni 2D sistem. Prilikom zasejavanja korišćeno je 0,6 mL PM i gustina je bila 90 000 ćelija po bunariću. Nakon 4 h od zasejavanja, izvršena je promena medijuma i ćelije su prebačene iz PM u Maintenance Medium (MM; Cellular Dynamics International, Inc., Sjedinjene Američke Države). U Tabeli III prikazane su karakteristike komercijalno dostupnih ćelija koje su primenjene za razvoj trodimenzionalnog *in vitro* modela sferoida humanih kardiomiocita.

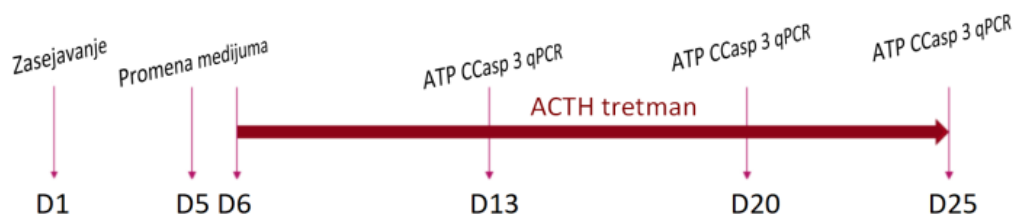
Tabela III. Karakteristike komercijalno dostupnih kardiomiocita formiranih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija (iCell Cardiomyocytes², Cellular Dynamics International).

	iCell Cardiomyocytes ² , kataloški broj 01434
Pol	Ženski
Starosna dob	< 18
Etnička pripadnost	Bela rasa
Izvor ćelija	Fibroblasti
Metoda diferencijacije ćelija	Retrovirusna transdukcija

U 3D model sistemu, 5 dana nakon zasejavanja, formirali su se kompaktni sferoidi kardiomiocita i izvršena je promena medijuma, odnosno ćelije su iz PM prebačene u jedan od sledeća tri medijuma za ćelijske kulture: William's E medium (uz dodatak 2 mM L-glutamina, 100 units/mL penicilina, 100 µg/mL streptomocina, 10 µg/mL insulina, 5,5 µg/mL transferina, 6,7 ng/mL natrijum selenita i 100 nM deksametazona; u daljem tekstu na engleskom WE); WES i MM.

Ćelije koje su bile zasejane u WES su tokom perioda kultivacije ostale u WES, samo je redovno vršena promena starog medijuma i dodatak novog, svežeg. Period kultivacije iznosio je 7 dana, i za 2D i za 3D model sistem, i na 48-72 h vršena je promena medijuma.

Nakon izbora odgovarajućeg medijuma za ćelijske kulture, odnosno optimizacije uslova pod kojim ćelije imaju očuvanu vijabilnost i fenotip, u sklopu ove faze istraživanja ispitivani su i potencijalni direktni *in vitro* efekti ACTH na humane kardiomiocite. Ćelije su zasejane, na prethodno opisan način, uz primenu PM. Nakon 5 dana u kulturi, spontano su se formirali sferoidi kardiomiocita koji su imali sposobnost generisanja impulsa, praćenog kontrakcijom. Izvršena je promena medijuma, iz PM u WE, koji je potom korišćen do kraja perioda u kulturi. Počevši od šestog dana, kardiomiociti su tretirani rastvorima različitih koncentracija ACTH: 1) 22 ng/L (4,84 pmol/L; 1x ACTH) i 2) 660 ng/L (145,34 pmol/L; 30 x ACTH), dok su kao kontrole korišćeni netretirani sferoidi kojima je vršena redovna promena uz dodatak sveže pripremljenog WE medijuma (48-72 h), tokom 19 dana u kulturi. U odgovarajućim vremenskim intervalima, ispitivane su vijabilnost ćelija, aktivnost kaspaze 3, kao i promene u ekspresiji relevantnih gena.



Slika 10. Algoritam treće faze istraživanja: ispitivanje efekata adrenokortikotropnog hormona (ACTH) na humane kardiomiocite u 3D modelu sferoida. Počevši od šestog dana u kulturi (D6), kada su spontanom agregacijom ćelija formirani kompaktni sferoidi, kardiomiociti su izlagani ACTH tretmanu i u odgovarajućim vremenskim intervalima određivani su vijabilnost ćelija (ATP esej), nivo apoptoze u kulturi (merenjem aktivirane kaspaze 3 - CCasp 3) i ekspresija kardiospecifičnih gena metodom lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu (qPCR).

3.3. Hemijske supstance korišćene u tretmanima

U *in vivo* eksperimentima, adrenokortikotropni hormon (Synacthen 0,25 mg/mL, Novartis, Bazel, Švajcarska) je rastvaran u fiziološkom rastvoru (0,9% natrijum-hlorid, Hemofarm A.D., Vršac, Republika Srbija) do finalne koncentracije od 25 µg/mL. Supkutane injekcije ACTH primenjivane su svakodnevno odgovarajućim eksperimentalnim grupama u dozi od 10 µg/400 µL/dan, što iznosi približno 33,33 µg/kg telesne mase/dan. U istraživanjima je pokazano da izabrana doza, odnosno primena 10 µg/dan ACTH kod glodara indukuje hiperaktivnost HPA osovine i značajan porast nivoa kortikosterona u plazmi (Scantlebury i sar., 2017). Magnezijum je primenjivan u obliku magnezijum sulfata (Apoteka Beograd, Republika Srbija) koji je rastvaran u

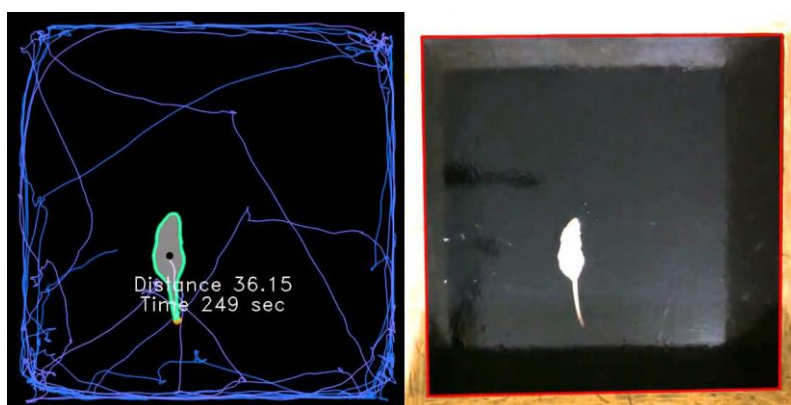
vodi za piće (česmenska voda) do finalne koncentracije od 300 mg magnezijuma/L. Eksperimentalne životinje su imale slobodan pristup rastvoru magnezijum sulfata i shodno tome, na osnovu prosečnog dnevnog unosa vode, magnezijum je aplikovan u dozi od 50 mg/kg telesne mase/dan. Kontrolne grupe životinja su imale slobodan pristup vodi za piće i umesto ACTH, dobijale su supkutane injekcije fiziološkog rastvora (400 µL/dan). *Ex tempore* pripremljeni rastvori primenjivani su svakog dana u periodu između 8:00 i 9:00 h.

U *in vitro* eksperimentima najpre je pripremljen radni rastvor, rastvaranjem praškaste supstance ACTH (Sigma Aldrich, kat. br. A0423, Švedska) u sterilnoj vodi. Neposredno pre tretmana humanih kardiomiocita, radni rastvor ACTH je razblažen korišćenjem ćelijskog medijuma (WE) do finalnih koncentracija od 22 ng/L (4,84 pmol/L; 1x ACTH) i 660 ng/L (145,34 pmol/L; 30x ACTH). Koncentracija od 22 ng/L predstavlja srednju vrednost koncentracije ACTH u plazmi odraslih osoba, u jutarnjim časovima (između 7:00 i 10:00 h) (Verschraegen i sar., 2007). U cilju indukcije apoptoze i uvođenja pozitivne kontrole prilikom merenja aktivnosti kaspaze 3, određen broj sferoida kardiomiocita tretiran je 1 µM rastvorom staurosporina (Sigma Aldrich, kat. br. S6942, Švedska), tokom 24 h.

3.4. Protokoli bihejvioralnih eksperimenata

3.4.1. Test otvorenog polja (eng. Open field test, OFT)

Svi bihejvioralni testovi su izvođeni u periodu od 08:00 h do 15:00 h. Test otvorenog polja imao je za cilj ispitivanje eksplorativnog ponašanja eksperimentalnih životinja, kao i promena u ponašanju koje mogu ukazati na anksioznost. Test je izvođen pod prigušenim crvenim svetlom (20 lx), u ograđenom drvenom prostoru sa crnim gumenim podom, oblika kvadrata i dimenzija 100 × 100 × 50 cm. Vreme trajanja testa iznosilo je 10 min. Životinje su, bez prethodne habituacije, postavljane u središte aparature i njihova aktivnost je praćena tokom trajanja testa zahvaljujući digitalnoj kameri povezanoj sa softverom ANY-maze (Stoelting Co.). Nakon svake životinje aparatura je brisana 70%-nim etanolom u cilju uklanjanja olfaktornih tragova. Centralnih 50% površine aparature je virtuelno postavljeno kao centralna zona. Parametri koji su praćeni tokom OFT su: 1) ukupni pređeni put eksperimentalne životinje (m); 2) pređeni put u centralnoj zoni (m) i 3) vreme provedeno u centralnoj zoni (s).



Slika 11. Test otvorenog polja (OFT). (A) Primena AnyMaze® softvera u cilju praćenja kretanja životinje tokom izvođenja testa. (B) Snimak životinje i aparature tokom OFT u realnom vremenu (*preuzeto sa [28](https://www.google.com/search?biw=1573&bih=770&tbm=isch&sa=1&ei=0xAWXeTnDsWOLwSu573ICg&q=open+field+test&oq=open+field+test&gs_l=img.12...0.0..132126...0.0..0.0.0.....0.....gws-wiz-img.VKPukDYSitY#imgsrc=2vM64GddCryM8M:</i>)</p></div><div data-bbox=)*

3.4.2. Test forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST)

Porsoltov test forsiranog plivanja je najčešće korišćen, standardni skrining test za otkrivanje potencijalnih novih antidepresiva, koji se primenjuje poslednjih 40 godina (Porsolt i sar., 1978; Rotzinger i sar., 2010). Postoje različite modifikacije originalne metode, u ovom istraživanju primenjen je protokol koji podrazumeva FST trening u trajanju od 15 min i nakon 24 h test od 5 min. Svako izlaganje testu forsiranog plivanja za životinje predstavlja akutni stres. Naime, aparatura za izvođenje FST se sastoji iz staklenog cilindra, visine 45 cm i dijametra 20 cm, koji se prilikom izvođenja FST napuni vodom temperature 25 ± 1 °C i eksperimentalna životinja se ubaci u vodu. Visina vode u cilindru je bila podešena (u proseku visina od 35 cm) tako da pacovi nisu mogli da izađu iz cilindra ili da dotaknu dno zadnjim šapicama ili repom, što ih je stavljalo u bezizlaznu situaciju i omogućavalo praćenje takozvanog "despair-like behavior". Tokom svakog testa forsiranog plivanja aktivnost životinja je praćena putem kamere i naknadno analizirana od strane istraživača koji nije bio upoznat sa dodeljenim tretmanima. Nakon svake životinje cilindar je očišćen i dezinfikovao i voda je bila zamenjena novom. Parametri koji su praćeni tokom izvođenja FST su sledeći: 1) vreme imobilnosti (definiše se kao odsustvo pokreta, odnosno vreme koje životinja provodi čineći samo pokrete zadnjim šapicama uz pomoć kojih se održava na površini vode); 2) latentni period (vreme koje protekne od početka testa do prve pojave imobilnosti); 3) vreme koje životinja provede plivajući i 4) vreme koje životinja provede u propinjanju i penjanju uz zidove cilindra.



Slika 12. Prikaz snimka životinje načinjenog tokom izvođenja Porsoltovog testa forsiranog plivanja (FST) (preuzeto sa: <https://slideplayer.com/slide/4717417/>).

3.5. Određivanje koncentracije kateholamina i serotonina metodom reverzno-fazne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (Reversed phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)

Koncentracije biogenih amina, adrenalina, noradrenalina i serotonina, određivane su u uzorcima plazme primenom sistema za tečnu hromatografiju. Proces pripreme uzoraka obuhvatao je odmrzavanje plazme, centrifugiranje (30 000 g, 15 min, 4 °C), odvajanje supernatanta i filtriranje (korišćen je filter dijametra pora 0,2 µm). Metoda podrazumeva primenu polarne mobilne faze i nepolarne stacionarne faze.

3.5.1. Određivanje koncentracije kateholamina u plazmi eksperimentalnih životinja metodom HPLC

Kvantifikacija kateholamina, adrenalina i noradrenalina, u plazmi, izvršena je primenom HPLC sistema sa elektrohemijским detektorom (HPLC with electrochemical detector, HPLC-ECD). Prvi korak podrazumevao je ekstrakciju na aktiviranom aluminijum-oksidu: 50 µL rastvora internog standarda (dihidroksibenzilamina) je dodato u 1 mL svakog uzorka plazme, koji su potom injektovani u kolonu za ekstrakciju. Usledilo je mešanje (20 min) i ispiranje uz pomoć odgovarajućeg reagensa. Nakon toga, izvršeno je eluiranje adrenalina i noradrenalina uz pomoć 120 µL reagensa za ekstrakciju. Svi pomenuti reagensi, uključujući kolonu sa puferom i interni standard, ulaze u sastav originalnog kita za određivanje kateholamina u plazmi (Recipe, kat. br. 1000, Minhen, Nemačka). Prema navodima proizvođača, osetljivost kita iznosi 5 ng/L, intra-esej koeficijent varijacije za noradrenalin je 6,7% i 7,6% za adrenalin, dok je inter-esej koeficijent varijacije za noradrenalin 5,3% i za adrenalin 4,2%.

Za hromatografsko razdvajanje korišćena je originalna mobilna faza (0,1 M KH_2PO_4 , 1,5 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0,1 mM natrijum-EDTA i 4% CH_3OH), kao i HPLC kolona za određivanje nivoa kateholamina u plazmi (Chromsystems, kat. br. 5000, Nemačka). U skladu sa navodima proizvođača, limit kvantifikacije iznosi 15 ng/L, linearnost metode do 10 000 ng/L, intra-esej koeficijent varijacije je manji od 11,4%, dok je inter-esej koeficijent varijacije manji od 12,7%. Komponente HPLC sistema koji je korišćen za razdvajanje i detekciju su: HPLC autosampler (Waters 270, Francuska), HPLC pumpa (Waters 1515, Francuska) i elektrohemijški detektor (Waters 2465, Francuska). Zapremina uzorka koja je injektovana u HPLC pumpu iznosila je 50 µL. Prilikom određivanja kateholamina, protok mobilne faze je bio 1 mL/min, dok je napon elektrohemijškog detektora iznosio 0,55 V. Za analizu i ekstrakciju rezultata korišćeni su softver Empower 2 (Waters® Empower™ 2, 720001257EN, Francuska) i metoda standardne krive.

3.5.2. Određivanje koncentracije serotonina u serumu eksperimentalnih životinja metodom HPLC

Kvantifikacija serotonina u serumu izvršena je nakon precipitacije proteina, primenom HPLC-ECD metode. Prilikom precipitacije proteina, pomešano je 100 µL uzorka plazme i 100 µL originalnog reagensa za precipitaciju, potom je dodato 20 µL rastvora internog standarda (N-metilserotonin) i usledilo je centrifugiranje (3000 g, 10 min). Nakon toga, izdvojen je supernatant i po 20 µL je injektovano u HPLC sistem. Komponente HPLC sistema su: HPLC autosampler (AS 100 Bio-Rad, Stokholm, Švedska), HPLC pumpa (Bio-Rad 1350 T, Stokholm, Švedska) i elektrohemijški-amperometrijski detektor (Bio-Rad 1640, Stokholm, Švedska). Prilikom analize, sledeći parametri su bili od značaja: protok mobilne faze (1 mL/min), radni potencijal (0,75 V) i osetljivost elektrohemijškog detektora (20 nA/V). Svi navedeni reagensi i HPLC kolona ulaze u sastav originalnog kita za određivanje serotonina (Recipe, kat. br. 7000, Minhen, Nemačka). U skladu sa zahtevima, linearnost metode iznosi 1–1000 µg/L, intra-esej koeficijent varijacije 3% i inter-esej koeficijent varijacije 4%. Analiza i ekstrakcija rezultata izvršeni su korišćenjem softvera Chrom-Line 4.20 (Bio-Rad, SAD) i metode standardne krive.

3.6. Određivanje kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja metodom tečne hromatografije-elektrosprej jonizacije-tandem masene spektrometrije

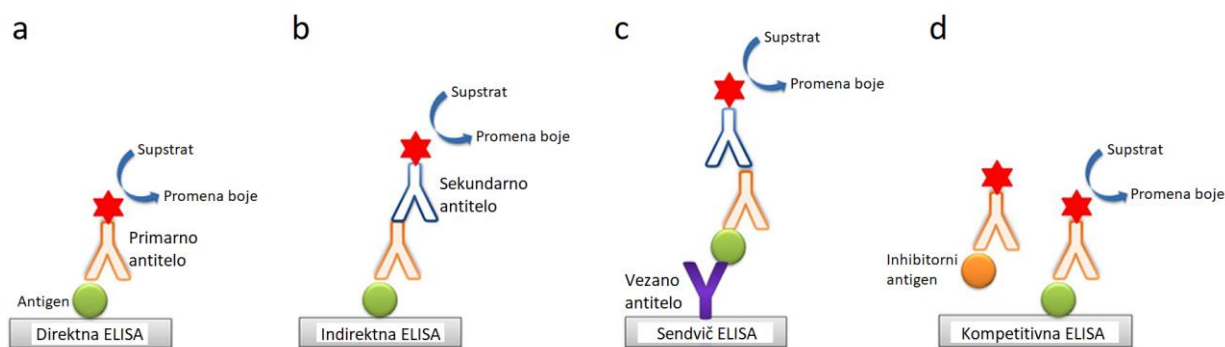
Koncentracija kortikosterona određivana je u uzorcima plazme, nakon centrifugiranja, primenom metode tečne hromatografije-elektrosprej jonizacije-tandem masene spektrometrije (Liquid chromatography-Electrospray Ionisation-Tandem mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS). Zapremina uzorka koja je korišćena prilikom analize iznosila je 250 μ L. Nakon odvajanja, u supernatant je dodat deksametazon, kao interni standard i izvršeno je nanošenje na prethodno kondicionirane kolone (SPE; solid phase extraction column: SOLA 10 mg/mL, Thermo Scientific, kat. br. 60109-001, SAD). Kondicioniranje kolona podrazumevalo je ispiranje, najpre pomoću 1 mL metanola (Sigma Aldrich, kat. br. 34885, SAD), a potom sa 2 mL destilovane vode. Nakon nanošenja uzoraka na kolone, usledilo je ispiranje destilovanom vodom (2 mL) i eluiranje metanolom (1 mL). Pripremljeni su radni rastvori, rastvaranjem kortikosterona i deksametazona u metanolu do koncentracija 500 μ g/mL i 10 μ g/mL, redom. Potom su, u cilju konstruisanja kalibracione krive, radni rastvori razblaženi do finalnih koncentracija: 50 ng/mL, 100 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 750 ng/mL i 1000 ng/mL kortikosterona, u plazmi iz koje je prethodno izvršena ekstrakcija kortikosterona po metodi Wong-a i saradnika (1994). Prilikom analize kortikosterona, korišćen je sistem sa HPLC pumpom (Accela 3000, Thermo Scientific, SAD) uparen sa trostrukim kvadripolnim masenim detektorom (TQS Quantum Access Max, Thermo Scientific, SAD) sa jonizacijom zagrejanim elektrosprejom (eng. heated electrospray ionization, HESI). Tokom rada, sledeći parametri su bili podešeni: za kortikosteron 346,96 \rightarrow 121,04; koliziona energija CE=22 V, 346,96 \rightarrow 328,82, CE=15 V; dok su za deksametazon 393,02 \rightarrow 355,05 i CE=10 V. Pored toga, korišćena je kolona (Xterra MS C18 3,5 μ m, 2,1 \times 150 mm; Waters, S.A.S., kat. br. 186000408, Francuska), čija je temperatura bila podešena na 30 $^{\circ}$ C. Komponente mobilne faze bile su: acetonitril (Sigma Aldrich, kat. br. 34967, SAD) i 0,1% rastvor mravlje kiseline u vodi (50:50), dok je protok iznosio 300 μ L/min. Prilikom analize, parametri masenog detektora bili su podešeni na sledeći način: napon spreja, 4500 V; temperatura uparivača, 400 $^{\circ}$ C; pritisak linearnog protoka gasa nosača, 50 arbitražnih jedinica; pritisak cirkularnog protoka gasa nosača, 40 arbitražnih jedinica i temperatura kapilare, 300 $^{\circ}$ C.

3.7. Određivanje koncentracije ACTH u plazmi eksperimentalnih životinja ELISA metodom

Nivo adrenokortikotropnog hormona u plazmi meren je primenom kompetitivne imunoenzimske- ELISA metode, uz upotrebu komercijalno dostupnog kita (USCN Life Science Inc., kat. br. CEA836Ra, Kina). Esej se zasniva na primeni kompetitivne inhibicije i koriste se ELISA ploče obložene monoklonskim anti-ACTH antitelom. Reakcija kompetitivne inhibicije se odvija između molekula ACTH obeleženog biotinom i neobeleženog ACTH (rastvori standarda i uzorci), koji se vezuju za specifično antitelo kojim je obložena ploča. Nakon inkubacije, nevezani konjugat se ispiranjem uklanja iz bunarića i potom, inkubacijom sa peroksidazom rena konjugovanom sa avidinom i dodatkom supstrata za HRP razvija se boja. Količina vezanog konjugovanog HRP, kao i intenzitet boje, obrnuto su proporcionalni koncentraciji ACTH u uzorku.

Prilikom analize korišćena je zapremina od 50 μ L uzorka i u skladu sa preporukom proizvođača, uzorci plazme su najpre razblaženi 10 puta pomoću 0,01 mol/L fosfatnog pufera (PBS; pH=7.0). U cilju konstruisanja kalibracione krive pripremljeni su rastvori standarda i Standard Diluent reagensa, sledećih koncentracija: 100 pg/mL, 33,33 pg/mL, 11,11 pg/mL, 3,70 pg/mL, 1,23

pg/mL, i pri tom kao slepa proba je korišćen Standard Diluent (0 pg/mL). U skladu sa protokolom, dodato je po 50 μ L rastvora standarda, slepe probe i uzorka u odgovarajuće bunariće ELISA ploče i odmah nakon toga po 50 μ L reagensa za detekciju A (Detection Reagent A) u svaki bunarić. Usledila je inkubacija u trajanju od 1 h na temperaturi od 37 °C i uz blago mešanje na šejkeru. Nakon inkubacije, aspiriran je rastvor iz svakog bunarića korišćenjem multikanalne pipete, što je bilo praćeno ispiranjem (4x) pomoću 350 μ L reagensa za ispiranje (1X Wash Solution). Potom je dodato po 100 μ L reagensa za detekciju B (Detection Reagent B) u svaki bunarić i ploča je inkubirana na 37 °C, tokom 30 min. Rastvor iz bunarića je zatim aspiriran i izvršeno je ispiranje (5x) korišćenjem 350 μ L reagensa za ispiranje. Nakon toga, dodato je po 90 μ L 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) hromogen supstrata za HRP (Substrate Solution) u svaki bunarić i usledila je inkubacija u mraku, na temperaturi od 37 °C. Razvila se plava boja i reakcija je prekinuta nakon 10 do 20 min dodatkom 50 μ L Stop Solution reagensa. Odmah potom, apsorbancija je očitana na 450 nm korišćenjem ELISA čitača (LKB 5060-006; LKB Instruments Vertriebs GmbH, Beč, Austrija). U skladu sa zahtevima proizvođača, osetljivost imunoeseja iznosi 0,67 pg/mL, opseg određivanja je 1,23-100 pg/mL, intra-esej koeficijent varijacije je < 10%, dok je inter-esej koeficijent varijacije < 12%.

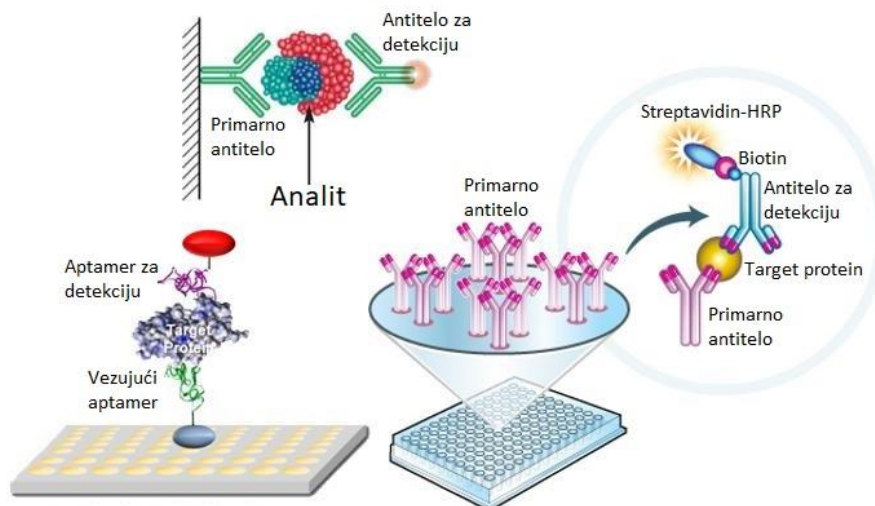


Slika 13. Shematski prikaz različitih vrsta ELISA imunoeseja. (a) Direktna ELISA; (b) Indirektna ELISA; (c) Sendvič ELISA; (d) Kompetitivna ELISA metoda (preuzeto iz reference Fatin i sar., 2016).

3.8. Određivanje koncentracije IL-6 u plazmi eksperimentalnih životinja primenom ELISA metode

Prilikom analize koncentracije citokina IL-6, primenom direktne sendvič ELISA (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) metode, korišćen je komercijalno dostupan kit (Invitrogen, kat. br. KRC0061, Karlsbad, SAD). Uzorci plazme (120 μ L) su najpre razblaženi uz pomoć 120 μ L standardnog pufera za razblaživanje (Standard Diluent Buffer). Nakon toga, multikanalnom pipetom je pipetirano po 50 μ L pufera za inkubaciju (Incubation Buffer) u svaki bazenčić ELISA ploče, potom je dodato po 100 μ L standarda, kontrola ili pripremljenih uzoraka u odgovarajuće bazenčiće i usledila je inkubacija u trajanju od 2 h na 37 °C, uz blago mešanje na šejkeru. Svaki naredni korak bio je praćen ispiranjem (4x) bazenčića puferom za ispiranje (Working Wash Buffer). Usledila je inkubacija sa biotinizovanim anti-IL-6 antitelom (100 μ L Rt IL-6 Biotin Conjugate), tokom 90 min na sobnoj temperaturi i uz blago mešanje na šejkeru. Potom je dodato po 100 μ L peroksidaze rena konjugovane sa streptavidinom (Streptavidin-HRP Working Solution) u svaki bazenčić i inkubirano 30 min na sobnoj temperaturi, uz mešanje na šejkeru. Na kraju je dodato po 100 μ L hromogena (Stabilized Chromogen) u svaki bazenčić i ELISA ploča je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi, u mraku. Prilikom razvijanja reakcije pojavljuje se plava boja i reakcija se prekida dodavanjem po 100 μ L Stop Solution reagensa u svaki bazenčić, uz blago mućkanje. Apsorbancija je očitana na LKB 5060-006 ELISA čitaču (LKB Instruments Vertriebs GmbH, Beč,

Austrija) na talasnoj dužini od 450 nm. Kao slepa proba korišćena je smeša hromogena (100 µL) i Stop Solution reagensa (100 µL). Kalibraciona kriva je konstruisana korišćenjem razblaženja pacovskog IL-6 standarda, sledećih koncentracija: 750 pg/mL, 375 pg/mL, 187,5 pg/mL, 93,8 pg/mL, 46,9 pg/mL i 23,5 pg/mL. Osetljivost metode je 5 pg/mL, opseg određivanja iznosi 23,5–1500 pg/mL, inter-esej koeficijent varijacije je 6,9% i intra-esej koeficijent varijacije je 3,9%.



Slika 14. Shematski prikaz direktne sendvič ELISA metode. Prilikom izvođenja metode, koristi se ELISA ploča obložena specifičnim antitelom za koje se vezuje protein koji se određuje u uzorku. Nakon toga, primenjuje se antitelo za detekciju koje se takođe vezuje za protein od značaja. Nakon dodavanja biotina i streptavidina konjugovanog sa peroksidazom rena (Streptavidin-HRP), u prisustvu hromogena (supstrata za enzim) razvija se reakcija (preuzeto sa <https://www.creative-diagnostics.com/CD-ELISA-matched-Pair-Development.htm>)

3.9. Imunohistohemijska analiza parametara neurogeneze u hipokampusu

Promene u ekspresiji parametara neurogeneze- nuklearnog faktora Ki-67 i neurotrofina BDNF, u hipokampusu, praćene su primenom imunohistohemijske metode. Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja, usledilo je izolovanje hipokampusa i fiksacija tkiva u 3,6% rastvoru formalina, u koji je prethodno dodat fosfatni pufer. Potom, nakon mesec dana provedenih u formalinu, primenom serije alkohola rastućih koncentracija (60%, 70%, 80%, 90%, 96% i 100% etanol) sprovedena je dehidracija tkiva. Na kraju, tkivo je kalupljeno u parafinu (Paraplast, Sigma Aldrich, kat. br. P3558, SAD) i za dalju imunohistohemijsku analizu pripremljeni su koronalni preseki moždanog tkiva kroz čitavu rostrokaudalnu regiju hipokampusa. Serijskim sečenjem tkiva na rotacionom mikrotomu, Leica RM2135 (Leica, Nemačka), dobijeni su parafinski preseki debljine 5 µm. Usledila je deparafinizacija i rehidracija tkiva, sprovođenjem kroz ksilol (3 x 5 min) i seriju alkohola opadajućih koncentracija (2 x 100%, 96% i 70% etanol, pri čemu je u svakom tkivo provelo 5 min). Nakon ispiranja destilovanom vodom, u cilju demaskiranja epitopa preseci su inkubirani u mikrotalasnoj pećnici (700 W) u 10 mM citratnom puferu (pH=6), tokom 21 min. Potom su preseci hlađeni pod blagim mlazom vode (vodeći računa da mlaz nije usmeren direktno na tkivo) i ispirani pomoću fosfatnog pufera (eng. phosphate-buffered saline, PBS; pH=7; 3 x 5 min). U cilju inhibicije aktivnosti endogene peroksidaze, tkivni preseci su inkubirani u vlažnoj komori sa 3% rastvorom vodonik peroksida (H₂O₂), u trajanju od 10 min. Svaka naredna inkubacija bila je praćena ispiranjem tkivnih preparata korišćenjem PBS (3 x 5 min). U sledećem koraku

izvršena je inhibicija nespecifičnog vezivanja, inkubacijom tkivnih preseka sa Ultra V Block (Thermo Scientific™ Lab Vision™) reagensom, u trajanju od 10 min u vlažnoj komori. Usledila je inkubacija preseka hipokampusa sa primarnim antitelom: zečjim poliklonskim anti-Ki-67 (1:3500, Abcam, kat. br. ab15580, Velika Britanija) i zečjim poliklonskim anti-BDNF (1: 1300, Abcam, kat. br. ab72439, Velika Britanija) antitelom, u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi. Nakon 24 h, usledilo je ispiranje preseka pomoću PBS i inkubacija u trajanju od 15 min sa biotiniziranim sekundarnim antitelom. Potom su preseci inkubirani sa streptavidinom konjugovanim sa peroksidazom rena (Lab Vision™ UltraVision™ LP Detection System, Thermo Fisher Scientific, kat. br. TL-060-HD, SAD), na sobnoj temperaturi, tokom 20 min. Nakon toga, u cilju vizualizacije, preseci hipokampusa su inkubirani na sobnoj temperaturi sa hromogenom 3,3'-diaminobenzidinom (DAB, Peroxidase Detection System, kat. br. RE7120-K, Novocastra, Velika Britanija), u trajanju od 4 min. Reakcija je praćena pod svetlosnim mikroskopom i okončana uranjanjem pločica sa presecima u destilovanu vodu. Sprovedeno je kontrastno bojenje preseka Mayer-ovim hematoksilinom (Sigma Aldrich, kat. br. MHS1, SAD), ispiranje destilovanom vodom i dehidracija tkiva kroz seriju alkohola rastućih koncentracija (70%, 96%, 2 x 100% etanol, pri čemu je u svakom tkivo provelo 5 min) i ksilol (3 x 5 min). Na kraju, na tkivo je nanet medijum DPX Mountant for histology (Sigma Aldrich, kat. br. 06522, SAD) i preko njega je postavljena pokrovnica ljustica.

Analiza preparata i određivanje ekspresije Ki-67 i BDNF, izvršeni su korišćenjem svetlosnog mikroskopa Olympus BX 50 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Nemačka), opremljenog digitalnom kamerom (SonyPower HAD 3CCD, Tokio, Japan) i softverom MicroImage, Ver. 4.0. (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemačka). Broj Ki-67, kao i BDNF imunopozitivnih ćelija, određivan je pod uveličanjem 400 \times , u subgranularnom i granularnom sloju ćelija, duž čitave regije dentatnog girusa. Dobijeni rezultati, odnosno broj imunopozitivnih neurona izražen je po površini vidnog polja koja iznosi 0,07 mm². Ki-67 je nuklearni faktor i pokazuje jedarnu ekspresiju, dok BDNF ispoljava citoplazmatsku ekspresiju.

3.10. Određivanje biometala u prefrontalnom korteksu eksperimentalnih životinja metodom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije

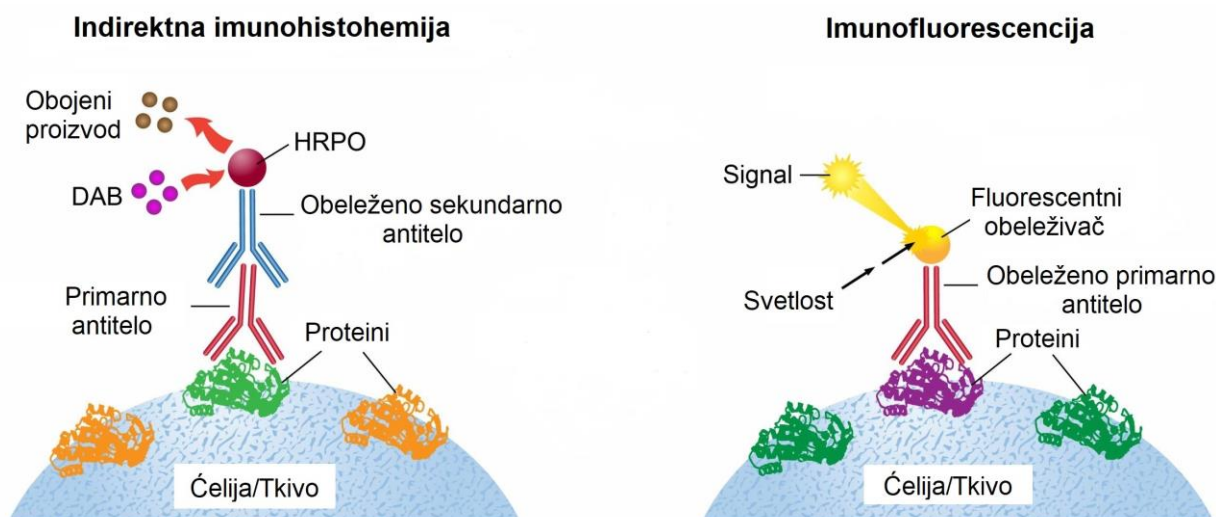
Nakon žrtvovanja, izolovan je prefrontalni korteks eksperimentalnih životinja (5,7–2,7 mm u odnosu na bregmu) u cilju određivanja sadržaja bioelemenata (Mg, Fe, Zn i Cu). Priprema uzoraka za merenje koncentracije metala izvršena je digestijom tkiva vlažnim putem, korišćenjem koncentrovanih kiselina, nitratne (HNO₃) i perhlorne (HClO₄) (Merck, Darmštad, Nemačka) u odnosu 4:1. Koncentrovane HNO₃ i HClO₄ su bile analitičkog stepena čistoće i razaranje tkiva je praćeno zagrevanjem na pešćanom kupatilu. Nakon mineralizacije, uzorci su razblaženi pomoću 0,1 mol/L HNO₃ i koncentracije ispitivanih bioelemenata u tkivu su određene metodom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije na aparatu GBC 932AA (Dandenong, Australija). Prilikom analize korišćena je oksidaciona vrsta plamena, acetilen-vazduh. Referentni uzorci iz Nacionalnog biroa standarda (NIST SRM 1577a goveđa jetra, National Institute of Standards and Technology, MD, SAD) su korišćeni za validaciju tačnosti metode. Radni uslovi na atomskom apsorpcionom spektrofotometru bili su sledeći:

- Struja lampe: 4 mA (Mg); 5 mA (Fe); 5 mA (Zn); 3 mA (Cu)
- Talasna dužina: 285,2 nm (Mg); 248 nm (Fe); 213,9 nm (Zn); 324,7 nm (Cu)
- Širina otvora: 0,7 mm (Mg); 0,2 mm (Fe); 0,2 mm (Zn); 0,2 mm (Cu).

3.11. Imunohistohemijska analiza ekspresije parametara proliferacije i anti-apoptotskog markera Bcl-2 u miokardu

Nakon žrtvovanja eksperimentalnih životinja, izolovano je srce i za dalju analizu su korišćeni poprečni preseći u predelu vrha i baze srca, uključujući i slobodni zid leve komore. Tkivo je fiksirano postupkom imerzije, u 4% formalinu, u koji je prethodno dodat fosfatni puffer (pH=7). Nakon 5 dana provedenih u formalinu, tkivo je podvrgnuto procesu dehidracije kroz seriju alkohola rastućih koncentracija (u 70% i 96% etanolu po 24 h, potom u 100% alkoholu 2 x 1h), potom je prebačeno u ksilol i na kraju kalupljeno u parafinu (Paraplast, Sigma Aldrich, kat. br. P3558, SAD). Za dalju imunohistohemijsku analizu, korišćenjem rotacionog mikrotoma, Leica RM2135 (Leica, Nemačka), pripremljeni su parafinski preseći tkiva, debljine 4 µm. Sledeći korak podrazumevao je deparafinizaciju, a potom rehidraciju tkiva, sprovođenjem preseka kroz ksilol (3 x 5 min) i seriju alkohola opadajućih koncentracija (2 x 100%, 2 x 96% i 1 x 70% etanol, pri čemu je u svakom tkivo provelo 5 min). Usledilo je ispiranje destilovanom vodom i demaskiranje epitopa pod uticajem toplote, inkubacijom tkivnih preseka u 10 mM citratnom puferu (pH=6) u trajanju od 21 min u mikrotalasnoj pećnici (700 W). Nakon hlađenja preseka (pod blagim mlazom vode i pri tom vodeći računa da mlaz nije usmeren direktno na tkivo, 20-30 min) i ispiranja korišćenjem PBS (pH=7; 2 x 5 min), inhibirana je aktivnost endogene peroksidaze inkubacijom tkivnih preparata sa 3% rastvorom H₂O₂ (10 min u vlažnoj komori). Svaka inkubacija koja je usledila bila je praćena ispiranjem tkivnih preseka korišćenjem PBS (2 x 5 min). U cilju inhibicije nespecifičnog vezivanja, odnosno bojenja, preseći su inkubirani sa komercijalnim Dual Endogenous Enzyme Block reagensom (Dako, kat. br. S2003, Danska) u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min. Usledila je inkubacija tkivnih preparata sa odgovarajućim primarnim antitelom: zečjim monoklonskim anti-Ki-67 (1:50, Thermo Fisher Scientific, kat. br. MA5-14520, SAD), mišjim monoklonskim anti-PCNA (1:200, Thermo Fisher, kat. br. MS-106-P1, SAD) i mišjim monoklonskim anti-Bcl-2 (1:50, Thermo Fisher, kat. br. MA5-11757, SAD), tokom noći, u vlažnoj komori i na sobnoj temperaturi. Nakon 24 h, preseći su podvrgnuti ispiranju pomoću PBS (4 x 5 min), a potom inkubaciji sa polimerom koji je obeležen peroksidazom rena (eng. horseradish peroxidase, HRP) i konjugovan sa sekundarnim antitelom (EnVision™+Dual Link System-HRP, Dako, kat. br. K4063, Danska), na sobnoj temperaturi, u trajanju od 20 min. Prilikom vizualizacije imunopozitivnih ćelija miokarda, primenjen je DAB (Peroxidase Detection System, kat. br. RE 7120-K, Novocastra, Velika Britanija) u trajanju od 1 do 3 min. Reakcija je praćena pod svetlosnim mikroskopom i prekidana po pojavi specifičnog braon bojenja uranjanjem mikroskopskih pločica u destilovanu vodu. Na kraju je sprovedeno kontrastno bojenje tkivnih preseka Mayer-ovim hematoksilinom (Sigma Aldrich, kat. br. 1092490500, MHS1, SAD), ispiranje destilovanom vodom i dehidracija tkiva kroz seriju alkohola rastućih koncentracija (70%, 96%, 2 x 100% etanol, pri čemu je u svakom tkivo provelo 5 min) i ksilol (3 x 5 min). Potom, na tkivo je naneta kap medijuma DPX (DPX Mountant for histology, Sigma Aldrich, kat. br. 06522, SAD) i postavljena je pokrovna ljustica.

Analiza ekspresije markera proliferacije i anti-apoptotskog proteina praćena je u kardiomiocitima, srčanim fibroblastima i vaskularnim endotelnim ćelijama miokarda. Prilikom određivanja broja imunopozitivnih ćelija korišćen je svetlosni mikroskop Olympus BX 50 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Nemačka) i softver MicroImage, Ver. 4.0. (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemačka). Analiziran je jedan tkivni presek po životinji i 14 mikroskopskih polja po preseku, pri čemu površina vidnog polja iznosi 0,07 mm² (uveličanje 400×).



Slika 15. Ilustracija indirektno imunohistohemijske i direktne imunofluorescentne metode. (A) Princip indirektno imunohistohemije zasniva se na korišćenju primarnog antitela koje se specifično vezuje za antigen i potom, sekundarnog antitela konjugovanog sa peroksidazom rena (HRP). Reakcija se razvija nakon dodavanja hromogena- 3,3'-diaminobenzidina (DAB), pri čemu se formira obojeni proizvod. (B) Prilikom izvođenja direktne imunofluorescentne metode primenjuje se antitelo specifično za antigen obeleženo fluorohromom (*preuzeto sa: <https://www.leinco.com/immunohistochemistry/>*).

3.12. Određivanje dijametra kardiomiocita i praćenje intersticijalne fibroze miokarda kod eksperimentalnih životinja

U cilju ispitivanja promena u arhitekturi miokarda, izvršena je vizualizacija argentafilenih retikulinskih vlakana u srcu primenom retikulina kontrastnoga krita (Biognost, kat. br. RET-100T, Zagreb, Hrvatska), prema metodi koju su uveli Gordon i Sweets. Detekcija i analiza argentafilenih retikulinskih vlakana izvršena je na parafinskim presecima (debljine 4 μm) tkiva miokarda, koji su fiksirani i ukalupljeni na prethodno opisan način. Nakon toga, sprovedena je deparafinizacija u ksilolu (3 x 2 min) i rehidracija tkiva izlaganjem preseka seriji alkohola opadajućih koncentracija (2 x 100%, 2 x 95% i 1 x 70% etanol, i u svakom je tkivo provelo 5 min). Usledilo je ispiranje preseka destilovanom vodom i potom oksidacija u prisustvu 0,5% kalijum permanganata (KMnO_4). Svaki naredni korak bio je praćen ispiranjem destilovanom vodom. Tkivni preseci su prebačeni u 1% rastvor oksalne kiseline, zatim u rastvor amonijum gvožđe sulfata i potom tretirani rastvorom srebra i amonijaka. Srebro se taloži na retikulinskim vlaknima tkivnih preseka, formirajući pritom smeđe prebojen talog. Nakon toga, preseci su tretirani 4% formaldehidom, kao redukujućim sredstvom koje ubrzava reakciju, i potom izloženi 0,2% rastvoru hlorida zlata. Primenom natrijum tiosulfata uklonjeno je nevezano srebro. Na kraju, tkivni preseci su tretirani kontrastnom bojom (Nuclear Fast Red) koja ulazi u sastav komercijalnog krita, izvršena je dehidracija tkiva korišćenjem serije alkohola rastućih koncentracija (70%, 95%, 2 x 100% etanol, i u svakom je tkivo provelo 5 min) i ksilola (3 x 5 min), na preseke je nanet medijum DPX (DPX Mountant for histology, Sigma Aldrich, kat. br. 06522, SAD) i postavljene su pokrovne ljušpice. Vizualizacija retikulinskih vlakana (kolagena vlakna tip 3), opisanom metodom, sprovedena je u svrhu određivanja dijametra kardiomiocita, ali i količine endomizijalnog vezivnog tkiva u srcu eksperimentalnih životinja. Na dobijenim tkivnim presecima izvršeno je merenje transnuklearnog dijametra longitudinalno orijentisanih kardiomiocita i određivanja površine retikulinskih vlakana u intersticijumu, indikativna za razvoj intersticijalne fibroze miokarda. Prilikom ispitivanja navedenih parametara korišćen je svetlosni mikroskop Olympus BX 50 i računarski softver

MicroImage, Ver. 4.0. Za svaku eksperimentalnu životinju analiziran je po jedan tkivni preparat i pomenuti parametri određivani su na 100 nasumično odabranih ćelija po preparatu (uveličanje 400×). Površina retikulinskih vlakana, kao pokazatelj sadržaja deponovanog kolagena u srcu, izmerena je povlačenjem kontura oko kardiomiocita, na prethodno generisanim fotomikrografijama uz primenu MicroImage, Ver. 4.0 softvera.

3.13. Određivanje vijabilnosti kardiomiocita u ćelijskim kulturama

U cilju određivanja vijabilnosti ćelija, izvršena je kvantifikacija adenozin-trifosfata (eng. adenosine triphosphate, ATP) u pojedinačnim sferoidima humanih kardiomiocita. Smatra se da je ATP marker vijabilnosti, jer upućuje na prisustvo metabolički aktivnih ćelija. Prilikom analize nivoa ATP korišćen je komercijalno dostupan kit pod nazivom CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, kat. br. G7571, Švedska). Prvi korak predstavlja priprema radnog reagensa, koja podrazumeva rekonstituisanje liofiliziranog supstrata (CellTiter-Glo® Substrate) uz pomoć pufera (CellTiter-Glo® Buffer). Potom, korišćenjem elektronske multikanalne pipete aspirirano je 80 µL medijuma iz svakog bunarića ULA ploče i dodato po 25 µL radnog reagensa u svaki. Nakon toga, ploče su postavljene na kratko na šejker (15 sec), a zatim su prebačene u inkubator (37 °C, 20 min). Luminescencija je očitana na instrumentu MicroBeta2 LumiJET Microplate Reader (PerkinElmer, SAD) i signal je direktno proporcionalan količini ATP. Princip eseja se zasniva na reakciji u kojoj termostabilna luciferaza u prisustvu ATP konvertuje luciferin u oksiluciferin, pri čemu se emituje svetlo. Prilikom kvantifikacije ATP opisanom metodom, svaki korak se izvodi u mraku.

3.14. Određivanje kaspaze 3 u sferoidima humanih kardiomiocita

Prilikom određivanja aktivnosti kaspaze 3 korišćen je komercijalno dostupan kit pod nazivom Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, kat. br. G8093, Švedska) i luminescencija je merena na aparatu MicroBeta2 LumiJET Microplate Reader (PerkinElmer, SAD). Najpre je pripremljen radni reagens rekonstituisanjem liofiliziranog supstrata (Caspase-Glo® 3/7 Substrate) uz pomoć komercijalnog pufera (Caspase-Glo® 3/7 Buffer). Potom je aspirirano po 80 µL medijuma za ćelijske kulture iz svakog bunarića ULA ploče i dodato je po 25 µL radnog reagensa u svaki. ULA ploče su postavljene na šejker (15 sec), zatim prebačene u inkubator (37 °C, 30 min) i na kraju je izmerena luminescencija. Reakcije su izvođene u mraku i princip je zasnovan na konverziji proluciferina posredovanoj kaspazom 3 u aminoluciferin, supstrat za luciferazu u reakciji u kojoj se oslobađa svetlost. Intenzitet luminescencije je direktno proporcionalan aktivnosti kaspaze 3. Sferoidi kardiomiocita tretirani 1 µM rastvorom staurosporina (Sigma Aldrich, kat. br. S6942, Švedska), tokom 24 h, korišćeni su kao pozitivna kontrola. Naime, staurosporin je alkaloid izolovan iz *Streptomyces staurosporeus* i poznato je njegovo svojstvo potentnog, neselektivnog inhibitora protein kinaza i indukcije apoptoze.

3.15. Imunohistohemijska analiza sferoida kardiomiocita

Nakon ekstrakcije sferoida kardiomiocita (8 sferoida po tretmanu), usledila je fiksacija u 4% formaldehidu tokom 24 h, na temperaturi od 4 °C. Sutradan, nakon ispiranja korišćenjem PBS, izvršen je transfer sferoida u sveže pripremljen 30% rastvor saharoze. Sledeći korak podrazumevao je smrzavanje uzoraka, korišćenjem izopropanola i suvog leda (-78 °C), i u prisustvu odgovarajućeg, komercijalno dostupnog matriksa Tissue-Tek OCT compound (Sakura, Holandija). Potom, za dalju analizu, na kriostatu (Microm HM 560 Cryostat, Thermo Scientific, SAD) su

načinjeni kriopreseki sferoida kardiomiocita debljine 8 μm . Prilikom imunohistohemijskog određivanja ekspresije strukturnih proteina sferoida korišćena su primarna antitela: zečje poliklonsko anti- α -aktinin (1:200, Abcam, kat. br. ab137346, Velika Britanija) i mišje monoklonsko anti-F-aktin (1:50, Abcam, kat. br. ab205, Velika Britanija). Inkubacija kriopreseka sa primarnim antitelima trajala je 24 h, u vlažnoj komori i na temperaturi od 4 $^{\circ}\text{C}$. Nakon toga, usledila je inkubacija sa sekundarnim antitelima: kozjim anti-zečjim Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen, kat. br. A27034, SAD) i magarećim anti-mišjim Alexa Fluor 555 (1:500, Invitrogen, kat. br. A-31570, SAD). Na kraju, na kriopreseke je nanet pokrovni medijum ProLong[®] Gold Antifade Mountant sa DAPI nuklearnom bojom (Thermo Fisher Scientific, kat. br. P36931, SAD) i fluorescencija je detektovana korišćenjem konfokalnog mikroskopa (Zeiss LSM710, Nemačka).

3.16. Izolacija RNK humanih kardiomiocita ćelijskih kultura i lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (Real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)

Metoda lančane reakcije polimerizacije (RT-PCR) primenjena je u cilju određivanja ekspresije gena koji kodiraju proteine od ključnog značaja za kontraktilnu funkciju kardiomiocita. Naime, analizirana je ekspresija *MYL2* (kodira regulatorni laki lanac miozina 2), *MYL7* (kodira atrijalni laki lanac miozina 2), kao i *PLN* (kodira fosfolamban, odnosno protein koji reguliše funkciju kalcijumove pumpe na sarkoplazmatskom retikulumu). Pored toga, praćena je ekspresija gena *NKX2.5* koji kodira transkripcioni faktor NK2 homeobox 5 protein, prisutan u periodu organogeneze i neophodan za razvoj srca. Na kraju, određivan je i *MKI67* koji kodira nuklearni protein Ki-67. Ekspresija svih navedenih gena normalizovana je u odnosu na *ACTB* (housekeeping gene) koji kodira beta aktin.

Tabela IV. Prikaz gena, uključujući i kataloške brojeve, čija je ekspresija određivana u istraživanju.

TaqMan esej	Kataloški broj (Thermo Fisher Scientific)
MYL2	Hs00166405_m1
MYL7	Hs01085598_g1
PLN	Hs01848144_s1
MKI67	Hs04260396_g1
NKX2.5	Hs00231763_m1
ACTB	Hs01060665_g1

3.16.1. Ekstrakcija RNK humanih kardiomiocita 2D i 3D ćelijskih kultura

U postupku ekstrakcije RNK korišćen je ZR-Duet[™] DNA/RNA MiniPrep kit (Zymo Research, kat. br. D7001, SAD). Nakon ekstrakcije ćelija, odnosno sferoida kardiomiocita (48-56 sferoida po tretmanu) i centrifugiranja uzoraka (250 \times g, 5 min), pažljivo je uklonjen medijum i dodato je 300 μL pufera za liziranje ćelija (DNA/RNA Lysis Buffer). Nakon resuspendovanja taloga u puferu, izvršen je transfer u SpinIIIIC kolone i centrifugiranje uzoraka (16 000 \times g, 1 min). DNK se selektivno vezuje za kolonu, dok RNK prolazi u takozvanu Collection Tube u koju se potom dodaje 300 μL 99% etanola i nakon mešanja izvrši se transfer u SpinIIC kolonu i centrifugiranje (16 000 \times g, 1 min). Nakon toga, u kolonu se dodaje 400 μL DNA/RNA Prep Buffer reagensa i centrifugira (16 000 \times g, 1 min), zatim se kolona ispira korišćenjem 700 μL DNA/RNA

Wash Buffer reagensa i ponovo centrifugira (16 000×g, 1 min). Sledi novo ispiranje uz pomoć DNA/RNA Wash Buffer reagensa (400 µL), centrifugiranje (16 000×g, 2 min) i transfer kolone u novu ependorficu. Potom je dodato 25 µL vode oslobođene DNAza u matriks kolone, inkubirano na sobnoj temperaturi 1 min i centrifugirano (10 000×g, 1 min). Uzorci su zatim prebačeni na led, koncentracija RNK je merena na NanoDrop spektrofotometrijskom uređaju (Thermo Scientific, SAD) i apsorbancija je očitavana na 260 nm.

3.16.2. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Reverzna transkripcija RNK u cDNK izvršena je korišćenjem SuperScript III reverse transcriptase kita (Thermo Fisher Scientific, kat. br. 18080044, SAD). Najpre su pripremljene smeše Mastermix A čije su komponente uzorak, Oligo(dt)20 (50 µM) prajmer i rastvor deoksinukleotid trifosfata (10 mM dNTP Mix). Mastermix A je pripremljen tako da njegova ukupna zapremina (13 µL) sadrži 500 ng RNK. Usledila je inkubacija na temperaturi od 65 °C u trajanju od 5 min i hlađenje na ledu najmanje 1 min. U međuvremenu je pripremljena smeša Mastermix B koja sadrži sledeće komponente: 5X first-strand buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 0,1 M DTT (1,4-ditiotreitol), RNaseOUT 40 u/µL (rekombinantni inhibitor ribonukleaze) i Supertranscript III RT 200 U/µL (reverzna transkriptaza). Mastermix B je potom dodat u Mastermix A i nakon mešanja pipetiranjem, usledila je inkubacija na temperaturi od 50 °C u trajanju od 50 min. Uređaj koji je korišćen je GeneAMP PCR9700 (Thermo Fisher Scientific, SAD). Reakcija je okončana inkubacijom na temperaturi od 85 °C, tokom 5 min, uzorci su izvađeni, hlađeni na ledu i potom čuvani na -20 °C.

3.16.3. Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (RT-PCR)

Ekspresija relevantnih gena određivana je RT-PCR metodom korišćenjem TaqMan Universal PCR Master Mix kita (Thermo Fisher Scientific, SAD) i TaqMan proba (Thermo Fisher Scientific, SAD). Najpre su uzorci cDNK (20 µL) razblaženi vodom oslobođenom od DNAza (30 µL). Potom je pripremljen master mix, u čiji sastav su ulazile sledeće komponente: 2x Taqman mastermix, 20x probe i voda. Master mix je nanošen na PCR ploču (po 8 µL u svaki bunarić), dodate su cDNK uzoraka (po 2 µL u svaki bunarić), ploče su pokrivene i centrifugirane (1000 rpm, 1 min). PCR reakcija je izvođena na Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, SAD) uređaju, po sledećem protokolu: 10 min na 95 °C, praćeno sa 40 ciklusa na 95 °C po 15 s i na 60 °C po 1 min. Reakciona zapremina je iznosila 20 µL i uzorci su rađeni u duplikatu. Prilikom analize rezultata korišćena je $\Delta\Delta C_t$ metoda.

3.17. Statistička obrada rezultata

U prvoj eksperimentalnoj fazi vrednosti parametara iz bihejvioralnih testova, telesna masa životinja, apsolutna i relativna masa nadbubrežnih žlezda, kao i rezultati imunohistohemijskog određivanja ekspresije BDNF i Ki-67 u hipokampusu, analizirani su dvofaktorskom ANOVOM, gde su faktori bili tretmani: ACTH i Mg. Koncentracije hormona i citokina IL-6 u plazmi, bez i sa izlaganjem akutnom stresu indukovanim primenom FST, analizirane su trofaktorskom ANOVOM, gde su faktori bili tretmani- ACTH i Mg, kao i FST. U cilju ispitivanja zasebnih efekata faktora, svaka ANOVA je bila praćena *post hoc* procedurom višestrukog poređenja testom najmanje značajne razlike (LSD, Least Significant Difference).

U drugom setu eksperimenata analiza razlika u ekspresiji parametara proliferacije i fibroze u miokardu izvršena je primenom jednofaktorske ANOVA metode, praćene LSD testom. U cilju

poređenja koncentracija bioelemenata u prefrontalnom korteksu između različitih eksperimentalnih grupa, primenjena je dvofaktorska ANOVA metoda, gde su faktori bili tretmani: ACTH i Mg. Prilikom utvrđivanja veze između koncentracije bakra u prefrontalnom korteksu i nivoa noradrenalina u plazmi korišćena je Spirmanova korelacija.

U trećoj eksperimentalnoj fazi analiza vijabilnosti ćelija, kao i aktivnosti kaspaze 3, izvršena je primenom Studentovog t testa.

Prilikom statističke analize rezultata prve i druge eksperimentalne faze korišćen je softver PASW Statistics, verzija 18 (SAD), dok je za obradu podataka iz treće faze istraživanja primenjen Microsoft Excel 2010. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška (SEM) i u svim testovima su vrednosti $p < 0,05$ smatrane statistički značajnim.

4. REZULTATI

4.1. Prva eksperimentalna faza

4.1.1. Efekti primene ACTH i Mg na telesnu i masu nadbubrežne žlezde eksperimentalnih životinja

U modelu depresije, dugotrajna izloženost tretmanu sa adrenokortikotropnim hormonom je bila praćena smanjenjem telesne mase eksperimentalnih životinja, kao i hipertrofijom nadbubrežne žlezde. Prilikom analize rezultata primenom dvofaktorske ANOVA metode, otkriveno je da smanjenje telesne mase kao efekat tretmana adrenokortikotropnim hormonom, kao i interakcija između ACTH i Mg pokazuju statistički trend ($F_{52,1}=3,50$, $p=0,067$, $\eta^2=0,06$ i $F_{52,1}=3,61$, $p=0,063$, $\eta^2=0,06$, redom). Naime, primećeno je da se telesna masa mužjaka pacova ACTH grupe, nakon tretmana u trajanju od tri nedelje, značajno razlikovala u poređenju sa masom životinja iz kontrolne grupe ($p=0,010$; $d=1,25$). Sa druge strane, pokazano je da je peroralna primena Mg, u trajanju od 28 dana, inhibirala pomenuti efekat ACTH. Naime, životinje koje su bile podvrgnute kombinovanom tretmanu ACTH/Mg imale su značajno veću telesnu masu u poređenju sa ACTH grupom ($p=0,045$; $d=0,66$). Pored toga, hronična primena ACTH indukovala je promene u masi nadbubrežne žlezde, koje se ogledaju u povećanju apsolutne i relativne mase ($F_{51,1}=17,84$, $p=0,000$, $\eta^2=0,26$ i $F_{51,1}=10,23$, $p=0,002$, $\eta^2=0,17$, redom), odnosno hipertrofiji adrenalne žlezde. Naime, povećanje relativne mase nadbubrežne žlezde primećeno je u ACTH grupi u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,025$; $d=0,94$), ali i kod životinja izloženih kombinovanom tretmanu sa ACTH/Mg u poređenju sa Mg grupom ($p=0,001$; $d=1,33$). Takođe, kod životinja iz ACTH/Mg grupe uočeno je i povećanje apsolutne mase nadbubrežne žlezde, u odnosu na Mg grupu ($p=0,001$; $d=1,14$). Svi pomenuti rezultati, odnosno uticaj različitih tretmana na telesnu i masu nadbubrežne žlezde životinja, prikazani su u Tabeli V.

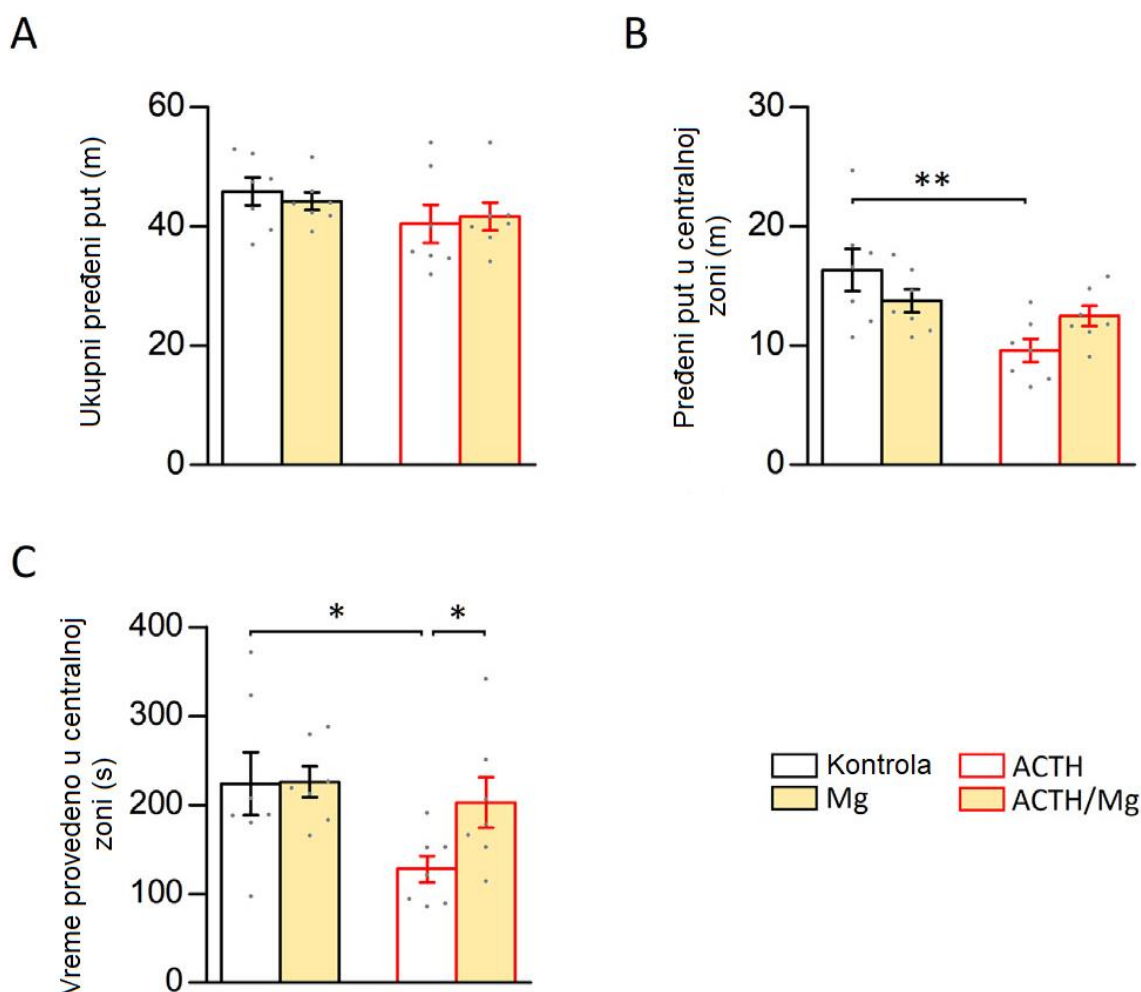
Tabela V. Uticaj hronične primene ACTH i Mg na telesnu masu, apsolutnu i relativnu masu nadbubrežne žlezde mužjaka pacova. Rezultati su analizirani primenom dvofaktorske ANOVA metode i predstavljeni su kao srednja vrednost \pm SEM. * ($p<0,05$) i ** ($p<0,01$), u poređenju sa Kontrolom (a), Mg (b) i ACTH grupom (c).

Parametar	Kontrola	Mg	ACTH	ACTH/Mg
Telesna masa (g)	455,36 \pm 10,16	445 \pm 7,98	411,93 \pm 8,4 ^{*(a)}	445,36 \pm 17,12 ^{*(c)}
Masa nadbubrežne žlezde (mg)	30,06 \pm 2,33	26,25 \pm 2,65	34,79 \pm 2,53	39,43 \pm 3,48 ^{** (b)}
Relativna masa nadbubrežne žlezde	0,066 \pm 0,005	0,059 \pm 0,006	0,084 \pm 0,006 ^{*(a)}	0,087 \pm 0,005 ^{** (b)}

4.1.2. Uticaj hronične primene magnezijuma na promene u ponašanju životinja u modelu depresije rezistentne na primenu tricikličnih antidepresiva

4.1.2.1. Ponašanje eksperimentalnih životinja u testu otvorenog polja (eng. Open field test, OFT)

Primena testa otvorenog polja imala je za cilj ispitivanje proanksiogenog dejstva adrenokortikotropnog hormona, kao i uticaja hronične primene magnezijuma na ponašanje eksperimentalnih životinja. Naime, dvofaktorska ANOVA je pokazala da ni Mg, ni ACTH, kao ni njihova kombinovana primena nisu ispoljili značajne efekte na ukupan pređeni put životinja u testu otvorenog polja ($F_{24,1}=0,01$, $p=0,930$, $\eta^2=0,00$; $F_{24,1}=2,73$, $p=0,112$, $\eta^2=0,10$ i $F_{24,1}=0,35$, $p=0,558$, $\eta^2=0,01$, redom), što upućuje da tretmani nisu uticali na lokomotornu aktivnost pacova (Slika 16A).



Slika 16. Magnezijum ispoljava aktivnost anksiolitika u modelu depresivnog ponašanja indukovano dugotrajnom primenom ACTH kod mužjaka pacova. Promene u ponašanju životinja, odnosno efekti primene ACTH (10 $\mu\text{g/dan}$, 21 dan, *s.c.*), kao i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*), praćeni su određivanjem sledećih parametara u testu otvorenog polja (OFT): (A) ukupnog pređenog puta (m), (B) pređenog puta u centralnoj zoni (m) i (C) vremena provedenog u centralnoj zoni (s). Rezultati su analizirani primenom dvofaktorske ANOVA metode i prikazani su kao srednje vrednosti \pm standardna greška, kao i pojedinačne vrednosti za svaku životinju. * ($p < 0,05$) i ** ($p < 0,01$).

Pokazano je, međutim, da je hronična primena ACTH za posledicu imala značajno redukovano vreme provedeno u centralnoj zoni polja, kao i skraćeni put pređen u ovoj zoni ($F_{24,1}=5,50$, $p=0,028$, $\eta^2=0,19$ i $F_{24,1}=10,93$, $p=0,003$, $\eta^2=0,31$, redom). Sa druge strane, interakcija između ACTH i Mg je ispoljila statističku značajnost u pogledu pređenog puta u centralnoj zoni ($F_{24,1}=5,13$, $p=0,033$, $\eta^2=0,18$). Životinje iz ACTH grupe su prešle značajno kraći put u centralnom delu polja (Slika 16B) i manje vremena su provodile u ovoj zoni (Slika 16C) u poređenju sa kontrolama ($p=0,013$, $d=1,33$ i $p=0,001$, $d=1,17$, redom), što upućuje na ponašanje slično anksioznosti. Primena Mg je ispoljila anksiolitički efekat i dovela do značajnog povećanja vremena provedenog u centralnoj zoni kod ACTH/Mg životinja u poređenju sa ACTH grupom ($p=0,047$; $d=1,25$), kao što je prikazano na Slici 16C.

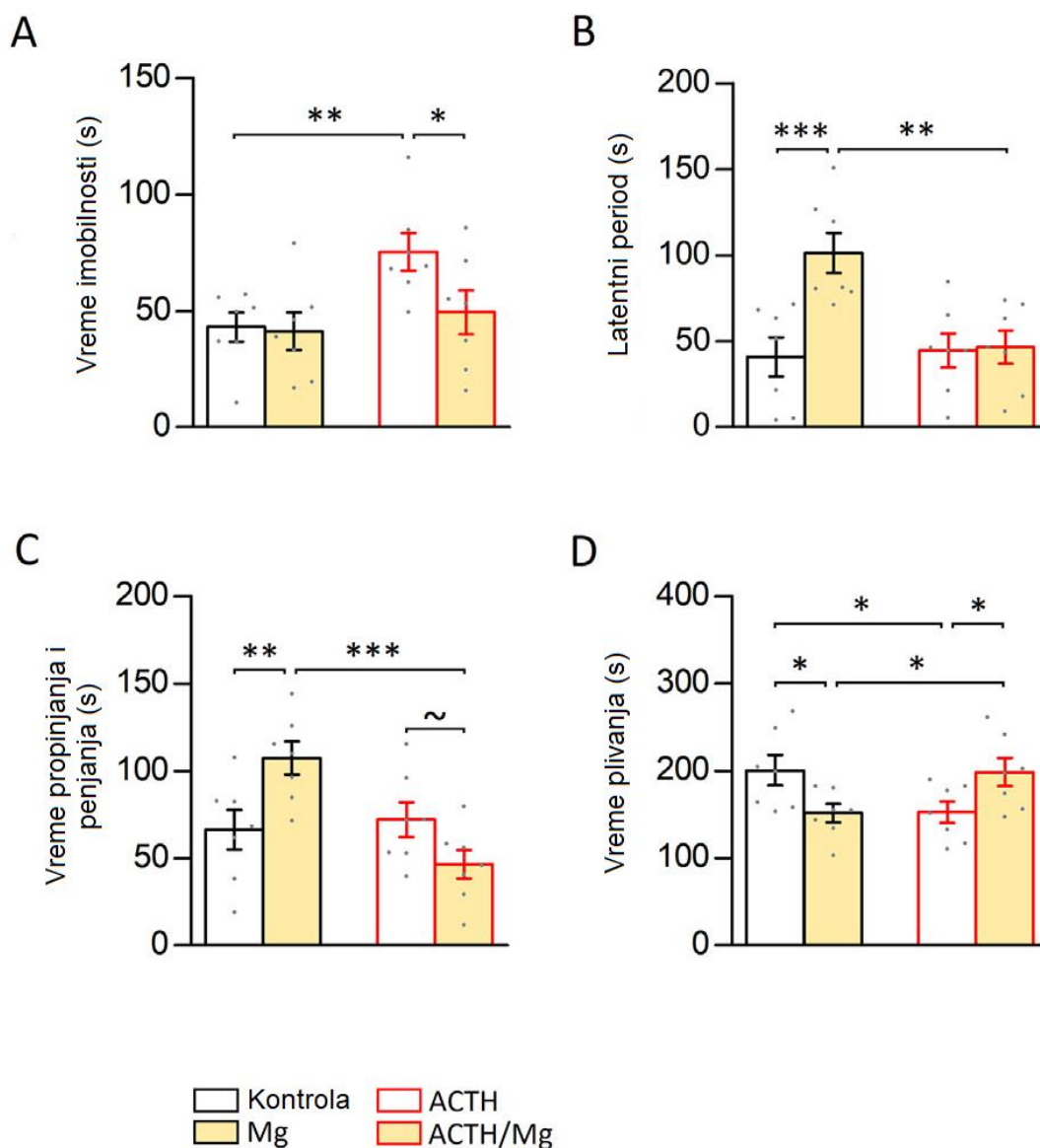
4.1.2.2. Ponašanje eksperimentalnih životinja u testu forsiranog plivanja (eng. Forced swim test, FST)

Analiza parametara ispitivanih u testu forsiranog plivanja, upućuje na antidepresivne efekte magnezijuma u modelu depresivnog ponašanja indukovanog hroničnom primenom hormona stresa-ACTH kod pacova.

Naime, primena ACTH dovela je do povećanja vremena imobilnosti u toku FST ($F_{24,1}=6,43$, $p=0,018$, $\eta^2=0,21$), tako da je kod životinja ACTH grupe pomenuti parametar bio značajno veći u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,009$; $d=1,71$). Smatra se da opisana promena u ponašanju pacova, odnosno takozvano "despair-like behavior", odražava osećaj bespomoćnosti prisutan kod životinja izlaganih hormonu stresa. Dugotrajna primena Mg dovela je do značajnog smanjenja vremena imobilnosti kod ACTH/Mg u odnosu na ACTH životinje ($p=0,031$; $d=1,12$), kao što je predstavljeno na Slici 17A.

Ponavljana primena Mg kod životinja produžila je latentni period do prve pojave imobilnosti ($F_{24,1}=8,65$, $p=0,007$, $\eta^2=0,27$) i uočena je značajna interakcija između ACTH i Mg tretmana ($F_{24,1}=7,57$, $p=0,011$, $\eta^2=0,24$). Navedeni efekat manifestovao se kao značajno povećanje latentnog perioda kod životinja izloženih Mg tretmanu u odnosu na kontrole ($p=0,000$; $d=2,00$), ali i ACTH/Mg grupu ($p=0,001$; $d=1,94$) (Slika 17B). Pored toga, pokazana je značajna interakcija između ACTH i Mg ($F_{24,1}=11,62$, $p=0,002$, $\eta^2=0,33$) u pogledu vremena koje su životinje provele propinjući se na zidove cilindra u toku FST. Životinje Mg grupe provodile su više vremena u aktivnom traženju izlaza iz cilindra i penjanju uz staklene zidove u odnosu na kontrole ($p=0,007$; $d=1,50$), ali i ACTH/Mg grupu ($p=0,000$; $d=2,60$). Sa druge strane, uočen je trend smanjenja ovog parametra kod ACTH/Mg u poređenju sa ACTH grupom ($p=0,076$; $d=1,05$) (Slika 17C).

Tokom izvođenja FST, ACTH i Mg tretmani su pokazali značajnu interakciju i u pogledu vremena koje su životinje provele u plivanju ($F_{24,1}=11,05$, $p=0,003$, $\eta^2=0,32$). Naime, životinje izložene hroničnoj primeni ACTH provele su značajno manje vremena u plivanju, u odnosu na kontrole ($p=0,026$; $d=1,22$), ali i ACTH/Mg grupu ($p=0,033$; $d=1,20$). Pored toga, vreme provedeno u plivanju bilo je redukovano i kod životinja Mg u odnosu na ACTH/Mg grupu ($p=0,029$; $d=1,30$), ali i kontrole ($p=0,023$, $d=1,31$), što je prikazano na Slici 17D.



Slika 17. Antidepresivni efekat magnezijuma u modelu depresivnog ponašanja indukovano hroničnom primenom ACTH kod mužjaka pacova. Bihevioralni efekti ACTH (10 µg/dan, 21 dan, *s.c.*) i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*) tretmana ispitivani su primenom testa forsiranog plivanja (FST) i praćenjem sledećih parametara: (A) vremena imobilnosti (s), (B) latentnog perioda do prve pojave imobilnosti (s), (C) vremena koje životinja provede u propinjanju i penjanju uz zidove cilindra (s) i (D) vremena tokom kog životinja pliva (s). Rezultati su analizirani primenom dvofaktorske ANOVA metode i prikazani su kao srednje vrednosti ± standardna greška, kao i pojedinačne vrednosti za svaku životinju. ~ ($p < 0,10$); * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

4.1.3. Efekti hronične primene magnezijuma i akutnog stresa na nivo biogenih amina u plazmi životinja u modelu depresije rezistentne na primenu tricikličnih antidepresiva

Analizom koncentracije kateholamina i serotonina u plazmi ispitivan je uticaj dugotrajne primene Mg kod pacova izloženih hroničnom tretmanu sa ACTH, kao i efekti akutnog stresa u vidu FST, na promene navedenih parametara.

4.1.3.1. Promene u koncentraciji adrenalina u plazmi eksperimentalnih životinja

Naime, primena trofaktorske ANOVA metode pokazala je da su Mg tretman, kao i akutni stres indukovani izlaganjem glodara testu forsiranog plivanja, doveli do značajnog porasta koncentracije adrenalina u plazmi ($F_{44,1}=8,37$, $p=0,006$, $\eta^2=0,16$ i $F_{44,1}=51,15$, $p=0,000$, $\eta^2=0,54$, redom). Pored toga, otkrivena je i značajna interakcija između Mg i FST kao faktora ($F_{44,1}=6,80$, $p=0,012$, $\eta^2=0,13$). Prema tome, nakon izlaganja FST, koncentracija adrenalina u plazmi je bila značajno povišena kod kontrola ($p=0,006$; $d=1,23$), Mg ($p=0,000$; $d=5,86$) i ACTH/Mg ($p=0,000$; $d=1,91$) životinja, u odnosu na odgovarajuće vrednosti životinja koje su bile izložene istim tretmanima, ali ne i akutnom stresu (Slika 18A). Takođe, kod životinja podvrgnutih akutnom stresu u formi FST, nivo adrenalina u plazmi je bio značajno veći u Mg grupi u odnosu na kontrole ($p=0,010$; $d=1,03$), kao i u ACTH/Mg grupi u odnosu na ACTH životinje ($p=0,007$; $d=1,14$), što je predstavljeno na Slici 18A.

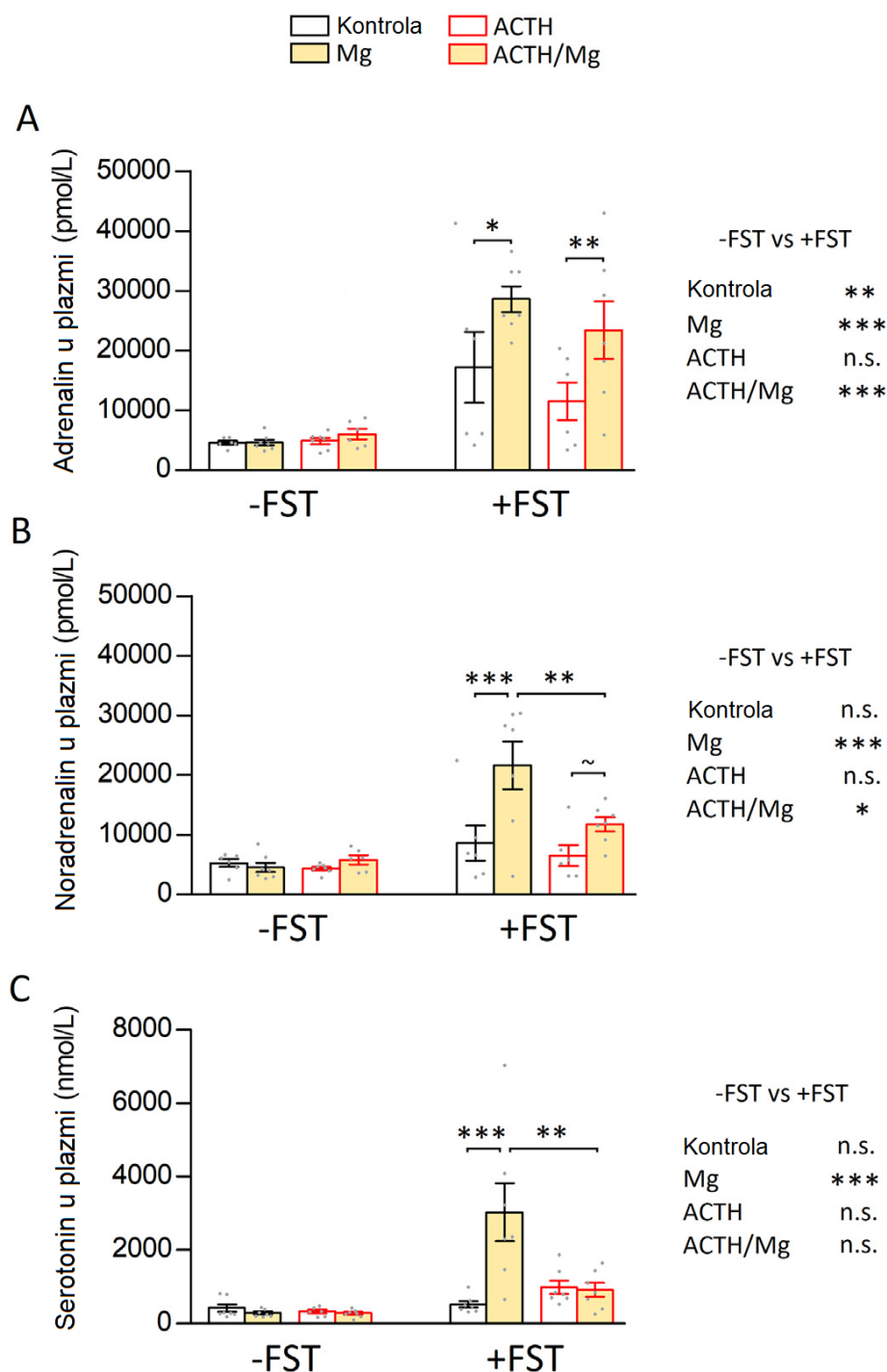
4.1.3.2. Promene u koncentraciji noradrenalina u plazmi eksperimentalnih životinja

Trofaktorska ANOVA je otkrila značajno smanjenu koncentraciju noradrenalina u plazmi glodara dugotrajno izloženih tretmanu sa ACTH ($F_{44,1}=4,21$, $p=0,046$, $\eta^2=0,09$). Nasuprot tome, Mg tretman i akutni stres su indukovali značajni porast nivoa noradrenalina kod životinja ($F_{44,1}=11,30$, $p=0,002$, $\eta^2=0,20$ i $F_{44,1}=25,60$, $p=0,000$ and $\eta^2=0,37$, redom). Pri tom, sledeće interakcije su pokazale statističku značajnost: ACTH x FST ($F_{44,1}=4,71$, $p=0,035$, $\eta^2=0,10$) i Mg x FST ($F_{44,1}=9,58$, $p=0,003$, $\eta^2=0,18$). U skladu s tim, pokazano je da je kod životinja izloženih forsiranom plivanju nivo noradrenalina u plazmi bio značajno veći u poređenju sa životinjama koje nisu bile podvrgnute akutnom stresu, u Mg ($p=0,000$; $d=2,30$), kao i u ACTH/Mg grupi ($p=0,041$; $d=2,25$), što je prikazano na Slici 18B. Pored toga, kod glodara izloženih FST, Mg je indukovao značajan porast koncentracije noradrenalina u plazmi u Mg grupi u odnosu na kontrole ($p=0,000$; $d=1,44$), kao i trend povećanja kod ACTH/Mg životinja u poređenju sa ACTH grupom ($p=0,070$; $d=1,38$). Takođe, kod pacova podvrgnutih forsiranom plivanju, nivo noradrenalina u plazmi u ACTH/Mg grupi je bio značajno niži u odnosu na Mg grupu ($p=0,001$; $d=1,27$) (Slika 18B).

4.1.3.3. Promene u koncentraciji serotonina u plazmi eksperimentalnih životinja

Prilikom određivanja koncentracije serotonina, ustanovljeno je da je glavni efekat hronične primene ACTH bio značajan pad nivoa ovog biogenog amina u plazmi ($F_{47,1}=4,07$, $p=0,049$, $\eta^2=0,08$). Sa druge strane, otkriveno je da su Mg tretman, kao i FST, indukovali značajan porast koncentracije serotonina ($F_{47,1}=6,73$, $p=0,013$, $\eta^2=0,13$ i $F_{47,1}=22,78$, $p=0,000$, $\eta^2=0,33$, redom). Pri tom, sledeće interakcije su pokazale statističku značajnost: Mg x ACTH ($F_{47,1}=8,21$, $p=0,006$, $\eta^2=0,15$); Mg x FST ($F_{47,1}=9,15$, $p=0,004$, $\eta^2=0,16$) and Mg x ACTH x FST ($F_{47,1}=9,43$, $p=0,004$, $\eta^2=0,17$). Povećanje nivoa serotonina u plazmi usled izlaganja glodara akutnom stresu u formi FST, dostiglo je statističku značajnost samo kod životinja izloženih dugotrajnom Mg tretmanu ($p=0,000$; $d=1,85$), što je predstavljeno na Slici 18C. Pored toga, nakon forsiranog plivanja, koncentracija serotonina je bila značajno veća u Mg grupi u poređenju sa kontrolama i ACTH/Mg životinjama ($p=0,000$, $d=1,68$ i $p=0,000$, $d=1,38$, redom) (Slika 18C).

Detaljan prikaz rezultata statističke analize koncentracija biogenih amina u plazmi mužjaka pacova dat je u Tabeli VI.



Slika 18. Dugotrajna primena magnezijuma indukuje porast koncentracije biogenih amina kod mužjaka pacova prilikom izlaganja ovih životinja akutnom stresu. Randomizovanom raspodelom svaka eksperimentalna grupa podeljena je na dve podgrupe, odnosno životinje koje su bile izložene testu forsiranog plivanja (FST), što predstavlja akutni stres za glodare i životinje koje nisu podvrgnute akutnom stresu (-FST). Prilikom ispitivanja efekata hroničnih ACTH (10 µg/dan, 21 dan, *s.c.*) i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*) tretmana, kao i promena indukovanih izlaganjem životinja FST, praćene su koncentracije sledećih parametara u plazmi pacova: (A) adrenalina, (B) noradrenalina i (C) serotonina. Rezultati su analizirani primenom trofaktorske ANOVA metode i prikazani su kao srednje vrednosti ± standardna greška, kao i pojedinačne vrednosti za svaku životinju. Oznake na samim graficima predstavljaju značajnosti, odnosno razlike između eksperimentalnih grupa, dok su na desnoj strani Slike prikazane razlike između nestresiranih i stresiranih životinja (-FST vs +FST). ~ ($p < 0,10$); * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

Tabela VI. Uticaj dugotrajne primene Mg na koncentracije kateholamina i serotonina u plazmi u modelu depresije indukovanom hroničnim tretmanom životinja sa ACTH. Predstavljene su rezultati trofaktorske ANOVE, odnosno glavni efekti Mg tretmana, ACTH tretmana i akutnog stresa, u obliku FST, na koncentracije biogenih amina u plazmi, kao i interakcije ovih faktora.

Parametar	Trofaktorska ANOVA glavni efekti	F	p	Parcijalni Eta kvadrat
Adrenalin	Mg	$F_{44,1}=8,37$	0,006	0,16
	ACTH	$F_{44,1}=1,17$	0,286	0,03
	FST	$F_{44,1}=51,15$	0,000	0,54
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{44,1}=0,04$	0,847	0,00
	Interakcija: Mg x FST	$F_{44,1}=6,80$	0,012	0,13
	Interakcija: ACTH x FST	$F_{44,1}=2,24$	0,142	0,05
	Interakcija: Mg x ACTH x FST	$F_{44,1}=0,01$	0,939	0,00
Noradrenalin	Mg	$F_{44,1}=11,30$	0,002	0,20
	ACTH	$F_{44,1}=4,21$	0,046	0,09
	FST	$F_{44,1}=25,60$	0,000	0,37
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{44,1}=0,97$	0,331	0,02
	Interakcija: Mg x FST	$F_{44,1}=9,58$	0,003	0,18
	Interakcija: ACTH x FST	$F_{44,1}=4,71$	0,035	0,10
	Interakcija: Mg x ACTH x FST	$F_{44,1}=3,12$	0,085	0,07
Serotonin	Mg	$F_{47,1}=6,73$	0,013	0,13
	ACTH	$F_{47,1}=4,07$	0,049	0,08
	FST	$F_{47,1}=22,78$	0,000	0,33
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{47,1}=8,21$	0,006	0,15
	Interakcija: Mg x FST	$F_{47,1}=9,15$	0,004	0,16
	Interakcija: ACTH x FST	$F_{47,1}=3,18$	0,081	0,06
	Interakcija: Mg x ACTH x FST	$F_{47,1}=9,43$	0,004	0,17

4.1.4. Efekti ponavljane primene magnezijuma i izlaganja eksperimentalnih životinja forsiranom plivanju na parametre aktivnosti HPA ose u modelu depresije rezistentne na primenu tricikličnih antidepresiva

U svrhu ispitivanja uticaja magnezijuma na neuroendokrine promene u modelu hiperaktivnosti HPA osovine, koji se danas smatra i modelom depresivnog ponašanja, analizirane su koncentracije ACTH, kortikosterona, kao i citokina IL-6, u plazmi životinja. Pored toga, ispitivan je i efekat akutnog stresa kod ovih životinja, indukovano izlaganjem forsiranom plivanju. Stoga, randomizovanom raspodelom svaka eksperimentalna grupa (n=14) je podeljena u dve podgrupe (n=7). Pri tom, 28-og dana eksperimenta, jedna podgrupa je bila izložena OFT (10 min) koji za glodare ne predstavlja značajan stres, dok je druga podgrupa životinja podvrgnuta FST u trajanju od 5 min.

4.1.4.1. Promene u koncentraciji ACTH u plazmi eksperimentalnih životinja

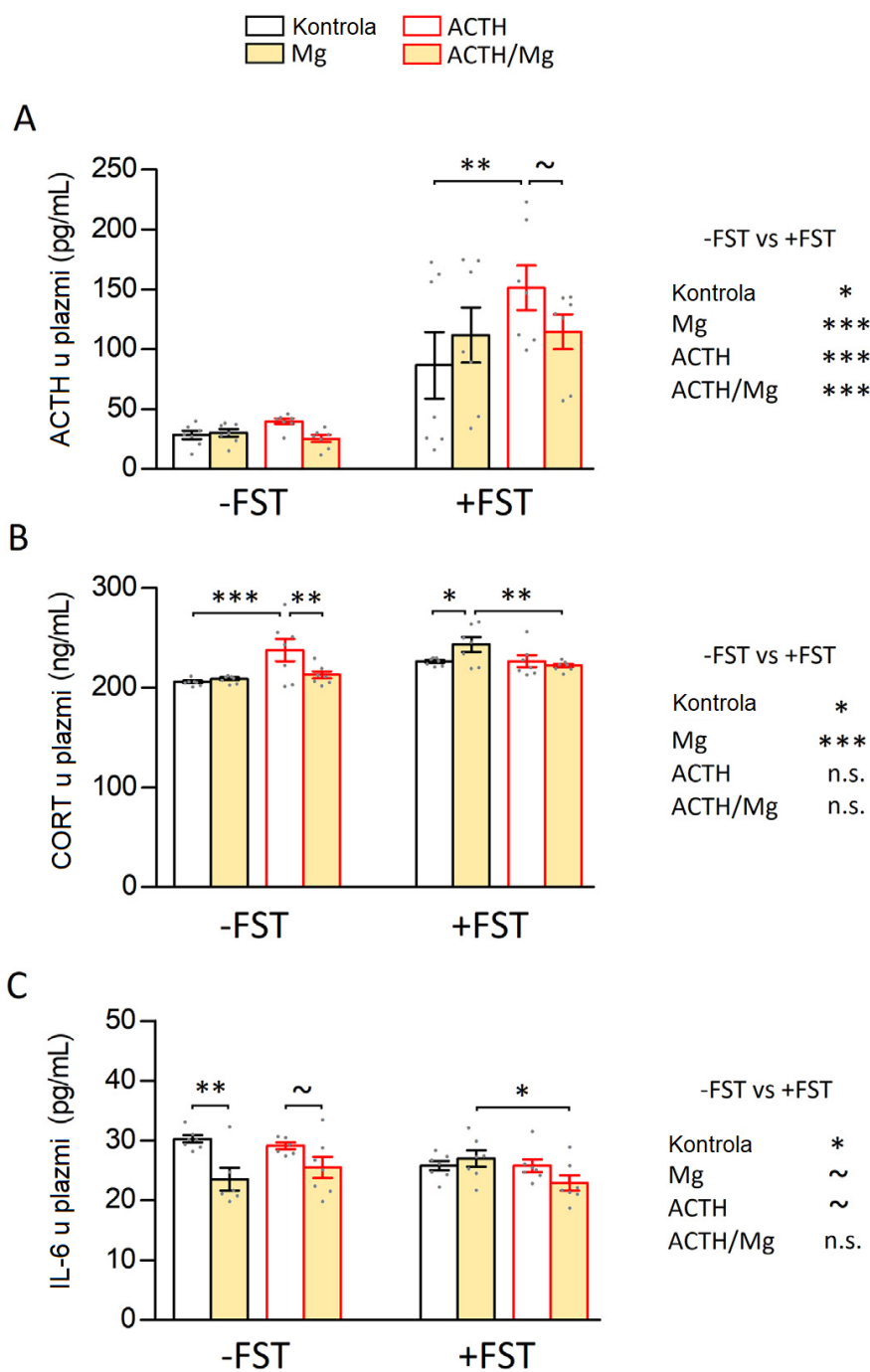
Trofaktorska ANOVA je pokazala značajno smanjenu koncentraciju ACTH u plazmi životinja kao efekat hronične primene Mg ($F_{48,1}=182,94$, $p=0,000$, $\eta^2=0,79$), kao i interakciju između ACTH tretmana i Mg tretmana kao faktora ($F_{48,1}=61,24$, $p=0,000$, $\eta^2=0,56$). Sa druge strane, iako je glavni efekat akutnog stresa, uzrokovanog izlaganjem FST, dostigao samo statistički trend ($F_{48,1}=2,90$, $p=0,095$, $\eta^2=0,06$), koncentracija ACTH u plazmi je bila značajno veća kod pacova koji su bili podvrgnuti forsiranom plivanju u poređenju sa nestresiranim životinjama u okviru iste eksperimentalne grupe. Pomenuti fenomen je uočen u svim eksperimentalnim grupama: kontrolnoj ($p=0,010$; $d=1,11$), Mg ($p=0,000$; $d=1,88$), ACTH ($p=0,000$; $d=3,16$) i ACTH/Mg ($p=0,000$; $d=3,25$), kao što je prikazano na Slici 19A. Pored toga, pokazano je da je kod stresiranih životinja koncentracija ACTH u plazmi bila značajno veća u ACTH grupi u odnosu na kontrolnu ($p=0,005$; $d=1,03$). Nasuprot tome, hronična primena Mg dovela je do smanjenja nivoa ACTH u plazmi glodara ACTH/Mg u poređenju sa ACTH grupom (Slika 19A), što je prilikom statističke analize detektovano kao trend ($p=0,099$; $d=0,83$).

4.1.4.2. Promene u koncentraciji kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja

Akutno izlaganje stresu, u vidu forsiranog plivanja, značajno je uticalo na nivo kortikosterona u plazmi životinja ($F_{48,1}=12,01$, $p=0,001$, $\eta^2=0,20$), pokazujući pri tom statistički značajne interakcije sa ACTH ($F_{48,1}=13,61$, $p=0,001$, $\eta^2=0,22$), kao i Mg ($F_{48,1}=5,06$, $p=0,029$, $\eta^2=0,10$) tretmanom. Takođe, interakcija između Mg i ACTH tretmana, kao faktora, je ispoljila statističku značajnost ($F_{48,1}=10,08$, $p=0,003$, $\eta^2=0,17$). Naime, kod nestresiranih životinja, u ACTH grupi je primećen značajan porast koncentracije kortikosterona u poređenju sa kontrolama ($p=0,000$; $d=1,35$). Nasuprot tome, ponavljana, dugotrajna primena Mg dovela je do značajnog smanjenja nivoa kortikosterona u plazmi glodara u ACTH/Mg grupi u odnosu na ACTH životinje ($p=0,002$; $d=1,12$), što je prikazano na Slici 19B. Nakon akutnog stresa, kod životinja kontrolne ($p=0,010$; $d=5,73$), kao i Mg grupe ($p=0,000$; $d=2,48$) zabeležen je značajan porast koncentracije kortikosterona u plazmi (Slika 19B). Pored toga, kod stresiranih životinja, odnosno nakon izlaganja FST, nivo kortikosterona je bio značajno veći u Mg grupi u odnosu na kontrole ($p=0,033$; $d=0,96$), dok je kod ACTH/Mg glodara bio značajno smanjen u poređenju sa Mg grupom ($p=0,009$; $d=1,49$), kao što je predstavljeno na Slici 19B.

4.1.4.3. Promene u koncentraciji citokina IL-6 u plazmi eksperimentalnih životinja

Primena trofaktorske ANOVA metode otkrila je da je hronična izloženost Mg tretmanu dovela do značajnog smanjenja proinflamatornog citokina IL-6 u plazmi pacova ($F_{46,1}=11,61$, $p=0,001$, $\eta^2=0,20$), kao i da je ovaj faktor pokazao značajnu interakciju sa akutnim stresom u obliku FST ($F_{46,1}=5,97$, $p=0,018$, $\eta^2=0,12$). Pored toga, uočena je značajna interakcija između sledećih faktora: Mg, ACTH tretmana i FST ($F_{46,1}=4,14$, $p=0,048$, $\eta^2=0,08$). Kod nestresiranih životinja, hronična primena Mg dovela je do značajnog smanjenja koncentracije IL-6 u plazmi, i to u Mg grupi u odnosu na kontrole ($p=0,001$; $d=1,93$), ali i u modelu depresivnog ponašanja, odnosno kod glodara izloženih ACTH/Mg tretmanu u poređenju sa ACTH grupom ($p=0,051$; $d=1,04$), kao što je prikazano na Slici 19C. Sa druge strane, akutni stres je indukovao značajan pad koncentracije IL-6 kod kontrola ($p=0,014$; $d=2,40$), dok je u ACTH grupi navedeni efekat pokazao trend ($p=0,073$; $d=1,50$). U Mg grupi, izlaganje glodara akutnom stresu u obliku FST imalo je suprotni efekat i uočen je trend porasta nivoa IL-6 u plazmi ($p=0,059$; $d=0,85$). Takođe, kod stresiranih životinja primećeno je smanjenje IL-6 u plazmi ACTH/Mg životinja u odnosu na Mg grupu ($p=0,023$; $d=1,18$), što je predstavljeno na Slici 19C.



Slika 19. Magnezijum suprimira hiperaktivnost hipotalamo-hipofizno-adrenalne (HPA) osovine i dovodi do smanjenja nivoa interleukina 6 (IL-6) u modelu depresivnog ponašanja indukovano primenom adrenokortikotropnog hormona (ACTH). Ispitivanje efekata hronične primene ACTH (10 $\mu\text{g/dan}$, 21 dan, *s.c.*) i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*), kao i uticaja akutnog stresa, na parametre aktivnosti HPA ose praćeno je određivanjem koncentracije: (A) ACTH, (B) kortikosterona (CORT) i (C) proinflamatornog citokina IL-6, u plazmi pacova. Svaka eksperimentalna grupa životinja podeljena je randomizovanom raspodelom na dve podgrupe: stresirane životinje koje su bile izložene testu forsiranog plivanja (FST) i nestresirane, odnosno životinje koje nisu podvrgnute akutnom stresu u vidu FST. Prilikom analize rezultata korišćena je trofaktorska ANOVA i podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm standardna greška, kao i pojedinačne vrednosti za svaku životinju. Na graficima je dat prikaz statističkih značajnosti, kao rezultat poređenja između eksperimentalnih grupa, dok su na desnoj strani Slike predstavljene razlike između nestresiranih i stresiranih životinja (-FST vs +FST). ~ ($p < 0,10$); * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

Detaljan prikaz rezultata statističke analize parametara aktivnosti HPA ose, kao i nivoa IL-6 u plazmi mužjaka pacova dat je u Tabeli VII.

Tabela VII. Uticaj ponavljane primene ACTH, kao i Mg, na parametre aktivnosti HPA ose i nivo IL-6 u plazmi. Trofaktorskom ANOVA analizom ustanovljeni su glavni efekti Mg tretmana, ACTH tretmana i akutnog stresa indukovano izlaganjem životinja FST, kao i interakcije ovih faktora.

Parametar	Trofaktorska ANOVA glavni efekti	F	p	Parcijalni Eta kvadrat
ACTH	Mg	$F_{48,1}=182,94$	0,000	0,79
	ACTH	$F_{48,1}=0,31$	0,580	0,01
	FST	$F_{48,1}=2,90$	0,095	0,06
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{48,1}=61,24$	0,000	0,56
	Interakcija: Mg x FST	$F_{48,1}=3,23$	0,079	0,06
	Interakcija: ACTH x FST	$F_{48,1}=0,00$	0,973	0,00
	Interakcija: Mg x ACTH x FST	$F_{48,1}=1,97$	0,167	0,04
Kortikosteron	Mg	$F_{48,1}=0,36$	0,551	0,01
	ACTH	$F_{48,1}=0,94$	0,338	0,02
	FST	$F_{48,1}=12,01$	0,001	0,20
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{48,1}=10,08$	0,003	0,17
	Interakcija: Mg x FST	$F_{48,1}=5,06$	0,029	0,10
	Interakcija: ACTH x FST	$F_{48,1}=13,61$	0,001	0,22
	Interakcija: Mg x ACTH x FST	$F_{48,1}=0,20$	0,660	0,00
IL-6	Mg	$F_{46,1}=11,61$	0,001	0,20
	ACTH	$F_{46,1}=0,84$	0,363	0,02
	FST	$F_{46,1}=3,75$	0,059	0,08
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{46,1}=0,07$	0,792	0,00
	Interakcija: Mg x FST	$F_{46,1}=5,97$	0,018	0,12
	Interakcija: ACTH x FST	$F_{46,1}=1,96$	0,168	0,04
	Interakcija: Mg x ACTH x FST	$F_{46,1}=4,14$	0,048	0,08

4.1.5. Uticaj hronične primene magnezijuma na parametre hipokampalne neurogeneze u modelu depresije rezistentne na primenu tricikličnih antidepressiva

Pre gotovo dve decenije je otkriveno da se neurogeneza- stvaranje novih, funkcionalnih neurona iz neuronskih stem i progenitorskih ćelija, odvija i kod odraslih jedinki u strukturi limbičkog sistema- hipokampusu. Naime, hipokampus je struktura koju odlikuje plastičnost, ali i izražena osetljivost na stres, odnosno visok nivo cirkulišućih glukokortikoida, što se manifestuje morfološkim i funkcionalnim promenama. Prilikom ispitivanja efekata hronične primene Mg kod životinja izloženih hormonu stresa- ACTH, istraživanje je imalo za cilj i praćenje markera adultne neurogeneze. Shodno tome, primenom imunohistohemijske metode, analiziran je broj neurona koji ekspimiraju marker proliferacije Ki-67 i neurotrofin BDNF, u dentatnom girusu hipokampusa.

4.1.5.1. Promene u ekspresiji markera proliferacije Ki-67 u hipokampusu

Nakon primene dvofaktorske ANOVE, uočeno je da su oba tretmana, odnosno hronična primena Mg, kao i ponavljano izlaganje glodara ACTH, za posledicu imali povećanje broja Ki-67 imunopozitivnih ćelija u dentatnom girusu hipokampusa ($F_{33,1}=37,98$, $p=0,000$, $\eta^2=0,54$ i $F_{33,1}=16,39$, $p=0,000$, $\eta^2=0,33$, redom). Naime, u poređenju sa kontrolnom grupom, kod životinja izloženih ACTH tretmanu pokazan je trend porasta broja neurona koji ekspimiraju Ki-67 u hipokampusu ($p=0,096$; $d=1,62$). Sa druge strane, pomenuti efekat je pokazao statističku značajnost u Mg grupi, u odnosu na kontrole ($p=0,004$; $d=2,10$), kao što je prikazano na Slici 20A. Kombinovana primena ACTH i Mg tretmana ispoljila je sinergistički efekat (Slika 20A), tako da je kod glodara ACTH/Mg grupe broj Ki-67 imunopozitivnih neurona u dentatnom girusu bio značajno veći u poređenju sa ACTH ($p=0,000$, $d=2,31$), kao i Mg grupom ($p=0,000$, $d=1,51$).

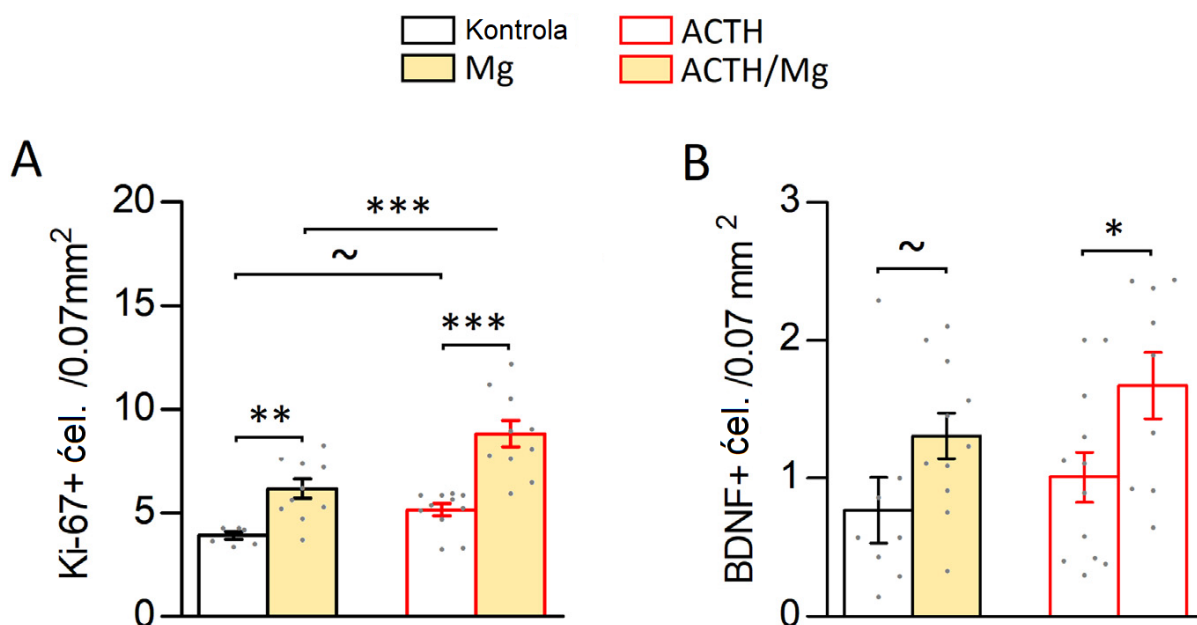
U Tabeli VIII dat je detaljan prikaz rezultata statističke analize parametara neurogeneze u hipokampusu mužjaka pacova.

Tabela VIII. Efekti hroničnog Mg tretmana i promene ekspresije parametara neurogeneze u animalnom modelu depresije indukovane ponavljanim primenom ACTH. U pomenutom modelu depresivnog ponašanja praćena je ekspresija Ki-67, kao i BDNF, u dentatnom girusu hipokampusa odraslih mužjaka pacova Wistar soja. Primena dvofaktorske ANOVA metode pokazala je glavne efekte ACTH i Mg tretmana, kao i interakcije ovih faktora.

Parametar	Dvofaktorska ANOVA glavni efekti	F	p	Parcijalni Eta kvadrat
Broj Ki-67 imunopozitivnih neurona	Mg	$F_{33,1}=37,98$	0,000	0,54
	ACTH	$F_{33,1}=16,39$	0,000	0,33
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{33,1}=2,19$	0,149	0,06
Broj BDNF imunopozitivnih neurona	Mg	$F_{36,1}=10,02$	0,003	0,22
	ACTH	$F_{36,1}=1,71$	0,199	0,05
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{36,1}=0,15$	0,702	0,00

4.1.5.2. Promene u ekspresiji neurotrofina BDNF u hipokampusu

Prilikom imunohistohemijskog određivanja ekspresije proteina BDNF, analiza rezultata izvršena je primenom dvofaktorske ANOVA metode. Pokazano je da je hronična primena Mg kod mužjaka pacova dovela do značajnog povećanja broja BDNF imunopozitivnih ćelija ($F_{36,1}=10,02$, $p=0,003$, $\eta^2=0,22$) u dentatnom girusu hipokampusa. Shodno tome, uočen je trend povećanja broja BDNF pozitivnih neurona u Mg grupi u odnosu na kontrolnu ($p=0,059$; $d=0,93$), kao i statistički značajan porast ekspresije ovog parametra neurogeneze kod ACTH/Mg životinja u odnosu na ACTH grupu ($p=0,016$; $d=1,06$), što je predstavljeno na Slici 20B.



Slika 20. Magnezijum ispoljava stimulatorni efekat na proces adultne neurogeneze u modelu depresivnog ponašanja indukovano hroničnom primenom ACTH kod pacova. Uticaj hroničnih ACTH (10 µg/dan, 21 dan, *s.c.*) i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*) tretmana na parametre neurogeneze ispitivan je primenom imunohistohemijske metode određivanja broja: (A) Ki-67 imunopozitivnih neurona, kao i (B) BDNF imunopozitivnih neurona u dentatnom girusu (DG). Broj imunopozitivnih ćelija u DG hipokampusa izražen je po površini vidnog polja (0,07 mm²). Prilikom analize rezultata korišćena je dvofaktorska ANOVA i podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna greška, kao i pojedinačne vrednosti za svaku životinju. ~ ($p < 0,10$); * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

4.2. Druga eksperimentalna faza

4.2.1. Efekti dugotrajne primene magnezijuma na homeostazu bioelemenata u prefrontalnom korteksu životinja u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive

U cilju praćenja uticaja hroničnog Mg tretmana, kao i ponavljane primene ACTH, na koncentracije biometala- Fe, Cu, Zn i Mg u prefrontalnom korteksu mužjaka pacova, primenjena je dvofaktorska ANOVA. Pokazano je da ACTH i Mg tretmani, kao i njihove interakcije nisu ispoljili značajan uticaj na koncentracije Fe, Zn i Mg u PFC eksperimentalnih životinja, kao što je prikazano na Slici 21 i u Tabeli IX. Međutim, uprkos tome što statistička analiza nije pokazala značajnu razliku, primećeno je da je hronično izlaganje ACTH tretmanu bilo praćeno smanjenjem koncentracije Mg za 23% u PFC pacova, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 21D). Sa druge strane, uočeno je da je primena Mg dovela do povećanja nivoa Mg u PFC životinja za 22,3% u ACTH/Mg grupi u odnosu na ACTH životinje, kao i da ni ovaj efekat nije dostigao statističku značajnost (Slika 21D).

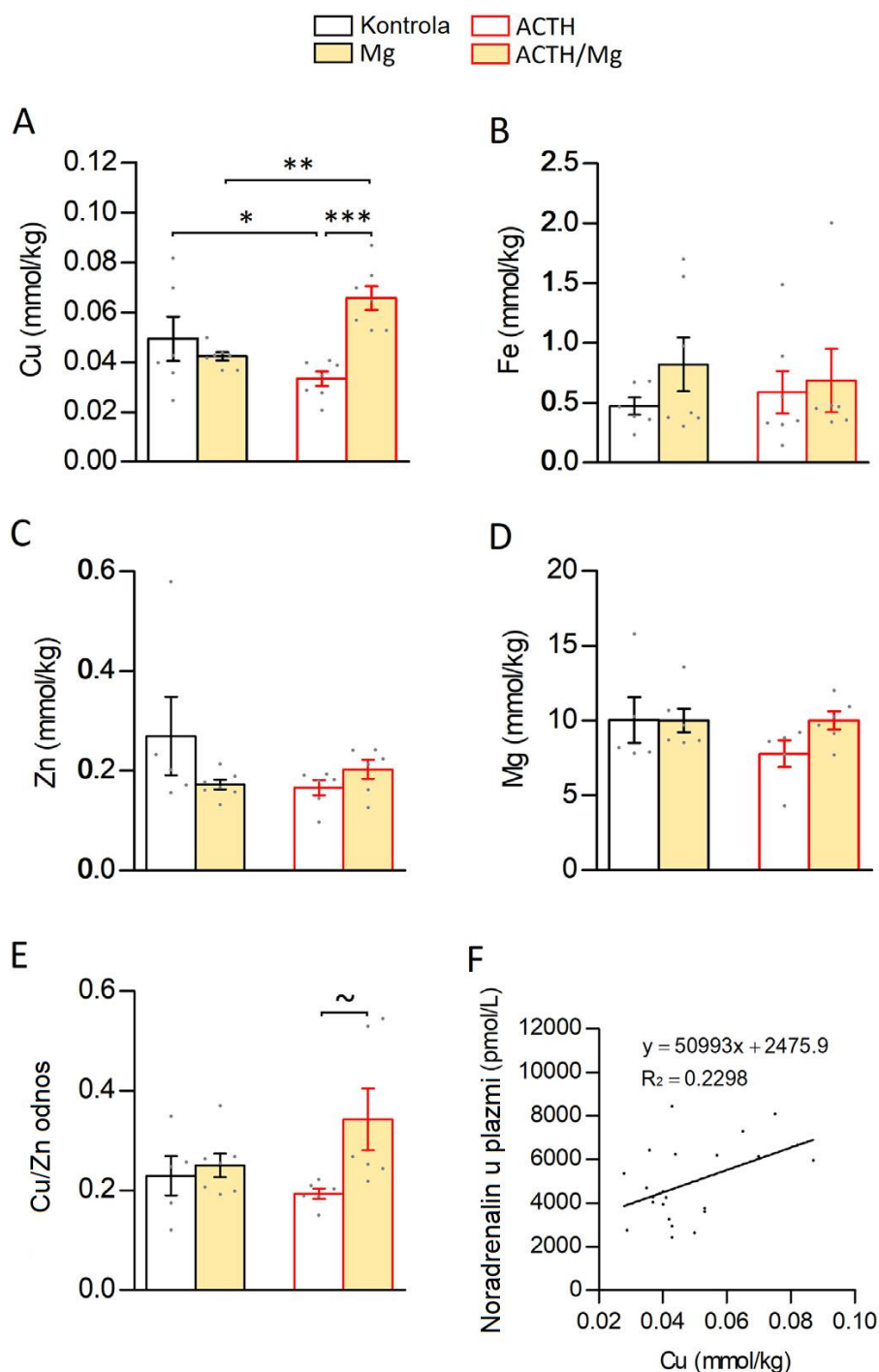
Naime, dugotrajna primena Mg indukovala je značajan porast koncentracije Cu u PFC glodara ($F_{23,1}=6,54$, $p=0,018$, $\eta^2=0,22$). Pored toga, kada je u pitanju nivo Cu, tretmani sa Mg i ACTH su pokazali značajnu interakciju ($F_{23,1}=15,82$, $p=0,001$, $\eta^2=0,41$). Nasuprot tome, primećeno je smanjenje nivoa Cu u PFC životinja hronično izloženih ACTH tretmanu, u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,035$; $d=0,98$), kao što je prikazano na Slici 21A. Navedeni efekat suprimirala je primena Mg (Slika 21A), i shodno tome u ACTH/Mg grupi koncentracija Cu je bila značajno veća u odnosu na ACTH grupu ($p=0,000$; $d=3,12$), ali i Mg grupu ($p=0,002$; $d=2,47$).

Takođe, analiza rezultata primenom dvofaktorske ANOVE je pokazala značajni porast odnosa Cu/Zn koji je usledio nakon Mg tretmana ($F_{20,1}=6,26$, $p=0,021$, $\eta^2=0,24$). Zahvaljujući *post hoc* poređenju uočen je trend porasta odnosa Cu/Zn kod ACTH/Mg životinja u odnosu na ACTH grupu ($p=0,069$, $d=0,094$), kao što je prikazano na Slici 21E. Pored toga, Spearman testovi korelacije su pokazala pozitivnu korelaciju između koncentracije noradrenalina u plazmi nestresiranih životinja i nivoa Cu u prefrontalnom korteksu ($p < 0,05$), kao što je predstavljeno na Slici 21F.

Detaljan prikaz rezultata dvofaktorske ANOVE, odnosno promene koncentracija bioelemenata u PFC mužjaka pacova nakon hroničnih ACTH i Mg tretmana, kao i interakcije ovih faktora dati su u Tabeli IX.

Tabela IX. Uticaj ACTH, kao i Mg tretmana, na homeostazu bioelemenata u PFC mužjaka pacova. Zahvaljujući primeni dvofaktorske ANOVA metode, analizirane su promene koncentracija Fe, Cu, Zn i Mg u PFC životinja, kao i odnos Cu/Zn. Prilikom analize rezultata, ispitivani su glavni efekti, kao i interakcije ACTH i Mg tretmana.

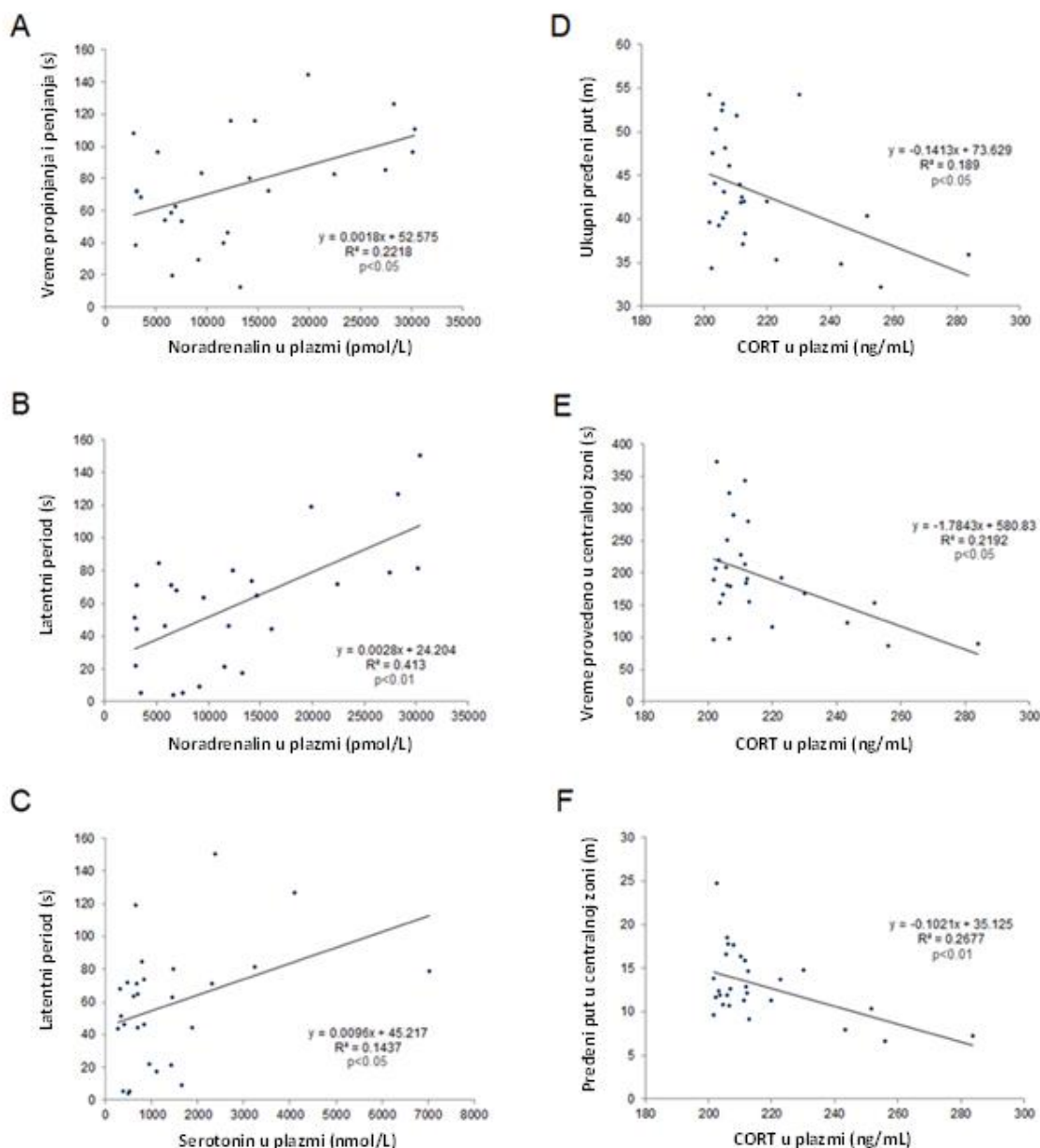
Parametar	Dvofaktorska ANOVA glavni efekti	F	p	Parcijalni Eta kvadrat
Fe	Mg	$F_{22,1}=1,24$	0,277	0,05
	ACTH	$F_{22,1}=0,00$	0,963	0,00
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{22,1}=0,38$	0,543	0,02
Cu	Mg	$F_{23,1}=6,54$	0,018	0,22
	ACTH	$F_{23,1}=0,55$	0,465	0,02
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{23,1}=15,82$	0,001	0,41
Zn	Mg	$F_{20,1}=0,74$	0,401	0,04
	ACTH	$F_{20,1}=1,08$	0,312	0,05
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{20,1}=3,59$	0,073	0,15
Mg	Mg	$F_{18,1}=1,30$	0,269	0,07
	ACTH	$F_{18,1}=1,36$	0,259	0,07
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{18,1}=1,36$	0,259	0,07
Cu/Zn odnos	Mg	$F_{20,1}=6,26$	0,021	0,24
	ACTH	$F_{20,1}=0,01$	0,936	0,00
	Interakcija: Mg x ACTH	$F_{20,1}=0,04$	0,845	0,00



Slika 21. Efekti hronične primene ACTH i magnezijuma na homeostazu bioelemenata u prefrontalnom korteksu (PFC) mužjaka pacova. Prilikom ispitivanja uticaja ACTH (10 μ g/dan, 21 dan, *s.c.*) i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*) tretmana, metodom plamene atomske apsorpcione spektrofotometrije izmerene su koncentracije sledećih bioelemenata: (A) Cu, (B) Fe, (C) Zn i (D) Mg. Pored toga, sprovedena je analiza odnosa između koncentracije Cu i Zn u PFC (E), dok je Spearmanov koeficijent korelacije pokazao vezu između koncentracije noradrenalina u plazmi nestresiranih životinja i nivoa Cu u PFC glodara (F). Rezultati su analizirani korišćenjem dvofaktorske ANOVA metode i prikazani su kao srednje vrednosti \pm standardna greška, kao i pojedinačne vrednosti za svaku životinju. ~ ($p < 0,10$); * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

4.2.2. Korelacije između bihevioralnih parametara i koncentracija hormona u plazmi mužjaka pacova

Prilikom ispitivanja efekata hronične primene magnezijuma u modelu depresivnog ponašanja, radi utvrđivanja povezanosti između bihevioralnih parametara i hormona u plazmi, primenjeni su Pearson testovi korelacije. Ispitivano je prisustvo korelacije između parametara analiziranih u testovima ponašanja (OFT i FST) i nivoa adrenalina, noradrenalina, serotonina, ACTH, kortikosterona i proinflamatornog citokina IL-6 u plazmi eksperimentalnih životinja. Uočena je statistički značajna pozitivna korelacija između koncentracije noradrenalina i vremena koje su životinje provele u penjanju uz FST cilindar ($R^2=0,2218$, $p < 0,05$), kao i nivoa noradrenalina i latentnog perioda do prve pojave imobilnosti tokom FST ($R^2=0,413$, $p < 0,01$), što je prikazano na Slici 22A-22B. Pored toga, analizom je pokazana i statistički značajna pozitivna korelacija između latentnog perioda do prve epizode imobilnosti i koncentracije serotonina u plazmi ($R^2=0,1437$, $p < 0,05$), kao što je predstavljeno na Slici 22C. Sa druge strane, postojala je statistički značajna negativna korelacija između kortikosterona u plazmi eksperimentalnih životinja i parametara analiziranih tokom OFT: ukupnog pređenog puta ($R^2=0,189$, $p < 0,05$), vremena provedenog u centralnoj zoni polja ($R^2=0,2192$, $p < 0,05$) i pređenog puta u centralnoj zoni ($R^2=0,2677$, $p < 0,01$), što je prikazano na Slici 22D-22F.



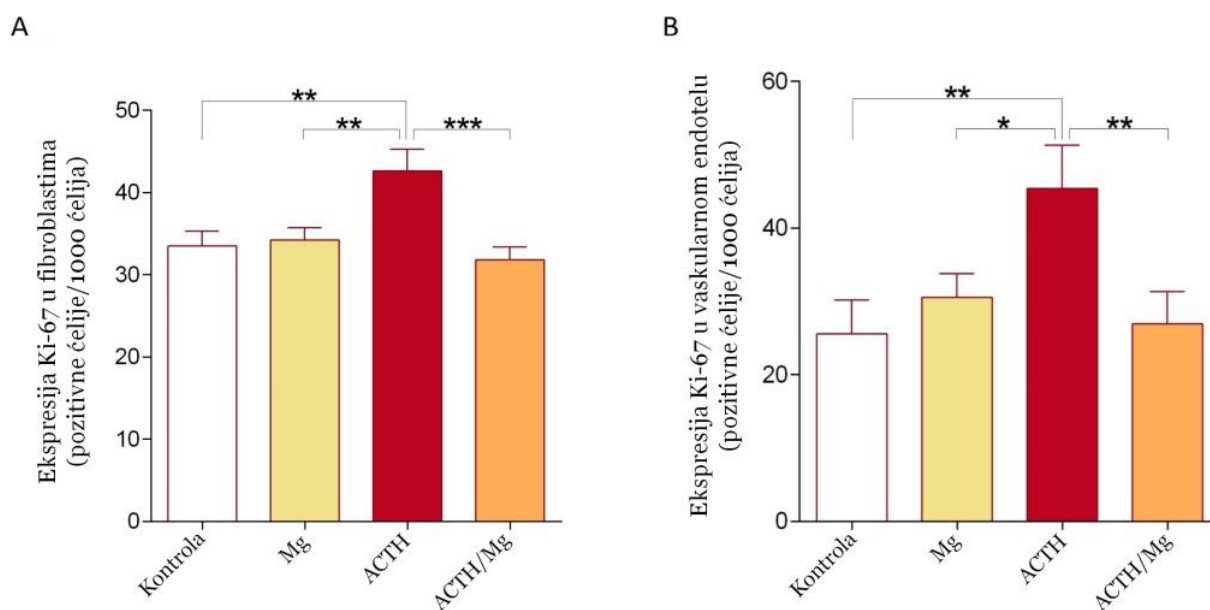
Slika 22. Korelacije između bihevioralnih parametara i nivoa hormona u plazmi mužjaka pacova. Prilikom praćenja neuroendokrinih i bihevioralnih efekata ACTH i Mg tretmana, ispitivana je povezanost između relevantnih parametara testova ponašanja-testa otvorenog polja (OFT) i forsiranog plivanja (FST), i koncentracije hormona u plazmi pomoću Pearson testova korelacije. Analiza je pokazala prisustvo značajne pozitivne korelacije između sledećih parametara: (A) vremena provedenog u propinjanju i penjanju uz FST cilindar i noradrenalina u plazmi, (B) latentnog perioda do prve pojave imobilnosti i noradrenalina u plazmi i (C) latentnog perioda do prve pojave imobilnosti i serotonina u plazmi. Značajna negativna korelacija je uočena između nivoa kortikosterona u plazmi i sledećih parametara OFT: (D) ukupnog pređenog puta tokom testa, (E) vremena provedenog u centralnoj zoni polja i (F) pređenog puta u centralnoj zoni. Na graficima je dat prikaz jednačina i koeficijenta determinacije (R^2).

4.2.3. Efekti hronične primene magnezijuma i dugotrajnog izlaganja tretmanu sa adrenokortikotropnim hormonom na parametre fibroze u srcu mužjaka pacova

U drugoj eksperimentalnoj fazi, u modelu depresije indukovane adrenokortikotropnim hormonom, u svrhu otkrivanja molekularnih mehanizama koji povezuju depresivno ponašanje i patološke promene na nivou morfologije srca, ispitivani su markeri intersticijalne fibroze. Takođe, istraživanje je imalo za cilj da se u pomenutom modelu odrede i potencijalni kardioprotektivni efekti magnezijuma.

4.2.3.1. Promene u ekspresiji markera proliferacije u fibroblastima i vaskularnim endotelnim ćelijama u srcu

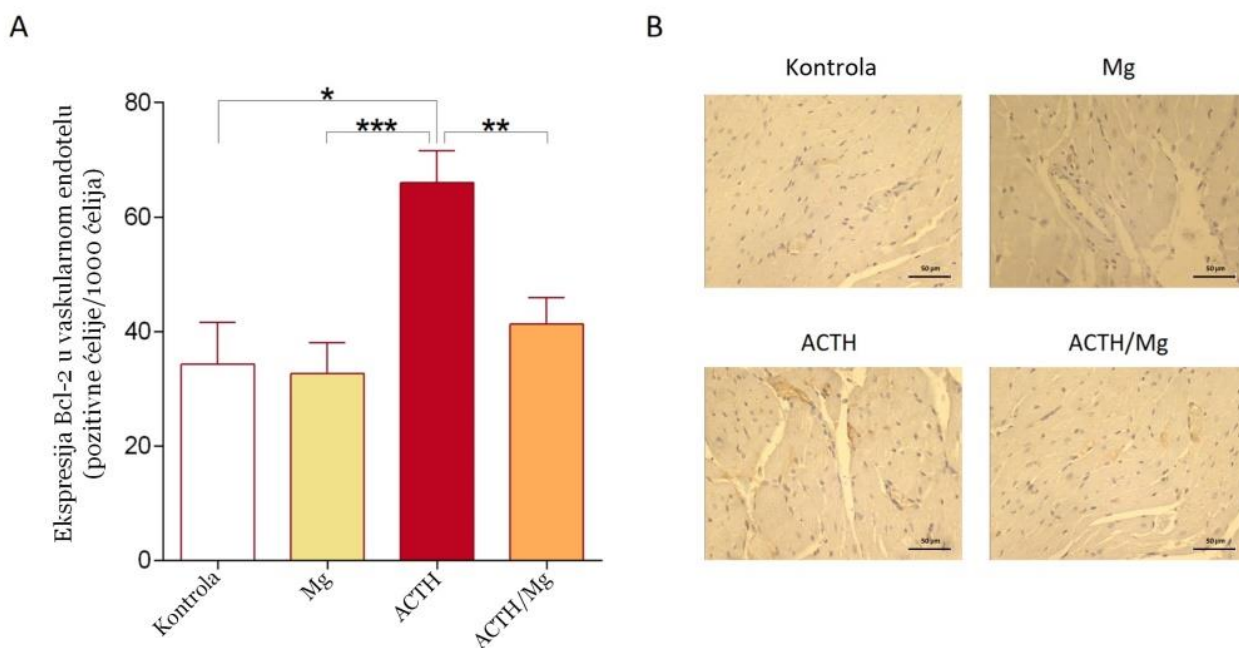
Prilikom ispitivanja promena u ekspresiji parametara fibroze, u modelu depresije rezistentne na primenu tricikličnih antidepresiva, praćena je proliferacija fibroblasta određivanjem markera-nuklearnog faktora Ki-67 i proteina PCNA. Imunohistohemijska analiza i primena jednofaktorske ANOVE otkrile su značajan porast broja proliferišućih ćelija- Ki-67 pozitivnih fibroblasta u srcu nakon hroničnog izlaganja životinja ACTH tretmanu, u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,001$; Slika 23A). Pomenuti efekat bio je praćen povećanom proliferacijom vaskularnih endotelnih ćelija miokarda, koja je bila izražena u ACTH grupi: broj ćelija koje eksprimiraju Ki-67 bio je veći 1,78 puta kod ovih životinja u poređenju sa kontrolama ($p=0,005$), kao što je prikazano na Slici 23B.



Slika 23. Magnezijum ispoljava supresivne efekte na proliferaciju fibroblasta i vaskularnih endotelnih ćelija u srcu, u modelu depresivnog ponašanja, indukovanog adrenokortikotropnim hormonom (ACTH). Prilikom ispitivanja uticaja hroničnih ACTH (10 $\mu\text{g/dan}$, 21 dan, *s.c.*) i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*) tretmana, na razvoj fibroze miokarda, izvršena je imunohistohemijska analiza broja: (A) fibroblasta i (B) vaskularnih endotelnih ćelija u srcu, koje eksprimiraju marker proliferacije Ki-67. Rezultati su analizirani primenom jednofaktorske ANOVE, nakon koje je usledilo LSD *post hoc* poređenje. Vrednosti su predstavljene kao: broj Ki-67 pozitivnih ćelija na 1000 ćelija i dat je prikaz srednjih vrednosti \pm standardne greške. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

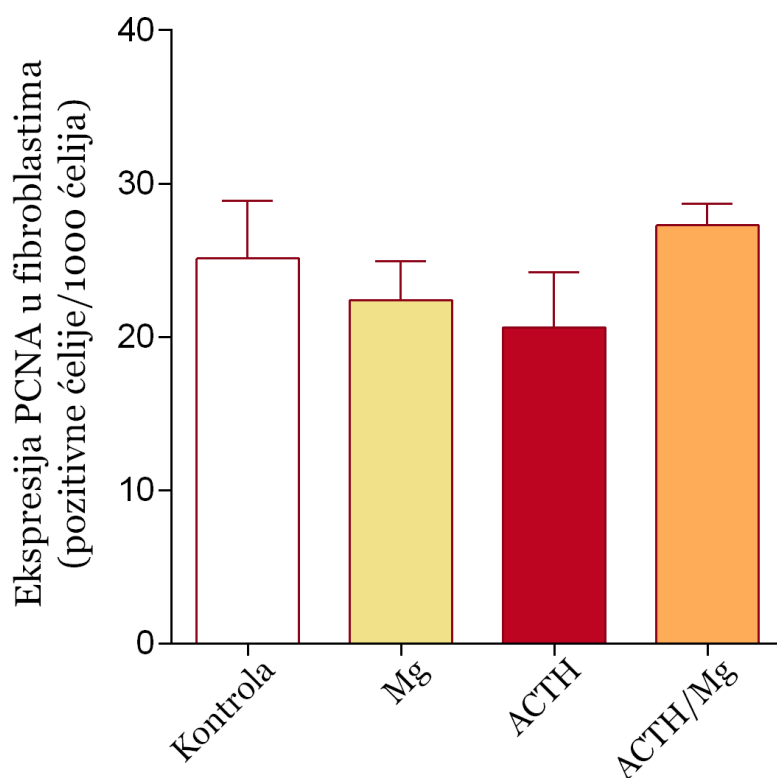
Pored toga, primećena je i povećana ekspresija anti-apoptotskog proteina Bcl-2 1,92 puta u endotelnim ćelijama malih krvnih sudova u srcu ovih životinja, nakon ACTH tretmana, u odnosu na kontrole ($p=0,015$; Slika 24).

Sa druge strane, dugotrajna primena Mg je imala kardioprotektivna svojstva i suprimirala je efekte ACTH kod eksperimentalnih životinja. Naime, u ACTH/Mg grupi Mg je značajno redukovao broj proliferišućih Ki-67 imunopozitivnih fibroblasta u srcu, 1,34 puta u poređenju sa ACTH životinjama ($p<0,001$; Slika 23A). Pored toga, Mg je suprimirao proliferaciju vaskularnih endotelnih ćelija indukovanu ACTH tretmanom, tako da je broj Ki-67 imunopozitivnih ćelija bio 1,68 puta manji kod ACTH/Mg glodara u odnosu na ACTH grupu ($p=0,006$), kao što je prikazano na Slici 23B. Pomenuti efekat bio je praćen smanjenjem ekspresije Bcl-2 proteina u endotelnim ćelijama krvnih sudova srca, 1,6 puta kod ACTH/Mg životinja u poređenju sa ACTH grupom ($p=0,006$; Slika 24).



Slika 24. Hronično izlaganje adrenokortikotropnom hormonu povećava vaskularni stres kod eksperimentalnih životinja, u modelu depresivnog ponašanja. Istraživanje efekata ACTH (10 μg/dan, 21 dan, *s.c.*) i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*) tretmana zasnivalo se i na imunohistohemijском određivanju ekspresije (A) anti-apoptotskog proteina Bcl-2 u vaskularnim endotelnim ćelijama srca. (B) Dat je prikaz fotomikrografija preseka tkiva miokarda dobijenih imunohistohemijским obeležavanjem proteina Bcl-2 (braon ćelije) u vaskularnim endotelnim ćelijama mužjaka pacova (uveličanje 400×). Prilikom analize dobijenih vrednosti korišćena je jednofaktorska ANOVA, nakon koje je usledilo LSD *post hoc* poređenje. Rezultati su prikazani kao: broj Bcl-2 imunopozitivnih ćelija na 1000 ćelija, odnosno predstavljene su srednje vrednosti ± standardna greška. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

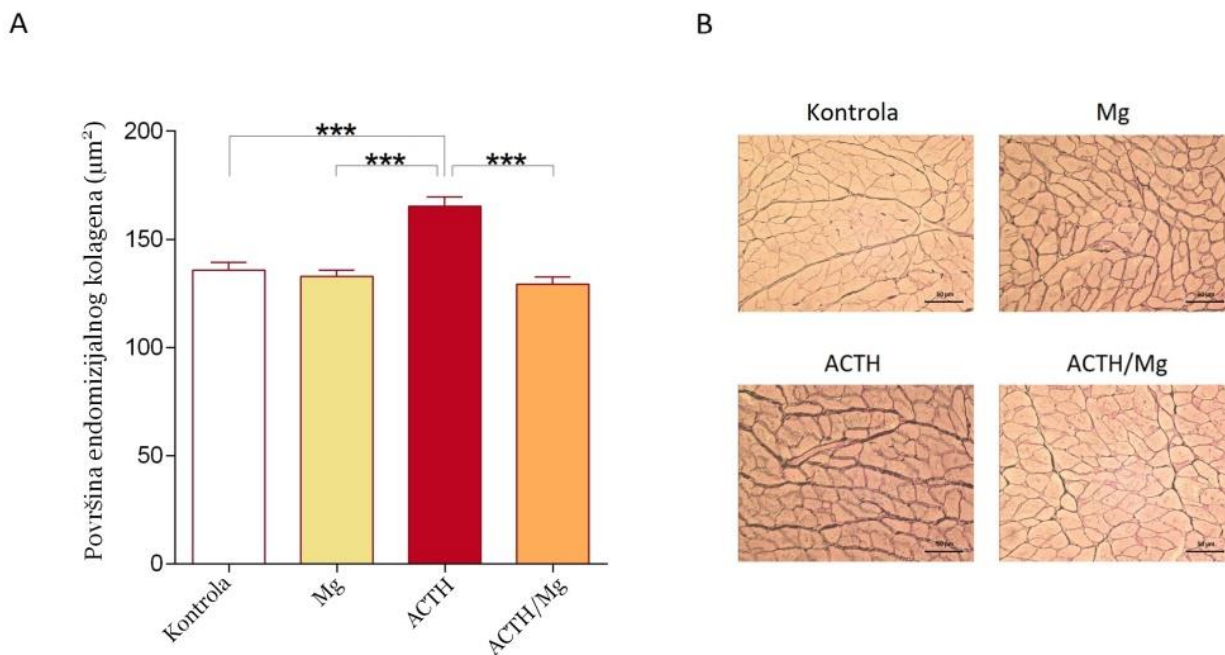
Kada je u pitanju ekspresija PCNA u fibroblastima miokarda pacova, statistička analiza nije pokazala značajne razlike, indukovane tretmanima, između eksperimentalnih grupa (Slika 25). Međutim, neophodno je istaći da literaturni podaci prevashodno ističu značaj nuklearnog faktora Ki-67 kao markera proliferišućih ćelija koji je ekspimiran tokom kasne G1, S, G2 i M faze ciklusa, i stoga pokazuje veću specifičnost kao parametar proliferacije. Sa druge strane, protein PCNA pokazuje povećanu ekspresiju tokom G1/S faze, ali i nakon oštećenja DNK molekula, u odsustvu proliferacije (Bologna-Molina i sar., 2013).



Slika 25. Hronična primena adrenokortikotropnog hormona (10 µg ACTH/dan, 21 dan, *s.c.*) i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*) kod odraslih mužjaka pacova i efekti na ekspresiju nuklearnog antigena proliferišućih ćelija (PCNA) u fibroblastima srca. Detekcija PCNA antigena je izvršena primenom imunohistohemijske analize i rezultati su obrađeni korišćenjem jednofaktorske ANOVA metode, nakon koje je usledilo LSD *post hoc* poređenje. Podaci su prikazani kao: broj PCNA imunopozitivnih ćelija na 1000 ćelija, odnosno predstavljene su srednje vrednosti ± standardna greška.

4.2.3.2. Promene u deponovanju endomizijalnog kolagena u srcu

Pored proliferacije fibroblasta, jedna od glavnih patoloških karakteristika fibroze miokarda, odnosno remodelovanja srčanog mišića, je povećano deponovanje endomizijalnog kolagena. Prilikom vizualizacije kolagena tip III (retikulinska vlakna) na presecima tkiva miokarda, nakon analize dobijenih rezultata, otkriveno je povećano deponovanje endomizijalnog kolagena kod životinja izloženih hroničnom ACTH tretmanu u odnosu na kontrole ($p < 0,001$, Slika 26). Primena Mg putem vode za piće, tokom 28 dana, imala je kardioprotektivni efekat, koji se manifestovao smanjenim deponovanjem kolagena u srcu, 1,28 puta kod ACTH/Mg glodara u poređenju sa ACTH grupom ($p < 0,001$), kao što je prikazano na Slici 26.

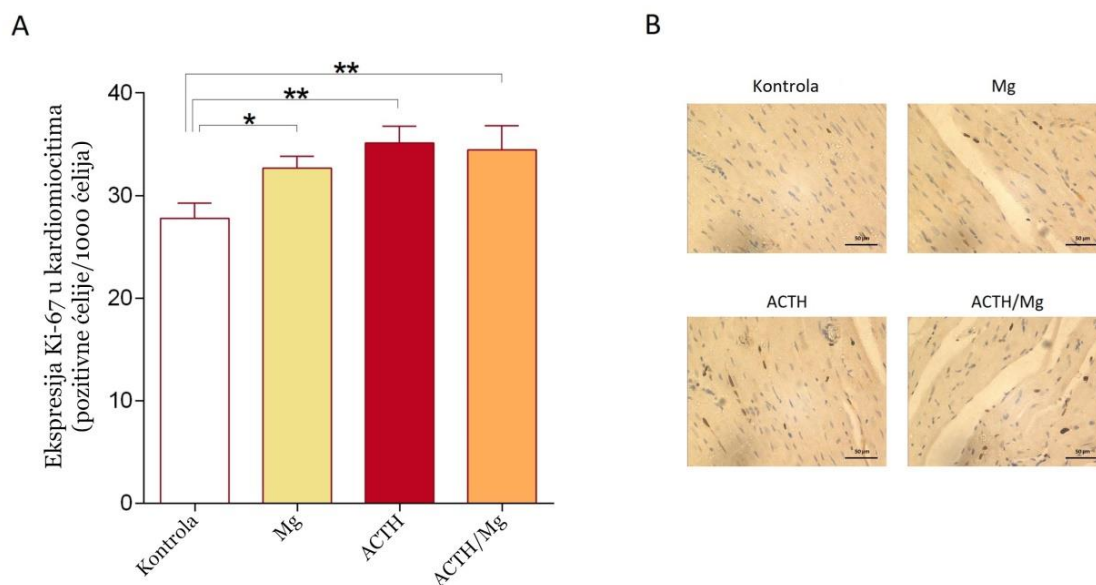


Slika 26. Hronična primena magnezijuma (Mg) inhibira remodelovanje ekstracelularnog matriksa miokarda, indukovano dugotrajnom primenom adrenokortikotropnog hormona (ACTH) kod mužjaka pacova. Prilikom vizualizacije retikulinskih vlakana (tip III kolagena), otkriveno je povećano deponovanje endomizijalnog kolagena u srcu nakon hroničnog ACTH tretmana (10 µg/dan, 21 dan, *s.c.*), dok je Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*) ispoljio supresivni efekat. Rezultati su analizirani primenom jednofaktorske ANOVA metode, nakon koje su usledili LSD *post hoc* testovi i podaci su predstavljeni kao površina endomizijalnog kolagena (µm²) (A), odnosno prikazane su srednje vrednosti ± standardna greška. (B) Dat je prikaz fotomikrografija transverzalnih preseka tkiva miokarda mužjaka pacova na kojima je izvršena analiza površine deponovanog kolagena, nakon bojenja retikulinskih vlakana po metodi koju su uveli Gordon i Sweets (uveličanje 400×).*** ($p < 0,001$).

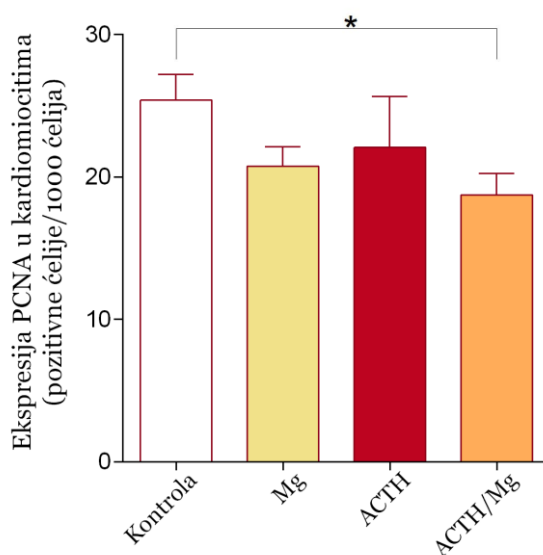
4.2.4. Uticaj hronične primene magnezijuma na proliferaciju i dijametar kardiomiocita u modelu depresije indukovane tretmanom adrenokortikotropnim hormonom mužjaka pacova

Imunohistohemijska analiza nuklearnog proteina Ki-67 u srcu, otkrila je da hronična primena ACTH, pored stimulatornog efekta na proliferaciju fibroblasta, povećava ekspresiju ovog markera i u kardiomiocitima. Naime, pokazano je da je broj srčanih mišićnih ćelija koje eksprimiraju Ki-67 1,26 puta veći kod životinja izloženih ACTH tretmanu u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,005$), kao što je predstavljeno na Slici 27. Analogno tome, primećeno je da je dugotrajna primena Mg indukovala proliferaciju srčanih mišićnih ćelija, što se manifestovalo povećanjem broja Ki-67 imunopozitivnih kardiomiocita u Mg i ACTH/Mg grupi, 1,18 i 1,24 puta u odnosu na kontrole ($p=0,024$ i $p=0,005$, redom) (Slika 27).

Sa druge strane, ekspresija proteina PCNA, kao markera koji pokazuje manju specifičnost, bila je značajno smanjena u srčanim mišićnim ćelijama ACTH/Mg glodara, u poređenju sa kontrolama ($p=0,014$), kao što je prikazano na Slici 28.

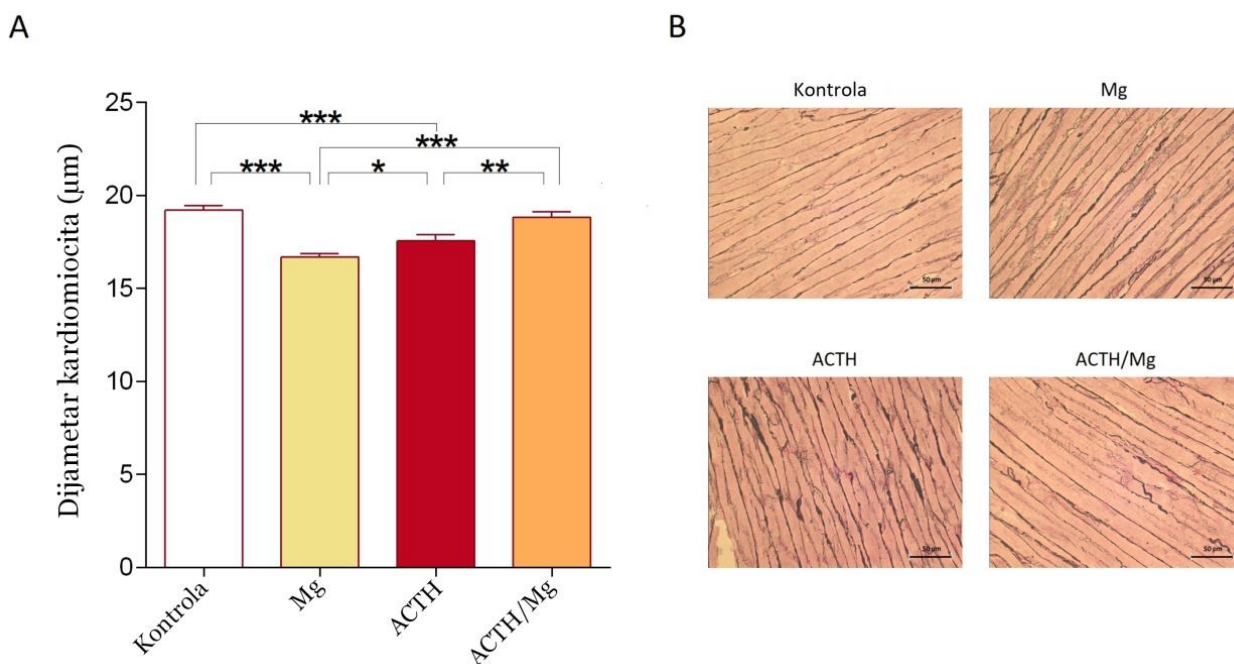


Slika 27. Proliferativni odgovor kardiomiocita nakon hroničnih tretmana adrenokortikotropnim hormonom (ACTH) i magnezijumom (Mg). Primenom imunohistohemijske metode detekcije praćeni su efekti ACTH (10 µg/dan, 21 dan, *s.c.*) i Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*) tretmana na ekspresiju markera proliferacije Ki-67 u kardiomiocitima (A), kod odraslih mužjaka pacova. (B) Prikaz fotomikrografija preparata tkiva miokarda dobijenih prilikom imunohistohemijske analize nuklearnog faktora Ki-67 u kardiomiocitima (braon ćelije) mužjaka pacova (uveličanje 400×). Prilikom analize rezultata korišćena je jednofaktorska ANOVA, nakon koje je usledilo LSD *post hoc* poređenje i vrednosti su prikazane kao: broj Ki-67 pozitivnih ćelija na 1000 ćelija, odnosno predstavljene su srednje vrednosti ± standardne greške. * ($p < 0,05$) i ** ($p < 0,01$).



Slika 28. Efekti hroničnih tretmana adrenokortikotropnim hormonom (10 µg ACTH/dan, 21 dan, *s.c.*) i magnezijumom (300 mg Mg/L, 28 dana, *per os*) na ekspresiju nuklearnog antigena proliferišućih ćelija (PCNA) u kardiomiocitima. Imunohistohemijском metodom je izvršeno ispitivanje ekspresije PCNA antigena u kardiomiocitima odraslih mužjaka pacova i rezultati su analizirani primenom jednofaktorske ANOVA metode, kao i LSD *post hoc* testova. Vrednosti su predstavljene kao: broj PCNA imunopozitivnih ćelija na 1000 ćelija, odnosno dat je prikaz srednjih vrednosti ± standardne greške. * ($p < 0,05$).

Kada je u pitanju transnuklearni dijametar kardiomiocita, pokazano je značajno smanjenje ovog parametra nakon hroničnog ACTH tretmana, u odnosu na životinje kontrolne grupe ($p < 0,001$; Slika 29). Međutim, neophodno je istaći da patološko remodelovanje srca nije isključivo vezano za povećanje dijametra srčanih mišićnih ćelija. Primera radi, ekscentrična hipertrofija srca se odlikuje poremećajem kontraktilnog aparata, odnosno serijskim povezivanjem većeg broja sarkomera, što rezultuje povećanjem dužine ćelije i često smanjenjem dijametra kardiomiocita (Kehat i sar., 2011). Sa druge strane, transnuklearni dijametar srčanih mišićnih ćelija je bio značajno veći kod životinja ACTH/Mg grupe, u odnosu na ACTH, ali i Mg grupu ($p = 0,002$ i $p = 0,000$, redom), kao što je prikazano na Slici 29.



Slika 29. Uticaj hroničnih tretmana adrenokortikotropnim hormonom (10 µg ACTH/dan, 21 dan, s.c.) i magnezijumom (300 mg Mg/L, 28 dana, per os) na dijametar kardiomiocita eksperimentalnih životinja. Prilikom vizualizacije argentafilnih retikulinskih vlakana (kolagen tip III) u srcu, analiziran je transnuklearni dijametar longitudinalno orijentisanih kardiomiocita odraslih mužjaka pacova (A). Dat je prikaz odgovarajućih fotomikrografija preparata tkiva miokarda, nakon retikulinskog bojenja (B). Rezultati su analizirani korišćenjem jednofaktorske ANOVA metode, kao i LSD *post hoc* poređenja i prikazane su srednje vrednosti ± standardne greške. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

4.3. Treća eksperimentalna faza

4.3.1. Uticaj različitih uslova za *in vitro* kultivaciju na vijabilnost i fenotip kardiomiocita formiranih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija

U trećoj fazi istraživanja, u cilju razvoja i optimizacije trodimenzionalnog modela sferoida humanih kardiomiocita, ispitivan je uticaj različitih medijuma za ćelijske kulture na vijabilnost, kao i fenotipske karakteristike ćelija.

Svega 24 h nakon zasejavanja komercijalno dostupnih kardiomiocita, nastalih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija, primećeno je, pod svetlosnim mikroskopom, da ćelije u kulturi

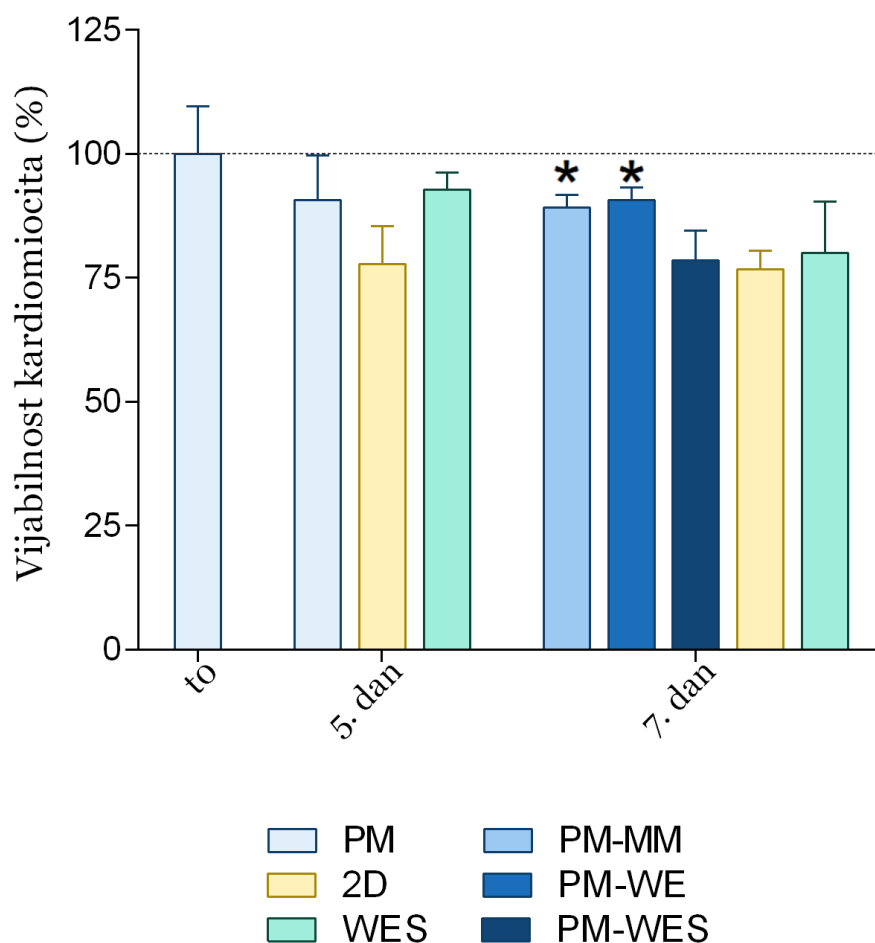
spontano generišu impulse praćene kontrakcijama. Pomenuta osobina zadržala se tokom ćitavog perioda u kulturi i ispoljila se u razlićitim medijumima koji su korišćeni.

Analiza efekata razlićitih uslova za *in vitro* kultivaciju ćelija, odnosno primene razlićitih medijuma, zasnivala se delom i na detekciji nivoa ATP u pojedinaćnim sferoidima (bunarićima ULA ploće). Naime, smatra se da je ćelijski ATP marker vijabilnosti i stoga je određivanje njegove koncentracije izvršeno na dan zasejavanja ćelija, potom petog i sedmog dana u kulturi. Uzimajući da je vijabilnost ćelija na dan zasejavanja (t_0) iznosila 100%, nakon pet dana u kulturi najmanja vijabilnost zabeležena je u 2D tradicionalnom modelu i srednja vrednost je iznosila 77,71%, dok je u 3D modelima u ćelijama zasejanim u PM i WES bila 90,68% i 92,76%, redom. Međutim, između navedenih vrednosti statistićka analiza nije pokazala znaćajne razlike (Slika 30). Sedmog dana u kulturi najmanja vijabilnost kardiomiocita primećena je u 2D tradicionalnom modelu i srednja vrednost je bila 76,69%. Sa druge strane, najveću vijabilnost pokazali su kardiomiociti u 3D modelu sferoida, odnosno ćelije zasejane u PM i nakon pet dana prebaćene u WE medijum, pri ćemu je srednja vrednost nakon sedam dana u kulturi bila 90, 63%, kao što je prikazano u Tabeli X i na Slici 30. Takođe, Studentov t test je pokazao da je vijabilnost ćelija bila znaćajno veća u 3D modelu sferoida, ćelija zasejanih u PM i potom prebaćenih u MM ili WE medijum u poređenju sa kardiomiocitima u 2D kulturi ($p=0,035$ i $p=0,024$, redom).

Vijabilnost kardiomiocita, odnosno srednje vrednosti izraćene u procentima, u razlićitim medijumima za ćelijske kulture nakon sedam dana od zasejavanja, prikazane su u Tabeli X i na Slici 30.

Tabela X. Ispitivanje uticaja razlićitih medijuma na nivo ATP, parametra vijabilnosti kardiomiocita u kulturi. Rezultati su prikazani u tabeli i predstavljaju srednje vrednosti dobijene nakon sedam dana od zasejavanja ćelija. PM-MM, prilikom zasejavanja ćelija korišćen je Plating Medium (PM), potom su, nakon pet dana u kulturi, ćelije prebaćene u Maintenance Medium (MM), ili u William's E Medium (PM-WE), ili u William's E Medium u koji su dodati suplementi (PM-WES); WES-WES, tokom zasejavanja ćelija, kao i ćitavog perioda u kulturi, korišćen je William's E Medium u koji su dodati suplementi.

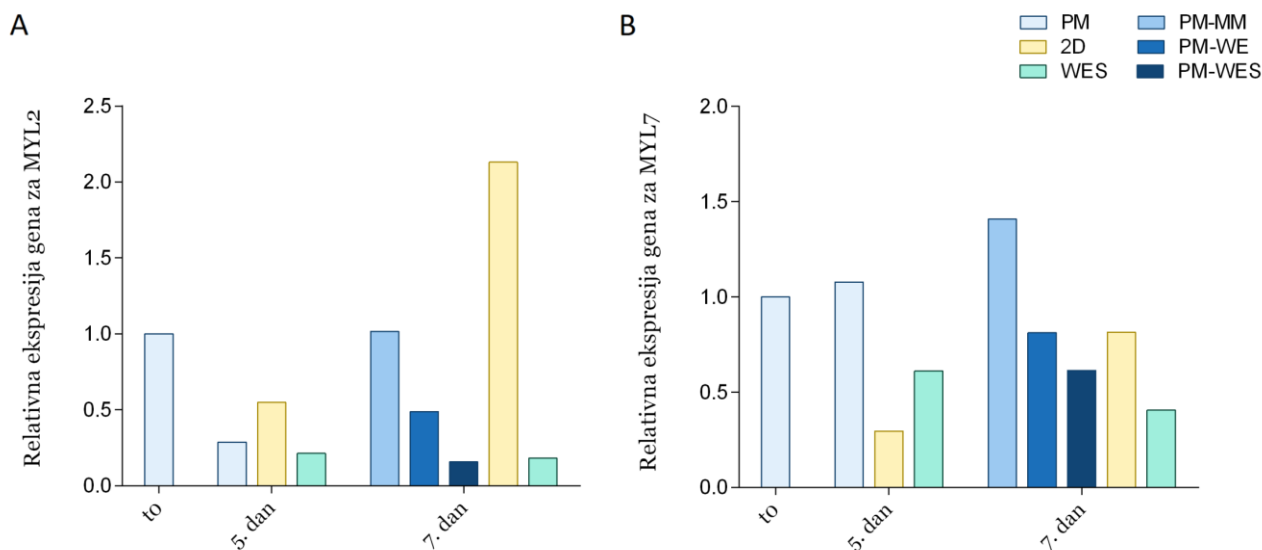
Uslovi za <i>in vitro</i> kultivaciju ćelija (medijum za ćelijske kulture)	Vijabilnost ćelija (%)
Tradicionalna 2D kultura kardiomiocita	76,69
3D sferoidi humanih kardiomiocita, PM-MM	89,24
3D sferoidi humanih kardiomiocita, PM-WE	90,63
3D sferoidi humanih kardiomiocita, PM-WES	78,48
3D sferoidi humanih kardiomiocita, WES-WES	80



Slika 30. Ispitivanje uticaja različitih uslova za *in vitro* kultivaciju ćelija na vijabilnost kardiomiocita nastalih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija. Prilikom izbora odgovarajućeg medijuma za ćelijske kulture i optimizacije uslova, određivan je nivo ATP u pojedinačnim sferoidima kardiomiocita, kao marker vijabilnosti ćelija. Podaci su analizirani primenom Studentovog t testa i prikazane su srednje vrednosti \pm standardne greške. Rezultati su izraženi u procentima, pri čemu se smatra da vijabilnost ćelija na dan zasejavanja (t0) iznosi 100%. * ($p < 0,05$) u odnosu na 2D kulturu kardiomiocita. D5 i D7, peti, odnosno sedmi dan nakon zasejavanja ćelija; 2D, tradicionalna dvodimenzionalna kultura kardiomiocita; 3D, trodimenzionalni model ćelijskih kultura; PM, Plating Medium; PM-MM, ćelije su zasejane u PM i nakon formiranja sferoida (nakon pet dana u kulturi), korišćen je Maintenance Medium (MM); PM-WE ili PM-WES, ćelije su zasejane u PM i nakon formiranja sferoida prebačene su u William's E Medium (WE) ili u William's E Medium u koji su dodati suplementi (WES); WES-WES, prilikom zasejavanja ćelija, kao i tokom perioda u kulturi, korišćen je William's E Medium u koji su dodati suplementi.

U cilju ispitivanja fenotipskih osobina humanih kardiomiocita u 3D modelu sferoida, analizirana je ekspresija specifičnih gena: *MYL2*, *MYL7*, *PLN* i *NKX2.5* metodom lančane polimerizacije. Primećeno je da, kada je reč o sferoidima formiranim od ćelija koje su zasejane u PM, a potom prebačene u WE, uprkos tome što je došlo do neznatnog smanjenja u poređenju sa t0 (dan zasejavanja ćelija), ekspresija *MYL2*, *MYL7* i *PLN* je bila relativno nepromenjena tokom čitavog perioda u kulturi, kao što je prikazano na Slici 31 i Slici 32. Naime, *MYL2*, *MYL7* i *PLN* kodiraju proteine od ključnog značaja u regulaciji i očuvanju kontraktilnosti srčanih mišićnih ćelija (England i sar., 2013; Haghghi i sar., 2014; Sheikh i sar., 2015; Anderson i sar., 2018). Sa druge strane, kada su u pitanju ćelije koje su zasejane u WES i potom i period kultivacije provele u tom medijumu, pokazano je da je nakon sedam dana u kulturi ekspresija *MYL2*, *PLN* i *MYL7* bila

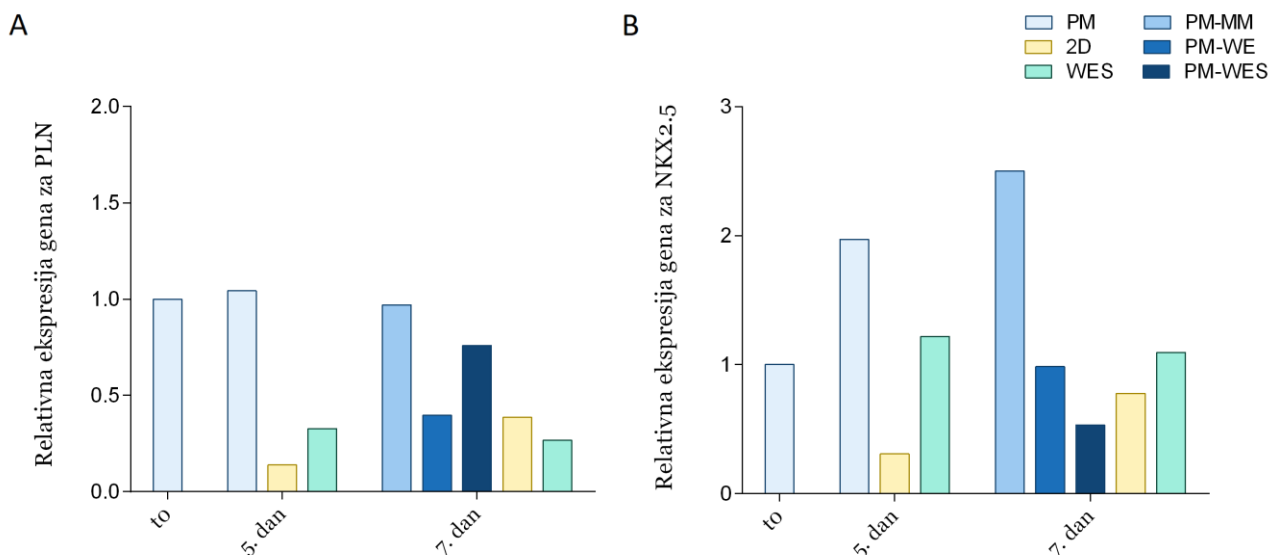
smanjena, redom: 5,5, 3,7 i 2,5 puta, u odnosu na t0 (Slika 31 i Slika 32). Pored toga, u kardiomiocitima koji su zasejani u PM i nakon formiranja sferoida prebačeni u WES, ekspresija *MYL2* je posle sedam dana bila smanjena 6,25 puta u odnosu na t0 (Slika 31).



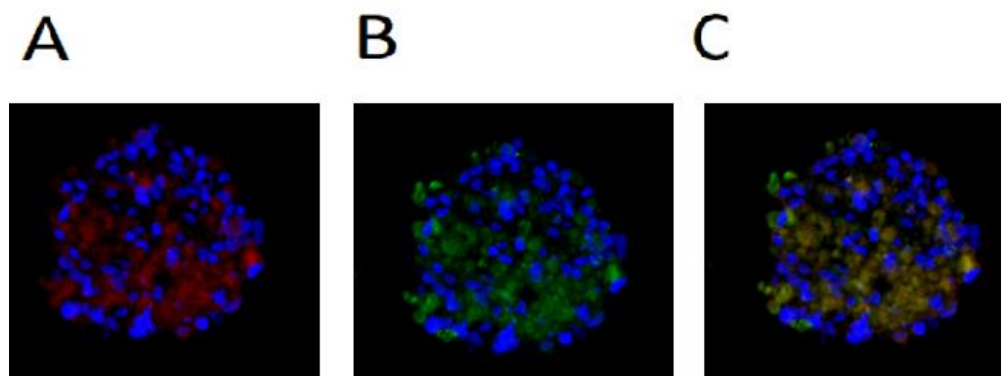
Slika 31. Ispitivanje uticaja različitih uslova za *in vitro* kultivaciju ćelija na ekspresiju gena *MYL2* i *MYL7* u kardiomiocitima formiranim indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija. Prikazana je relativna ekspresija iRNK za kardiospecifične gene (A) *MYL2* i (B) *MYL7* u 2D i 3D modelu kultura humanih kardiomiocita, pri čemu su rezultati normalizovani u odnosu na *ACTB*, gen koji kodira β -aktin. t0, dan zasejavanja kardiomiocita; D5 i D7, peti, odnosno sedmi dan nakon zasejavanja ćelija; 2D i 3D, dvodimenzionalna i trodimenzionalna ćelijska kultura; PM, Plating Medium; PM-MM, ćelije su zasejane u PM i nakon pet dana u kulturi, kada su formirani sferoidi, izvršen je transfer u Maintenance Medium (MM); PM-WE ili PM-WES, ćelije su zasejane u PM i nakon formiranja sferoida korišćen je William's E Medium (WE) ili William's E Medium u koji su dodati suplementi (WES); WES-WES, prilikom zasejavanja ćelija, kao i tokom perioda u kulturi, korišćen je William's E Medium u koji su dodati suplementi.

Pored analize genske ekspresije, imunofluorescentnom metodom je ispitivana struktura kardiomiocita humanih sferoida, kao i promene tokom perioda kultivacije u različitim medijumima. Primenom navedene tehnike bojenja, izvršena je detekcija proteina citoskeleta sarkomera filamentoznog (F) aktina, kao i α -aktinina, proteina koji obezbeđuje stabilnost sarkomere i omogućava povezivanje aktinskih filamenata. U ćelijama koje su zasejane u PM i nakon stvaranja sferoida prebačene u WE, nakon sedam dana u kulturi, uočena je ko-lokalizacija pomenutih strukturnih proteina, kao i očuvane morfološke karakteristike kardiomiocita (Slika 33).

Shodno navedenim rezultatima i opažanjima, definisani su optimalni uslovi za naredni korak u ovoj eksperimentalnoj fazi, u svrhu određivanja potencijalnih *in vitro* efekata ACTH na sferoide humanih kardiomiocita. Pod optimalnim uslovima se podrazumeva zasejavanje ćelija u PM i nakon formiranja kompaktnih sferoida (nakon pet dana u kulturi) transfer u WE.



Slika 32. Efekti primene različitih uslova za *in vitro* kultivaciju ćelija na ekspresiju gena *PLN* i *NKX2.5* u kardiomiocitima formiranim indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija. Dat je prikaz relativne ekspresije iRNK za kardiospecifične gene (A) *PLN* i (B) *NKX2.5* u tradicionalnom 2D, kao i 3D modelu sferoida humanih kardiomiocita. Prilikom analize rezultata, dobijene vrednosti su normalizovane u odnosu na ekspresiju *ACTB*, gena koji kodira β -aktin. t0, dan zasejavanja kardiomiocita; D5 i D7, peti, odnosno sedmi dan nakon zasejavanja ćelija; 2D i 3D, dvodimenzionalna i trodimenzionalna ćelijska kultura; PM, Plating Medium; PM-MM, ćelije su zasejane u PM i nakon pet dana u kulturi, kada su formirani sferoidi, izvršen je transfer u Maintenance Medium (MM); PM-WE ili PM-WES, ćelije su zasejane u PM i nakon formiranja sferoida korišćen je William's E Medium (WE) ili William's E Medium u koji su dodati suplementi (WES); WES-WES, prilikom zasejavanja ćelija, kao i tokom perioda u kulturi, korišćen je William's E Medium u koji su dodati suplementi.



Slika 33. Morfološka karakterizacija 3D modela sferoida kardiomiocita nastalih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija. Prikazane su ćelije zasejane u Plating Medium (PM) i nakon formiranja kompaktnih sferoida prebačene u William's E Medium (WE). Fotomikrografije smrznutih i fiksiranih preseka sferoida humanih kardiomiocita, u kojima su, nakon sedam dana u kulturi, imunofluorescentnom metodom obeleženi proteini miofibrila: (A) filamentozni (F) aktin (crvena) i (B) α -aktinin (zeleni). Prilikom vizualizacije, korišćena je i DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), nuklearna boja koja se vezuje za adenin-timin regione u DNK molekulu (plava). Na fotomikrografiji nastaloj preklapanjem (C), primećena je kolokalizacija obeleženih strukturalnih proteina kardiomiocita.

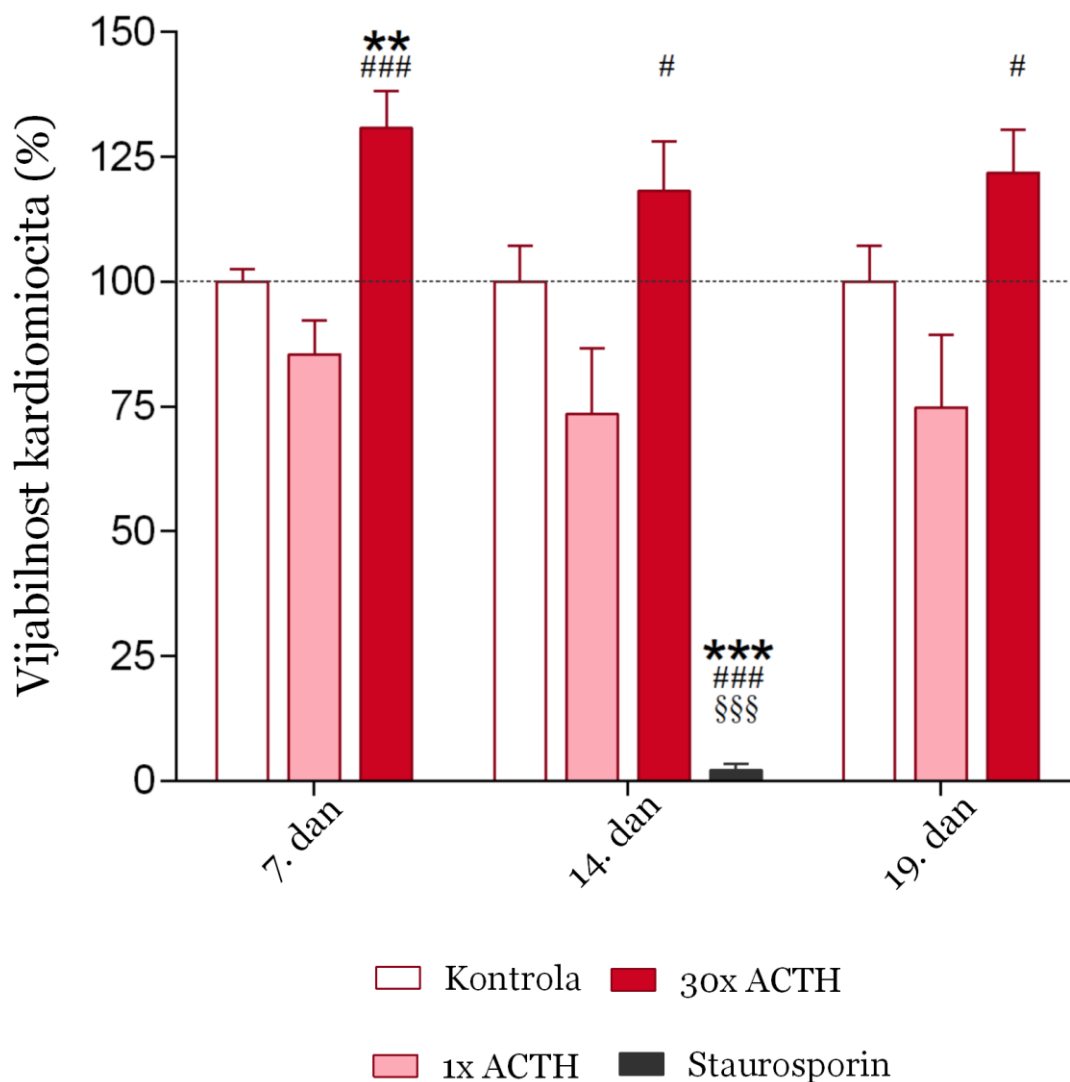
4.3.2. Ispitivanje potencijalnih efekata ACTH na vijabilnost i gensku ekspresiju kardiomiocita formiranih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija u *in vitro* modelu sferoida

Prilikom izlaganja ćelija fiziološkim (22 ng/L; 1x ACTH) i suprafiziološkim (660 ng/L; 30x ACTH) koncentracijama ACTH, nakon 7, 14 i 19 dana tretmana, analizirani su sledeći parametri: 1) vijabilnost ćelija, 2) nivo aktivirane kaspaze 3 i 3) genska ekspresija.

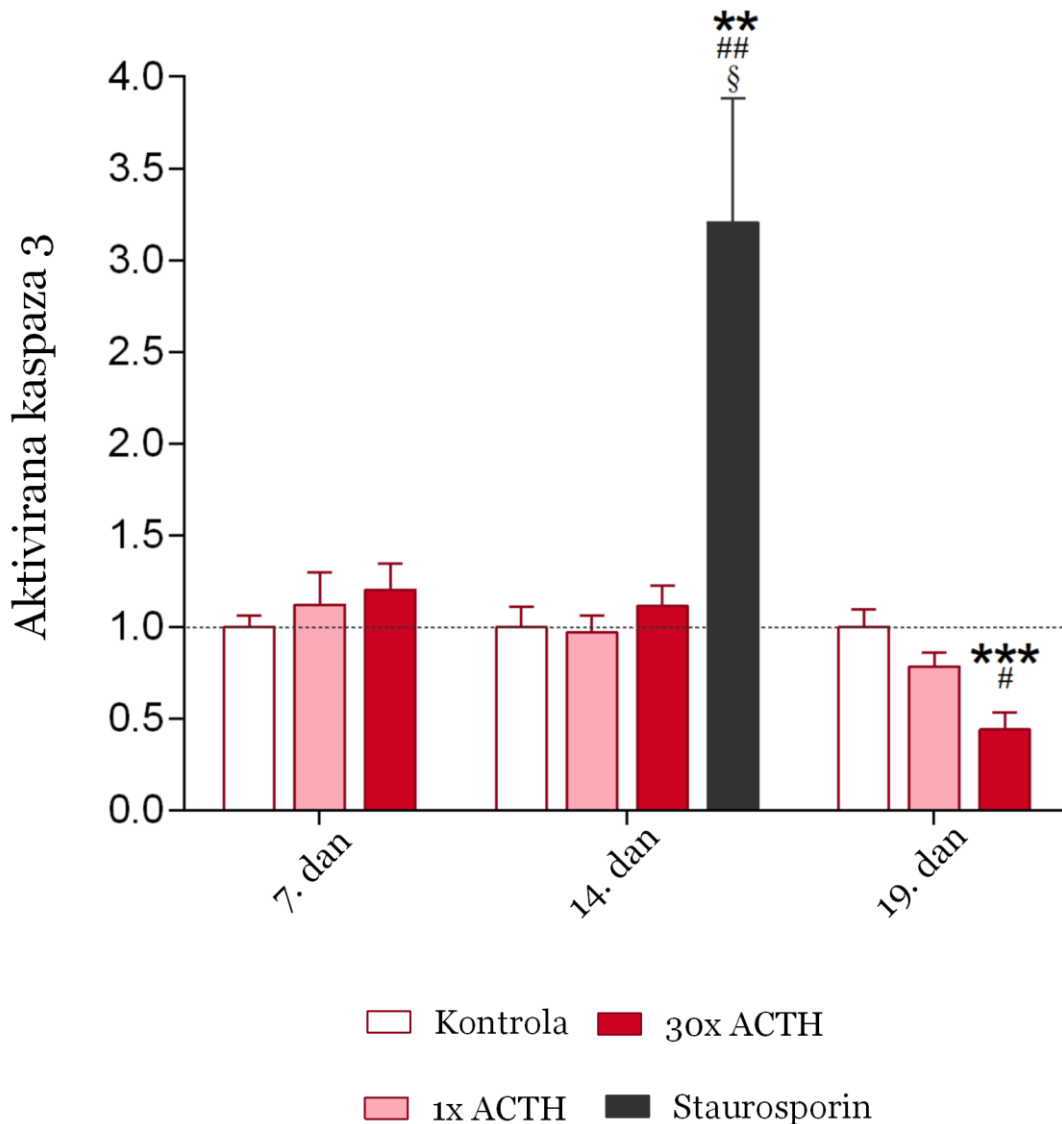
Uticaj ACTH, kao molekuskog medijatora stresa, na vijabilnost ćelija određivan je detekcijom nivoa ATP u pojedinačnim sferoidima kardiomiocita, merenjem luminescencije. Pri tom, otkriveno je da dugotrajni tretman fiziološkim i visokim koncentracijama ACTH ne ispoljava toksično delovanje na humane kardiomiocite. Naime, vijabilnost ćelija u tretiranim sferoidima (1x ACTH i 30x ACTH) je bila veća od 80% i statistička analiza je pokazala odsustvo značajne razlike između tretiranih i netretiranih (kontrolnih) sferoida. Pored toga, uzimajući u obzir sve vremenske tačke, odnosno izlaganje fiziološkim i visokim koncentracijama ACTH tokom 7, 14 i 19 dana, prosečna vijabilnost kardiomiocita bila je 104% (Slika 34).

Međutim, primećeno je da je nivo ATP značajno povišen u sferoidima kardiomiocita izloženim visokim koncentracijama ACTH u odnosu na ćelije tretirane fiziološkim koncentracijama ACTH ($p=0,0001$, $p=0,01$ i $p=0,02$, nakon 7, 14 i 19 dana tretmana, redom), kao što je prikazano na Slici 34. Sa druge strane, analiza genske ekspresije markera *Ki-67*, pokazala je odsustvo ćelijske proliferacije u sferoidima kardiomiocita tretiranim visokim koncentracijama ACTH. Naime, ekspresija gena koji kodira nuklearni faktor *Ki-67* nije se razlikovala između netretiranih i sferoida tretiranih sa 1x ACTH, kao i 30x ACTH, tokom 7, 14 i 19 dana. Takođe, kada se razmatraju sve vremenske tačke, nije bilo značajne razlike u ekspresiji *MYL2*, *PLN*, kao ni *NKX2.5* u sferoidima izloženim hroničnom tretmanu sa 1x ACTH, kao i 30x ACTH, u odnosu na netretirane kardiomiocite.

Sa druge strane, merenjem vrednosti aktivirane kaspaze 3, koja je ostala niska tokom perioda u kulturi, primećeno je da izlaganje humanih kardiomiocita ACTH tretmanu (1x ACTH i 30x ACTH) ne indukuje porast apoptoze u odnosu na netretirane ćelije (Slika 35). Pored svega, nakon 19 dana ACTH tretmana zabeleženo je dozno-zavisno smanjenje nivoa aktivirane kaspaze 3, kao što je predstavljeno na Slici 35.



Slika 34. Efekti tretmana adrenokortikotropnim hormonom (ACTH) na vijabilnost humanih kardiomiocita u 3D modelu sferoida. Prilikom ispitivanja potencijalnih direktnih efekata ACTH, kao marker vijabilnosti, određivan je nivo ATP u pojedinačnim sferoidima humanih kardiomiocita formiranih indukcijom pluripotentnih stem ćelija. Određivan je uticaj tretmana fiziološkim (1x ACTH = 22 ng/L) i suprafiziološkim (30x ACTH = 660 ng/L) koncentracijama ACTH i kao negativna kontrola korišćene su ćelije koje su tokom 24 h bile izložene 1 μ M rastvoru staurosporina, potentnom induktoru apoptoze. Rezultati su analizirani primenom Studentovog t testa i izraženi su u procentima, uzimajući da je vijabilnost netretiranih sferoida (Kontrola) iznosila 100%. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne greške i pri tom je za svaku vremensku tačku korišćeno n = 10-16 sferoida po tretmanu. ** (p < 0,01) i *** (p < 0,001) u odnosu na netretirane sferoide (Kontrola); # (p < 0,05) i ### (p < 0,001) u poređenju sa sferoidima kardiomiocita koji su izloženi tretmanu sa 1x ACTH; §§§ (p < 0,001) u odnosu na sferoide humanih kardiomiocita tretirane sa 30x ACTH.



Slika 35. Efekti izlaganja adrenokortikotropnom hormonu (ACTH) na vrednosti aktivirane kaspaze 3 u 3D modelu sferoida humanih kardiomiocita. Prilikom istraživanja potencijalnih *in vitro* efekata ACTH, kao marker apoptoze, određivan je nivo aktivirane kaspaze 3 u pojedinačnim sferoidima kardiomiocita nastalih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija. Ispitivan je uticaj tretmana fiziološkim (1x ACTH = 22 ng/L) i suprafiziološkim (30x ACTH = 660 ng/L) koncentracijama ACTH, i pri tom su kao pozitivna kontrola primenjene ćelije koje su tokom 24 h bile izložene 1 μ M rastvoru staurosporina, induktora apoptoze. Dobijene vrednosti su analizirane Studentovim t testom i za svaku vremensku tačku primenjeno je n = 10-16 sferoida po tretmanu. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne greške, uzimajući da je vrednost aktivirane kaspaze 3 u humanim kardiomiocitima netretiranih sferoida (Kontrola) iznosila 1. ** (p < 0,01) i *** (p < 0,001) u odnosu na netretirane sferoide (Kontrola); # (p < 0,05) i ## (p < 0,01) u poređenju sa sferoidima kardiomiocita koji su izloženi tretmanu sa 1x ACTH; § (p < 0,05) u odnosu na sferoide humanih kardiomiocita tretirane sa 30x ACTH.

5. DISKUSIJA

5.1. Uticaj hroničnog tretmana magnezijumom na ponašanje mužjaka pacova u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive

Rezultati prve eksperimentalne faze upućuju na bihevioralne efekte magnezijuma u modelu depresivnog ponašanja indukovano hroničnom primenom ACTH kod mužjaka pacova. U pomenutom modelu depresije, za koji su prethodna istraživanja pokazala da odražava fenotip rezistentan na primenu tricikličnih antidepresiva, prvi put je pokazana anksiolitička i antidepresivna aktivnost magnezijuma, primenjenog peroralnim putem (300 mg Mg/L vode za piće) i u trajanju od 28 dana, kod eksperimentalnih životinja. Promene u ponašanju glodara, nakon dugotrajnog izlaganja ACTH, kao i Mg tretmanu, manifestovale su se promenama odgovarajućih parametara koji su praćeni u bihevioralnim testovima: testu otvorenog polja i testu forsiranog plivanja.

U istraživanjima sprovedenim u sklopu ove doktorske disertacije uspostavljen je animalni model depresivnog ponašanja zasnovan na protokolu tretmana adrenokortikotropnim hormonom koji je veoma sličan protokolu koji je korišćen u nekoliko studija, i pri tom podrazumeva supkutano primenu ACTH (1-24) kod glodara (miševa ili pacova), u dozi od 100 µg/dan i trajanju od 3, 7, 14 ili 21 dan (Kitamura i sar., 2002a, 2008a, 2008b, 2008c, 2010, 2014; Iwai i sar., 2013; Walker i sar., 2013; Kim i sar., 2016).

Naime, pokazano je da hronična primena ACTH indukuje porast aktivnosti HPA ose i istovremeno povećava gustinu serotonergičkih 5-HT_{2A} receptora (Kuroda i sar., 1992). U skladu sa jednom od prihvaćenih hipoteza, koje objašnjavaju nastanak depresivnog poremećaja, receptori za serotonin, prevashodno 5-HT_{2A} podtip, ispoljavaju značajnu ulogu u patofiziologiji ovog psihijatrijskog oboljenja (Arango i sar., 1990; Arora i Meltzer, 1989; Biegon i sar., 1987; Mann i sar., 1986; Pandey i sar., 2002). U *post mortem* studijama je primećena povećana ekspresija 5-HT_{2A} receptora u mozgu kod osoba koje su patile od depresije (Kitamura 2008c).

U prvom setu eksperimenata u našem istraživanju, prilikom praćenja promena u ponašanju mužjaka pacova, otkriveno je da ACTH (10 µg/dan, 21 dan, *s.c.*) ispoljava proanksiogeni efekat. Pomenuti efekat se ogleda u činjenici da su životinje izložene ACTH tretmanu tokom OFT značajno kraći put prešle i manje vremena provele u centralnoj zoni polja, u poređenju sa životinjama iz kontrolne grupe. Povrh toga, hronična primena ACTH nije uticala na spontanu lokomotornu aktivnost životinja. Naime, ACTH, kao glavni regulator sekrecije glukokortikoida, je indukovao hiperaktivnost HPA ose, praćenu porastom hormona stresa-kortikosterona u plazmi, što je dovelo do povlačenja životinja u periferne delove arene za OFT i smanjene eksplorativne aktivnosti, što sve zajedno upućuje na ponašanje slično anksioznosti. Nasuprot tome, dugotrajna primena Mg (300 mg magnezijuma/L, 28 dana, *per os*), putem vode za piće, imala je anksiolitičko delovanje kod ovih životinja i značajno je produžila vreme provedeno u centralnoj zoni polja za OFT.

U prilog našim rezultatima govori činjenica da i u drugim animalnim studijama ACTH tretman nije uticao na spontanu lokomotornu aktivnost glodara, odnosno na ukupni pređeni put tokom OFT (Kitamura i sar., 2002a; Kim i sar., 2016; Pereira i sar., 2019). Međutim, u istraživanju koje su sproveli Walker i saradnici (2013), ACTH (100 µg/dan, 14 dana) nije ispoljio anksiogeni efekat i prilikom izvođenja OFT nije bilo značajnih razlika između eksperimentalnih grupa u vremenu provedenom u centralnom delu polja. Navedena odstupanja se mogu objasniti razlikama u izboru doze ACTH, kao i u dužini tretmana. Sa druge strane, u velikom broju prekliničkih modela potvrđeno je da izlaganje hroničnom stresu, kao i egzogenoj primeni glukokortikoida, dovodi do

razvoja depresivnog fenotipa, uz prateće simptome anksioznosti (Grippe i sar., 2008; Murray i sar., 2008; Donner i sar., 2012; Chang i sar., 2016; Gong i sar., 2018; Wang i sar., 2018; Mohammadi i sar., 2019; Liu i sar., 2020). Naime, Donner i saradnici (2012) su pokazali da je neinvazivna, dugotrajna primena kortikosterona (400 mg/L, 21 dan) ispoljila izražen anksiojeni efekat kod mužjaka pacova, koji se manifestovao u bihevioralnim testovima- OFT i uzdignutom plus lavirintu (eng. *elevated plus maze*, EPM). Pomenuti efekat se odrazio na vreme provedeno u centralnom delu arene za OFT, koje je bilo skraćeno kod životinja izloženih kortikosteronu, kao i na broj ulazaka i vreme provedeno u otvorenim kracima EPM, koji su bili značajno smanjeni u ovoj ekperimentalnoj grupi (Donner i sar., 2012). Pored toga, u modelu depresivnog ponašanja, indukovano ponavljanim izlaganjem glodara stresu imobilizacije u trajanju od 3 h, tokom tri nedelje, kod ovih životinja su se razvili simptomi slični anksioznosti udružene sa depresivnim poremećajem (Mohammadi i sar., 2019). Pomenuta simptomatologija se reflektovala na vreme provedeno u centralnoj zoni polja za OFT, koje je bilo skraćeno kod ovih životinja, kao i na broj ulazaka i vreme provedeno u otvorenim kracima EPM, koji su bili smanjeni kod ovih životinja u odnosu na kontrole (Mohammadi i sar., 2019).

U našoj studiji, hronična primena ACTH kod eksperimentalnih životinja, kao jednog od ključnih molekularskih medijatora stresa, dovela je do razvoja depresivnog ponašanja, što se manifestovalo prilikom izvođenja FST značajnim porastom vremena imobilnosti, kao i skraćenim vremenom provedenim u plivanju. Do danas, sproveden je veliki broj istraživanja u kojima su kod eksperimentalnih životinja opisane bihevioralne promene koje odgovaraju depresivnoj simptomatologiji i nastupaju nakon izlaganja jedinke hroničnom stresu. Pokazano je da različiti oblici hroničnog stresa, uključujući stres socijalne izolacije, hronični blagi ili stres nepredvidive prirode, stres uzrokovan fizičkim sputavanjem, ponavljano imobilizacijom životinje, maternalnom deprivacijom, kao i dugotrajna primena glukokortikoida, indukuju razvoj promena u ponašanju koje reflektuju depresivni fenotip (Grippe i sar., 2008; Murray i sar., 2008; Donner i sar., 2012; Gong i sar., 2018; Shepard i sar., 2018; Mohammadi i sar., 2019; Xie i sar., 2019; Liu i sar., 2020). Smatra se da je Porsoltov FST jedan od najpouzdanijih skrining testova, koji se primenjuje u cilju validacije modela depresije i ispitivanja potencijalnih novih antidepresiva, zahvaljujući praćenju relevantnih parametara, indikativnih za ovaj afektivni poremećaj (Porsolt i sar., 1978; Rotzinger i sar., 2010). Parametri koji se prate tokom FST, prevashodno produženo vreme imobilnosti, kao i skraćeno vreme provedeno u plivanju i penjanju uz zidove staklenog cilindra, su usvojeni kao pokazatelji osećaja bespomoćnosti kod životinje, odnosno odsustva nade i volje da pronade izlaz iz stresne situacije (Detke i Lucki, 1996; Can i sar., 2012). Tako je, na primer, u studiji Donner i sar. (2012), primenom neinvazivnog modela hiperkortizolemije, pokazano da se kod odraslih mužjaka pacova nakon tronedeljnog tretmana kortikosteronom (100 µg/mL ili 400 µg/mL) razvija depresivna simptomatologija koja se tokom izvođenja FST manifestuje izraženim porastom vremena imobilnosti, kao i redukovanim vremenom provedenim u penjanju uz cilindar. Takođe, u modelu rane socijalne izolacije, Gong i sar. (2018) su primetili da se, nakon 8 dana izolacije, tokom forsiranog plivanja javlja značajno povećanje vremena imobilnosti kod miševa. U skladu sa ovim nalazima, kao i našim rezultatima, u studiji koju su sprovedeli Liu i sar. (2020), u modelu hroničnog blagog stresa, zabeležen je primetan porast vremena imobilnosti kod miševa.

Interesantno je pomenuti i druga istraživanja u kojima je praćen uticaj ponavljane primene ACTH na ponašanje eksperimentalnih životinja, uz izvesne modifikacije protokola. Naši rezultati konzistentni su sa nalazima studije u kojoj su Song i sar. (2019) pokazali značajno povećanje vremena imobilnosti tokom FST, kod mužjaka pacova Wistar soja, izloženih dugotrajnoj primeni ACTH (100 µg/dan, 14 dana), u poređenju sa zdravim jedinkama kontrolne grupe. U ispitivanju koje su sprovedeli Kim i saradnici (2016), takođe je primećeno povećanje vremena imobilnosti tokom forsiranog plivanja kod eksperimentalnih životinja, mužjaka pacova Wistar soja, nakon izlaganja

ACTH tretmanu (100 µg/dan) u trajanju od tri nedelje. Nasuprot tome, u drugim istraživanjima, nakon primene iste doze ACTH, tokom dve nedelje, vreme imobilnosti u testu forsiranog plivanja kod ovih životinja nije se razlikovalo u odnosu na kontrolnu grupu (Kitamura i sar., 2002a, 2008a, 2008b; Iwai i sar., 2013; Walker i sar., 2013). Pored toga, Kitamura i saradnici (2002a) su pokazali da jednokratna primena ACTH (100 µg/dan) kod mužjaka pacova 24 h pre izvođenja FST, kao i tretman u trajanju od tri ili sedam dana, ne ispoljavaju efekte na vreme imobilnosti u testu u poređenju sa kontrolnim životinjama. Pomenute razlike u rezultatima testa ponašanja, najverovatnije su posledica dužine primene ACTH, izbora doze, kao i velike interindividualne varijabilnosti kada su u pitanju određeni sojevi eksperimentalnih životinja.

Smatra se da se najveći značaj testa forsiranog plivanja ogleda u mogućnosti skrininga i ispitivanja efikasnosti potencijalnih, novih antidepresiva u animalnim modelima stresa, odnosno depresivnog ponašanja (Detke i Lucki, 1996). Pokazano je da akutna, kao i hronična primena predstavnika različitih terapijskih klasa antidepresiva, poput tricikličnih antidepresiva, selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina i inhibitora preuzimanja serotonina i noradrenalina, kod zdravih jedinki, ali i kod životinja izloženih hroničnom stresu, skraćuje vreme imobilnosti i/ili dovodi do izraženog povećanja vremena provedenog u plivanju ili penjanju uz FST cilindar (Porsolt i sar., 1978; Detke i sar., 1995; Detke i Lucki, 1996; Kulkarni i Dhir, 2007; Xie i sar., 2019). Jedna od postojećih hipoteza je da povećanje noradrenergičke transmisije u mozgu skraćuje vreme imobilnosti i istovremeno selektivno produžava vreme provedeno u penjanju uz zidove staklenog FST cillindra. Sa druge strane, pokazano je da se porast serotonergičke transmisije u mozgu manifestuje skraćenim periodom imobilnosti i produženim vremenom provedenim u plivanju (Detke i Lucki, 1996). Međutim, kao što je već navedeno, ranija istraživanja su potvrdila da u modelu depresije, indukovane hroničnom primenom ACTH (100 µg/dan, 14 dana), sam ACTH tretman kod glodara efikasno suprimira efekte tricikličnih antidepresiva na vreme imobilnosti, prilikom izvođenja FST. Shodno tome, smatra se da je opisani fenomen jasan pokazatelj da antidepresivni efekat tricikličnih antidepresiva izostaje u ovaj modelu, što upućuje na zaključak da se kod životinja razvio depresivni fenotip rezistentan na tretman lekovima iz ove terapijske klase (Kitamura i sar., 2002a, 2008a, 2008b, 2010, 2014; Iwai i sar., 2013; Walker i sar., 2013; Kim i sar., 2016). Prema dosadašnjim saznanjima, u našoj studiji je prvi put zabeleženo da hronična primena Mg u ovom modelu depresivnog ponašanja, značajno redukuje vreme imobilnosti i istovremeno dovodi do primetnog porasta vremena provedenog u plivanju, odnosno aktivnom ponašanju usmerenom ka traženju izlaza iz cilindra. Navedeni rezultati upućuju na antidepresivni efekat Mg, koji pretpostavlja se delom nastaje usled supresije prekomerne aktivnosti HPA ose. Pri tom, u našoj studiji je prvi put pokazana efikasnost Mg kao potencijalnog terapijskog, odnosno adjuvantnog agensa u animalnom modelu depresije rezistentne na terapiju i praćene hiperaktivnošću HPA osovine.

Prve implikacije o povezanosti između magnezijuma i patoloških mehanizama uključenih u nastanak depresivnog i anksioznih poremećaja pojavile su se nakon objavljivanja studije u kojoj su praćene bihevioralne promene kod miševa, uzrokovane restrikcijom unosa magnezijuma (Singewald i sar., 2004). U pomenutom istraživanju, nakon 28 dana primene dijetetskog režima koji obezbeđuje 10% dnevnih potreba za unosom Mg (50 mg magnezijuma/kg hrane), kod ovih životinja je primećeno smanjenje koncentracije Mg u plazmi za 45%. Deficijencija Mg u organizmu ispoljila je prodepresivni i anksiozni efekat kod ovih životinja, bez uticaja na spontanu lokomotornu aktivnost, što je sve zajedno zabeleženo u bihevioralnim testovima (Singewald i sar., 2004). Nakon toga, usledile su studije koje su potvrdile validnost navedenog modela, kao i mogućnost primene u cilju ispitivanja neurobiologije depresije i anksioznog poremećaja (Muroyama i sar., 2009; Whittle i sar., 2011; Sartori i sar., 2012). Sartori i saradnici (2012) su u pomenutom modelu, zasnovanom na restrikciji unosa magnezijuma, otkrili da deficijencija ovog mikronutrijenta u organizmu dovodi do

poremećaja aktivnosti HPA ose kod miševa, pri čemu se povećava genska ekspresija CRF u hipotalamusu, kao i nivo ACTH u krvi. Sa druge strane, hronična peroralna primena tricikličnog antidepresiva desipramina (30 mg/kg/dan) efikasno je antagonizovala prodepresivni efekat deplecije magnezijuma kod eksperimentalnih životinja, što se manifestovalo normalizacijom parametara u bihevioralnim testovima, normalizacijom ekspresije CRF u hipotalamusu i koncentracije ACTH u plazmi (Singewald i sar., 2004; Sartori i sar., 2012). Pored toga, akutna primena diazepama (1 mg/kg, *i.p.*), kao i hronični tretman desipraminom ispoljili su anksiolitičke efekte u ovom modelu (Sartori i sar., 2012).

U studijama u kojima su praćeni efekti primene magnezijuma, primećeno je značajno skraćenje perioda imobilnosti u testu forsiranog plivanja, kod stresiranih, ali i nestresiranih životinja, nakon tretmana. Tokom poslednjih nekoliko decenija, od uvođenja ovog bihevioralnog testa (Porsolt i sar., 1978), skraćeno vreme imobilnosti se smatra relevantnim pokazateljem antidepresivnog delovanja. Poleszak i saradnici (2005a) su pokazali da akutna (30 mg Mg/kg), kao i subhronična primena magnezijum hlorida (24 h, 5 h i 1 h pre izvođenja FST) kod eksperimentalnih životinja, u dozi od 15, 30, kao i 50 mg Mg/kg, dovodi do značajnog skraćenja perioda imobilnosti. Međutim, u ovoj studiji je primećeno da nakon hroničnog Mg tretmana (30 mg/kg, u trajanju od 14 dana) kod pacova, opisani antidepresivni efekat izostaje, odnosno razvija se tolerancija kod životinja. Pomenuto zapažanje je potkrepljeno činjenicom da prilikom izvođenja FST, hronični Mg tretman nije uticao na vreme imobilnosti (Poleszak i sar., 2005a). Sa druge strane, u istraživanju sprovedenom na miševima, zabeleženo je značajno skraćenje vremena imobilnosti nakon akutnog, ali i hroničnog Mg tretmana. U ovoj studiji je pokazano da akutna primena Mg, u obliku hlorida, sulfata i hidroaspartata, i u dozi od 20 i 30 mg Mg/kg, kao i hronični Mg tretman (30 mg/kg, u obliku soli hidroaspartata, tokom 14 dana) ispoljavaju antidepresivni efekat kod životinja (Poleszak i sar., 2004). Pored toga, i akutna i hronična primena Mg su imale anksiolitički efekat koji se odrazio na broj ulazaka i vreme provedeno u otvorenim kracima uzdignutog plus lavirinta, bez promena, odnosno uticaja na spontanu lokomotornu aktivnost životinja (Poleszak i sar., 2004). Ovi rezultati su konzistentni sa nalazima dobijenim u sklopu naše studije.

Nakon objavljivanja otkrića do kog su došli Poleszak i sar. (2004), prilikom ispitivanja bihevioralnih efekata magnezijuma, usledile su studije u kojima je praćena aktivnost kombinovane primene Mg i standardnih ili atipičnih antidepresiva, kao i promene u ćelijskoj signalizaciji kod glodara. Poleszak i sar. (2005b) su pokazali da akutna primena subefektivnih doza magnezijuma (5 i 10 mg/kg) i imipramina (10 i 15 mg/kg), ispoljava sinergistički efekat kod nestresiranih miševa, što se manifestovalo značajno redukovanim vremenom imobilnosti kod ovih životinja u poređenju sa kontrolnom grupom. Potom, sprovedeno je istraživanje u kom su Poleszak i sar. (2006) indukovali promene u ponašanju životinja primenom stresa uzrokovanog akutnom imobilizacijom, u trajanju od 2 h, što se kasnije odrazilo i na parametre testa forsiranog plivanja. Naime, primećeno je značajno povećanje vremena imobilnosti (približno 21%) kod ovih miševa, ali i normalizacija ovog parametra nakon akutnih tretmana magnezijumom (10 mg/kg) i imipraminom (15 mg/kg) (Poleszak i sar., 2006). Takođe, u ovoj studiji je pokazano da kombinovana primena magnezijuma i imipramina dovodi do skraćenja perioda imobilnosti u poređenju sa stresiranim, ali i životinjama kontrolne grupe (Poleszak i sar., 2006). Neophodno je istaći da je u istraživanjima ispitivan efekat kombinovane primene magnezijuma i antidepresiva različitih farmakoloških profila, uključujući citalopram, reboksetin i tianeptin (Poleszak, 2007a). U studiji iz 2007. godine primećeno je da akutna, kombinovana primena magnezijuma (10 mg/kg) i selektivnog i specifičnog inhibitora preuzimanja noradrenalina- reboksetina (2,5 mg/kg), u subefektivnim dozama, nije uticala na ponašanje miševa tokom forsiranog plivanja. Nasuprot tome, akutna primena subefektivnih doza magnezijuma (10 mg/kg) u kombinaciji sa citalopramom (15 mg/kg), selektivnim inhibitorom preuzimanja serotonina, ili tianeptinom (20 mg/kg), atipičnim antidepresivom koji stimuliše

preuzimanje serotonina, ispoljila je sinergistički, antidepresivni efekat. Pomenuti efekat se odrazio na ponašanje životinja prilikom izvođenja FST i za rezultat je imao značajno skraćanje vremena imobilnosti, bez promena u lokomotornoj aktivnosti miševa (Poleszak, 2007a). Dodatno, uočeno je da u eksperimentalnoj grupi izloženoj pretretmanu inhibitorom sinteze serotonina, p-hlorofenilalaninom (200 mg/kg, tokom tri dana), magnezijum (30 mg/kg) nije ispoljio antidepresivnu aktivnost i izostao je očekivani efekat na vreme imobilnosti (Poleszak, 2007a). Shodno tome, jedna od pretpostavki je da su bihevioralni efekti magnezijuma bar delom posredovani modulacijom serotonergičke transmisije (Poleszak, 2007a).

Međutim, zabrinjavajuća statistika koja govori da tokom primene antidepresiva, koji modulišu prevashodno signalizaciju posredstvom monoaminskih neurotransmitera, približno 30% pacijenata ne pokazuje terapijski odgovor, kao i činjenica da se u kliničkoj praksi često javlja relaps, nametnuli su potrebu za novim pristupom u lečenju. Prava prekretnica u istraživanju bila je pilot studija u kojoj je pokazano da je akutna primena subanestetičke doze ketamina (0,5 mg/kg, *i.v.*) dovela do remisije u roku od nekoliko sati, kod osoba koje su patile od depresije rezistentne na terapiju (Berman i sar., 2000). Nakon toga, usledio je veliki broj studija u kojima su ispitivane neurohemijske i funkcionalne promene u osnovi ovog fenomena i antidepresivnog efekta ketamina. Konzistentnost ovog nalaza potvrdilo je i otkriće da kod depresivnih pacijenata postoji poremećaj ekscitatorne i/ili inhibitorne neurotransmisije, praćen promenama u neuralnoj plastičnosti i nivou glutamata i GABA u mozgu (Lener i sar., 2017). Tokom poslednje dve decenije, u prekliničkim i kliničkim ispitivanjima pažnja je bila usmerena na daljem proučavanju uloge glutamatergičke, ali i GABA-ergičke transmisije u patofiziologiji i terapiji depresivnog poremećaja (Razmjou i sar., 2016).

Prilikom tretmana eksperimentalnih životinja magnezijumom, Poleszak (2008) je primetio interakciju između ovog bioelementa i supstanci koje deluju kao ligandi benzodiazepinskog mesta vezivanja GABA_A receptora. Naime, akutna primena Mg (20 mg/kg) imala je anksiolitički efekat kod miševa, koji se manifestovao povećanjem broja ulazaka, kao i vremena provedenog u otvorenim kracima uzdignutog plus lavirinta. Takođe, uočeno je da kombinovana aplikacija subefektivnih doza magnezijuma i agonista GABA-ergičke transmisije, hlordiazepoksida (2 mg/kg) ili diazepama (0,5 mg/kg), ispoljava anksiolitičko delovanje. Nasuprot tome, primena parcijalnog agoniste benzodiazepinskih GABA receptora- flumazenila (10 mg/kg), antagonizovala je bihevioralne efekte Mg u uzdignutom plus lavirintu (Poleszak, 2008). Prema tome, pretpostavlja se da je GABA-ergička neurotransmisija, prevashodno aktivacija GABA_A receptora u centralnom nervnom sistemu, značajna za ostvarivanje anksiolitičkog dejstva magnezijuma (Poleszak, 2008). Sa druge strane, nekoliko studija, konceptualno osmišljenih da testiraju efekte Mg u uslovima kombinovane primene selektivnih liganada, uputilo je na ključnu ulogu signalizacije posredstvom glutamatergičkih NMDA receptora u razvoju anksiolitičkog i antidepresivnog efekta magnezijuma. Poleszak i sar. (2008b) su pokazali da primena subefektivnih doza Mg i parcijalnog agoniste mesta za vezivanje glicina na NMDA receptorima- D-cikloserina (2,5 mg/kg), ili nekompetitivnog antagonist NMDA receptora- supstance MK-801, (0,05 mg/kg), ispoljavaju sinergizam i značajno povećavaju procenat vremena provedenog u otvorenim kracima EPM kod miševa. Tretman D-serinom (100 nmol/životinji), selektivnim agonistom glicinskog mesta vezivanja na NMDA receptorskom kompleksu, efikasno je blokirao anksiolitičku aktivnost Mg prilikom izvođenja EPM testa. Potom, usledila je studija u kojoj su Poleszak i sar. (2008c) otkrili da tretman D-serinom (100 nmol/životinji) antagonizuje antidepresivni efekat Mg (30 mg/kg) kod miševa, što se manifestovalo tokom testa forsiranog plivanja.

Međutim, imajući u vidu da su u opisanim prekliničkim istraživanjima, antidepresivni i anksiolitički efekti Mg pokazani kod nestresiranih životinja, neophodno je bilo ispitati uticaj

suplementacije magnezijumom na promene u ponašanju životinja izloženih hroničnom stresu. U studiji Pochwata i sar. (2014) primećeno je da izlaganje mužjaka pacova hroničnom blagom stresu, tokom sedam nedelja, dovodi do progresivnog smanjenja unosa zaslađenog, 1% rastvora saharoze, što odražava anhedoniju, jedan od ključnih simptoma depresivnog poremećaja. U pomenutoj studiji otkriveno je da hronična primena magnezijum hidroaspartata (15 mg/kg, tokom pet nedelja) ispoljava antidepresivnu aktivnost, koja za posledicu ima normalizaciju unosa zaslađenog rastvora kod eksperimentalnih životinja, bez uticaja na unos ovog rastvora kod kontrolne grupe. Dodatno, hronični stres je indukovao porast ekspresije GluN1 subjedinice NMDA receptora u prefrontalnom korteksu i amigdalama, kao i GluN2A subjedinice u hipokampusu, dok je primena Mg antagonizovala pomenuti efekat (Pochwat i sar., 2014). Kasnije, u još jednoj studiji je opaženo da suplementacija magnezijumom utiče na ekspresiju proteina od ključnog značaja za glutamatergičku i GABA-ergičku transmisiju- u ovom slučaju glutamat dekarboksilazu 67 kDa (GAD-67) u različitim regijama mozga (Pochwat i sar., 2016). Poznato je da GAD-67 predstavlja glavnu izoformu enzima koji vrši dekarboksilaciju glutamata, pri čemu se sintetiše GABA, kao i da tokom razvoja ovaj proces reguliše grananje aksona interneurona i formiranje sinapsi (Chattopadhyaya i sar., 2007). Kod pacijenata koji pate od bipolarnog poremećaja i shizofrenije studije su potvrdile smanjenu ekspresiju izoenzima GAD-67 u mozgu (Heckers i sar., 2002; Kalkman i Loetscher, 2003). Sa druge strane, Pochwat i sar. (2016) su primetili da primena magnezijum hidroaspartata (15 mg/kg, intraperitonealno) u modelima stresa: u modelu bilateralne olfaktorne bulbektomije tokom 14 dana i u modelu hroničnog blagog stresa tokom 35 dana, značajno povećava ekspresiju GAD-67 u prefrontalnom korteksu pacova. Dodatno, u modelu hroničnog blagog stresa, ekspresija GAD-67 je bila značajno povišena i u amigdalama (Pochwat i sar., 2016). Ova saznanja, kao i prethodno opisana istraživanja u kojima su praćeni bihevioralni efekti antagonista, parcijalnih agonista i agonista NMDA receptora, dodatno govore u prilog hipotezi o ulozi ovih receptora i glutamatergičke transmisije u patofiziologiji depresije i razvoju antidepresivnog efekta Mg kod eksperimentalnih životinja.

Međutim, druge studije koje su za cilj imale karakterizaciju bihevioralnih efekata supstanci koje deluju kao NMDA ligandi, iznele su različite rezultate, od kojih neki upućuju da se antidepresivno, ali ne i anksiolitičko dejstvo Mg ostvaruje posredstvom NMDA receptora (Haj-Mirzaian i sar. (2015), dok drugi nalazi sugerišu da, prilikom kombinovane primene, Mg ne utiče na antidepresivnu aktivnost ketamina (Razmjou i sar., 2016). Naime, Haj-Mirzaian i sar. (2015) su koristili model socijalne izolacije kod miševa, u trajanju od četiri nedelje, u periodu adolescencije, da bi potom, kada su eksperimentalne životinje dostigle zrelost, primenom relevantnih testova (OFT, test na ploči, FST i test prskanja), istražili efekte nekompetitivnih antagonista NMDA receptora. Nakon akutnih tretmana ketaminom (1 mg/kg), supstancom MK-801 (0,05 mg/kg) ili magnezijum sulfatom (10 mg/kg), ispitivani su njihovi efekti na ponašanje eksperimentalnih životinja. Istraživači su zaključili da se blokadom glutamatergičkih NMDA receptora antagonizuje prodepresivni, ali ne i proanksiogeni efekat socijalne izolacije kod miševa (Haj-Mirzaian i sar., 2015). Neophodno je pomenuti da je glavni nedostatak ove studije izbor doze za koju je u prethodnim eksperimentima pokazano da je subefektivna, kao i nedostatak analize odnosa doza i efekat. Sa druge strane, u istraživanju koje su sprovedeli Razmjou i sar. (2016) zapaženo je da dugotrajni tretman magnezijum hidroaspartatom (14 dana, *i.p.*) i akutna primena ketamina (15 mg/kg) kod miševa, ne ispoljavaju sinergistički, kao ni aditivni efekat. Shodno tome, odsustvo interakcije, kao i činjenica da je u testu forsiranog plivanja efekat Mg na vreme imobilnosti izostao, naveli su autore na zaključak koji ne podržava primenu magnezijuma kao adjunktivne terapije kod depresivnih pacijenata podvrgnutih tretmanu ketaminom (Razmjou i sar., 2016). U pomenutoj studiji se, međutim, ne navodi doza magnezijuma kojoj su izložene eksperimentalne životinje, i stoga se nameće pitanje interpretacije dobijenih rezultata.

5.2. Hronična primena magnezijuma stimuliše neurogenezu u hipokampusu u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive

Prilikom imunohistohemijske analize hipokampusa, u našoj studiji nije detektovana značajna promena u ekspresiji BDNF proteina kod eksperimentalnih životinja dugotrajno izloženih ACTH tretmanu. Rezultati su pokazali samo blagi trend porasta broja Ki-67 imunopozitivnih ćelija kod ovih životinja. Sa druge strane, primećeno je da hronična primena Mg kod nestresiranih životinja, ali u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive stimuliše proces adultne neurogeneze, indukujući porast ekspresije Ki-67, kao i BDNF proteina u dentatnom girusu hipokampusa. Pored toga, zapažen je sinergistički efekat ponavljane primene ACTH i Mg na neurogenezu, što je uslovalo primetan porast broja Ki-67 imunopozitivnih neurona u hipokampusu životinja izloženih kombinovanom ACTH/Mg tretmanu. Prema tome, zabeležena otkrića govore u prilog hipotezi da Mg ispoljava neuroprotektivni efekat u animalnim modelima afektivnih i neurodegenerativnih oboljenja, delom zahvaljujući modulaciji procesa adultne neurogeneze u hipokampusu (Liao i sar., 2017).

Izučavanje i spoznaja neurobiološke osnove afektivnih poremećaja, kao i ispitivanje efikasnosti i bezbednosti novih lekova iz oblasti neuropsihijatrije, u velikoj meri se oslanjaju na primenu eksperimentalnih modela u kojima se indukuju psihopatološke promene karakteristične za određeno oboljenje. Naime, zahvaljujući primeni modela stresa/depresivnog ponašanja, pretežno kod glodara, opisane su promene koje se odvijaju počevši od genske ekspresije i promena na nivou subcelularnih struktura do promena u volumenu moždanih regija, prevashodno PFC i hipokampusa. Otkriveno je da se tokom dugotrajne izloženosti stresu, smanjenje zapremine PFC i hipokampusa, javlja najverovatnije usled smanjenja broja i dužine apikalnih dendrita piramidalnih neurona i gubitka sinapsi u ovim strukturama (David i sar., 2009; Duman, 2014). Navedena saznanja dopunjuju nalazi iz *post mortem* studija, u kojima je opažena redukovana veličina some neurona PFC i hipokampusa kod obolelih od depresije (Rajkowska i sar., 1999; Stockmeier i sar., 2004). Pretpostavlja se da odumiranje neurona i smanjenje broja sinapsi u ovim moždanim strukturama uzrokuju poremećaj, u izvesnoj meri gubitak, normalne kontrole raspoloženja i emocija kod osoba koje pate od depresije. Poznato je da medijalni PFC ispoljava kontrolu nad određenim regijama mozga, prevashodno amigdalama, i gubitak projekcija neurona koji potiču iz medijalnog PFC doprinosi poremećaju kontrole emocionalne reaktivnosti, kao i razvoju kognitivnih deficita kod ovih pacijenata (Duman, 2014).

U kontekstu patoloških promena koje neizostavno tokom vremena dovode do atrofije hipokampusa, jednom od prekretnica u istraživanju smatra se otkriće da je u poređenju sa zdravom populacijom, u mozgu depresivnih pacijenata smanjeno stvaranje novih neurona. Naime, u brojnim prekliničkim i kliničkim studijama je pokazano da hronična izloženost stresu dovodi do supresije neurogeneze u hipokampusu odraslih jedinki. Tokom poslednje dve decenije, ispitivanja ćelijske i molekulske osnove stresa, depresije, kao i terapijskog odgovora na antidepresive, preusmerena su sa monoaminske hipoteze na nove teorije, uključujući i modele vezane za specifične neurotrofične faktore i njihovu ulogu u nastanku oboljenja (Duman i Monteggia, 2006). Neurotrofični faktori su neophodni za razvoj i preživljavanje neurona, kao i za očuvanje karakterističnog svojstva-plastičnosti nervnog sistema. Pokazano je da stres i antidepresivi ispoljavaju antagonističke efekte kada je u pitanju ekspresija određenih neurotrofina u limbičkim regijama uključenim u regulaciju raspoloženja i kognitivnih funkcija. Opisane promene u ekspresiji neurotrofičnih faktora, koje se javljaju u uslovima stresa i kod depresivnog poremećaja, dovode se u vezu sa atrofijom, prevashodno smanjenim grananjem apikalnih dendrita i odumiranjem neurona u hipokampusu,

prefrontalnom korteksu i amigdaloidnim jedrima- moždanim regionima od ključnog značaja za patologiju depresije (Wooley i sar., 1990; Watanabe i sar., 1992; Duman i Monteggia, 2006).

Odavno je poznato da stres u velikoj meri doprinosi razvoju neuropsihijatrijskih i neuroloških oboljenja. Međutim, potrebno je istaći da efekti stresa prevashodno zavise od starosnog doba jedinke u periodu izlaganja, dužine ekspozicije, kao i prirode stresora. Jedan od glavnih ciljnih molekula, pripadnika porodice neurotrofina, čija ekspresija je promenjena u uslovima stresa i koji se neosporno dovodi u vezu sa patologijom afektivnih poremećaja je BDNF. Naime, od pripadnika porodice neurotrofina, BDNF pokazuje najširu distribuciju u CNS-u i pri tom je najveća ekspresija otkrivena u hipokampusu i cerebralnom korteksu. BDNF reguliše ekspresiju fenotipskih markera, poput enzima koji učestvuju u sintezi neurotransmitera, poput neuropeptida i kalcijum-vezujućih proteina (Vaidya i sar., 1997).

Rezultati kliničkih studija i istraživanja sprovedenih na životinjama ukazali su na postojanje veze između ekspresije BDNF i razvoja velike depresije, anksioznih poremećaja i posttraumatskog stresnog poremećaja (Karege i sar., 2002; Duman i Monteggia, 2006; Dwivedi, 2010; Bath i sar., 2013). Kod osoba koje pate od depresivnih poremećaja zabeleženo je značajno smanjenje broja, kao i veličine neurona u korteksu (Scharfman, 1997), hipokampusu (Woo i sar., 2005) i dorzalnom talamusu (Remy i sar., 2005). Pokazano je da kod ovih pacijenata koncentracija BDNF proteina u serumu pokazuje visok stepen korelacije sa promenama u volumenu sive mase i pojavom relapsa (Aggio i sar., 2016). Interesantno je da su klinička ispitivanja ukazala na značajno snižen nivo BDNF u plazmi/serumu kod osoba koje boluju od depresije u poređenju sa zdravim dobrovoljcima (Karege i sar., 2002a). Takođe, primećeno je da u određenim populacijama pacijenata, remisiju koja nastupa nakon primene antidepresiva, prati i normalizacija nivoa BDNF proteina u plazmi/serumu (Aydemir i sar., 2005; Piccinni i sar., 2008; Teixeira i sar., 2010). Analogno tome, Cattaneo i sar. (2010) su otkrili značajan pad ekspresije iRNK za BDNF u leukocitima depresivnih pacijenata i potom normalizaciju ovog deficita nakon terapije escitalopramom. Pomenuta otkrića potvrdilo je još nekoliko studija i BDNF u cirkulišućim limfocitima se razmatra kao potencijalni biomarker terapijskog odgovora na antidepresive (Rojas i sar., 2011; Hayley i Litteljohn, 2018; Peng i sar., 2018).

Međutim, implementacija koncepta analize nivoa perifernog BDNF proteina i primene dobijenih nalaza u odabiru farmakoterapije, uzeta je u obzir prevashodno zahvaljujući korišćenju animalnih modela i određivanju korelacije između nivoa BDNF u krvi i mozgu eksperimentalnih životinja. U prekliničkim studijama, kod različitih životinjskih vrsta je pokazana pozitivna korelacija između nivoa BDNF u krvi/plazmi i njegove koncentracije u moždanim regionima koje karakterišu upadljive promene kod obolelih od afektivnih poremećaja. Naime, Karege i sar. (2002b) su primetili pozitivnu korelaciju između nivoa BDNF u serumu i koncentracije ovog neurotrofičnog faktora u frontalnom korteksu pacova, i ova pojava je bila naročito izražena kod mladih jedinki. Pored toga, u istraživanju koje su sproveli Klein i sar. (2011) pokazana je značajna pozitivna korelacija između koncentracije BDNF u krvi/plazmi i nivoa BDNF u hipokampusu, kod svinja i pacova. Shodno tome, smatra se da periferni nivo BDNF može biti prediktor koncentracije BDNF u strukturama mozga koje odlikuje visoka ekspresija ovog neurotrofina.

Pored indirektnih pokazatelja promena u ekspresiji BDNF u mozgu, u velikom broju studija, zahvaljujući primeni modela akutnog i hroničnog stresa (u trajanju od 7 dana do 21 dan), određivan je nivo iRNK, kao i BDNF proteina u hipokampusu eksperimentalnih životinja. Najpre je pokazano da akutni, potom i ponavljani stres (7 dana), uzrokovan imobilizacijom životinje u trajanju od 2 h, indukuje značajno smanjenje ekspresije iRNK za BDNF u hipokampusu. Pri tom, najupadljiviji efekat je uočen u granularnom sloju ćelija dentatnog girusa, potom u CA3 i CA1 piramidalnim

neuronima hipokampusa (Smith i sar., 1995). Pomenuto otkriće potvrdile su studije koje su usledile u kojima je opisano da akutna, kao i ponavljana imobilizacija životinja, uz primenu različitih protokola i dužine trajanja stresora, dovodi do smanjenja nivoa iRNK za BDNF u hipokampusu pacova (Vaidya i sar., 1997; Ueyama i sar., 1997; Nibuya i sar., 1999). Pored toga, treba pomenuti da je i tokom primene drugih modela stresa, uključujući hronični nepredvidivi stres (Nibuya i sar., 1999), ponavljaju primenu električnih stimulusa na šapice (Rasmusson i sar., 2002), model socijalne izolacije (Scaccianoce i sar., 2006), kao i rano odvajanje mladunaca od majke (Roceri i sar., 2002), zabeležena smanjena ekspresija BDNF u hipokampusu životinja.

Međutim, analogno nalazima iz naše studije, postoje istraživanja u kojima je pokazano da izlaganje eksperimentalnih životinja stresu ne ispoljava supresorni efekat na hipokampalnu ekspresiju BDNF. Kuroda i McEwen (1998) su opisali promene koje nastaju nakon izlaganja odraslih mužjaka pacova stresu uzrokovanim ponavljanim fizičkim sputavanjem, odnosno ograničavanjem pokreta životinja, tokom tri nedelje. Primećena je atrofija apikalnih dendrita CA3 piramidalnih neurona hipokampusa i smanjena ekspresija iRNK za GAP-43 (eng. growth associated protein 43) u CA3 regionu hipokampusa, uz nepromenjenu ekspresiju iRNK za BDNF (Watanabe i sar., 1992; Kuroda i McEwen, 1998). U studiji koju su sprovedli Zuena i sar. (2008), koristeći prenatalno izlaganje stresu uzrokovanim fizičkim sputavanjem trudnih ženki, kao validirani model ranog stresa koji indukuje trajne neurobiološke i bihevioralne promene, zabeleženo je povećanje ekspresije proteina BDNF i njegovog prekursora pro-BDNF u hipokampusu odraslih mužjaka pacova. Sa druge strane, otkrili su da je kod odraslih ženki pacova, prenatalno izloženih ovom obliku stresa, nivo BDNF, kao i pro-BDNF, u hipokampusu nepromenjen (Zuena i sar., 2008). Pretpostavlja se da razlike proističu iz razlika u eksperimentalnom protokolu, odnosno činjenice da ograničavanje pokreta životinja predstavlja manji izvor stresa za glodare u poređenju sa drugim modelima, poput modela zasnovanog na ponavljanoj imobilizaciji. Takođe, opisani rezultati upućuju da su uloga BDNF, kao i uticaj stresa na njegovu ekspresiju, složeniji nego što se isprva smatralo. S tim u vezi, poznato je da se funkcije BDNF proteina danas pominju i u kontekstu nastanka drugih neuropsihijatrijskih oboljenja, uključujući shizofreniju i autizam (Björkholm i Monteggia, 2016).

Pored BDNF proteina, jedan od najviše izučavanih molekularnih medijatora neurogeneze je Ki-67, marker proliferacije i stvaranja novih neurona u dentatnom girusu hipokampusa. U velikom broju prekliničkih studija opisana je supresija procesa adultne neurogeneze prilikom izlaganja eksperimentalnih životinja stresu ili egzogenoj primeni glukokortikoida. U istraživanju koje je sprovedeno pre više od dve decenije, kod nečovekolikih primata je pokazano da stres usled izlaganja životinje nepoznatom mužjaku iste vrste smanjuje proliferaciju granuliranih ćelija u hipokampusu (Gould i sar., 1997, 1998). Usledila su ispitivanja na drugim životinjskim vrstama, pretežno glodarima, i primena drugih modela akutnog, kao i hroničnog stresa, odnosno depresije, poput modela naučene bespomoćnosti (Malberg i Duman, 2003), socijalne izolacije (Lu i sar., 2003), prenatalnog stresa uzrokovnog fizičkim sputavanjem životinja (Zuena i sar., 2008), kao i modela hroničnog nepredvidivog stresa (Garza i sar., 2012). Dobijeni rezultati su potvrdili otkriće da stres kod eksperimentalnih životinja, pored razvoja depresivnog ponašanja, dovodi do inhibicije hipokampalne neurogeneze, što se manifestovalo redukovanom proliferacijom ćelija dentatnog girusa. Dodatno, primećeno je da izlaganje životinja samo mirisu predatora predstavlja stres koji će s vremenom dovesti do supresije stvaranja novih neurona u hipokampusu (Tanapat i sar., 2001).

Kada je u pitanju egzogena primena hormona stresa, David i sar. (2009) su uočili smanjenu ekspresiju markera proliferacije BrdU (5-bromo 2-deoksiuridin) u dentatnom girusu miševa izloženih hroničnom tretmanu kortikosteronom. Interesantno je pomenuti da je kortikosteron delovao inhibitory na proliferaciju ćelija u hipokampusu, dok sa druge strane, nije ispoljio efekat

na preživljavanje novoformiranih neurona u dentatnom girusu, kao ni na broj dendrita i njihovu morfologiju (David i sar., 2009). Kuwatsuka i sar. (2013) su pokazali trend smanjenja ekspresije proteina BDNF, kao i pro-BDNF u hipokampusu pacova u modelu depresije indukovane ponavljanim primenom ACTH (100 µg/dan, 14 dana) i rezistentne na primenu tricikličnih antidepresiva. Dodatno, u ovom istraživanju je primećeno da subhronični ACTH tretman dovodi do značajnog smanjenja broja BrdU imunopozitivnih ćelija u subgranularnom sloju dentatnog girusa, što sve zajedno ukazuje na supresiju procesa neurogeneze (Kuwatsuka i sar., 2013). S druge strane, u našoj studiji, hronična primena ACTH (10 µg/dan, 21 dan) nije ispoljila efekat na nivo proteina BDNF u hipokampusu, dok je istovremeno zapažen blagi trend porasta broja Ki-67 imunopozitivnih ćelija u dentatnom girusu, što upućuje na neznatno povećanje neurogeneze. Pomenuta odstupanja u nalazima studije koju su sprovedi Kuwatsuka i sar. (2013) i našeg istraživanja nisu iznenađujuća imajući u vidu razlike u izboru doze i dužine tretmana. Dodatno, uprkos uvreženoj teoriji neurogeneze koja opisuje nastanak i neurobiološki supstrat depresivnog poremećaja, treba imati na umu nekoliko činjenica. Najpre, supresija neurogeneze kod laboratorijskih životinja ne indukuje uvek razvoj depresivne simptomatologije, izlaganje stresu ne ispoljava uvek inhibitorski efekat na proliferaciju i diferencijaciju neurona u hipokampusu i pojedini efekti antidepresiva ostvaruju se nezavisno od toka neurogeneze (Eisch i Petrik, 2012).

Smatra se da se tokom života, približno 35% od ukupne populacije humanih ćelija dentatnog girusa zameni novoformiranim ćelijama (Micheli i sar., 2018). Istraživanja su pokazala da antidepresivi deluju stimulatorno na sve faze procesa adultne neurogeneze kod glodara, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje neurona hipokampusu, i pritom efekat je upadljiviji kod stresiranih u poređenju sa nestresiranim životinjama (David i sar., 2009). U sklopu karakterizacije neurobiologije depresivnog poremećaja i analize odgovarajućih terapijskih pristupa, utvrđeno je da različite terapijske klase antidepresiva, poput selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina, selektivnih inhibitora preuzimanja noradrenalina, tricikličnih antidepresiva, inhibitora monoamino oksidaze, ketamina, kao i elektrokonvulzivni tretman, indukuju porast ekspresije BDNF u hipokampusu, prevažno u granularnim ćelijama, ali i u CA1 i CA3 piramidalnim neuronima (Sairanen i sar., 2005; Duman i Monteggia, 2006; Garcia i sar., 2008; Micheli i sar., 2018).

Pre više od dve decenije, Nibuya i sar. (1995) su među prvima uočili da hronična primena antidepresiva, uključujući desipramin, tranilcipromin, sertralin i mianserin, kao i elektrokonvulzivne terapije, kod pacova, značajno povećava ekspresiju iRNK za BDNF u hipokampusu. Takođe, primećeno je da elektrokonvulzivni tretman i svi pomenuti lekovi, izuzev mianserina, indukuju upadljiv porast ekspresije iRNK za receptor preko kog BDNF ostvaruje svoje efekte, tropomiozin-kinazni receptor B (eng. Tropomyosin receptor kinase B, TrkB), u hipokampusu životinja. Potom su Russo-Neustadt i sar. (2000) pokazali da dugotrajna fizička aktivnost, kao i hronična primena antidepresiva tranilcipromina (7,5 mg/kg, tokom 20 dana) kod mužjaka pacova, ima za posledicu povećanje nivoa iRNK za BDNF u hipokampusu. Dodatno, kombinacija ovih intervencija ispoljava aditivni efekat, koji se javlja nakon svega dva dana i ogleda u još većem porastu transkripcije BDNF u hipokampusu glodara. Kasnije je pokazano da ponavljana primena elektrokonvulzivnog tretmana tokom 10 dana, kod odraslih mužjaka pacova dovodi do značajnih promena u ekspresiji BDNF proteina u različitim moždanim strukturama (Altar i sar., 2003). Naime, opažen je porast ekspresije BDNF proteina u hipokampusu, entorinalnom korteksu, parijetalnom i frontalnom korteksu, strijatumu i septumu ovih životinja. Međutim, iznenađujuće otkriće u ovoj studiji bilo je odsustvo efekata primene tranilcipromina (8–10 mg/kg, tokom 4 dana, 2 ili 3 nedelje), fluoksetina (20 mg/kg, tokom 2 nedelje), kao i desipramina (15 mg/kg, tokom 3 nedelje), na nivo BDNF proteina u hipokampusu. Primećeno je da od pomenutih antidepresiva samo tranilcipromin, kao inhibitor monoamino oksidaze, indukuje porast nivoa BDNF

u frontalnom korteksu i neostriatumu glodara (Altar i sar., 2003). U skladu sa ovim rezultatima stoje i nalazi da ekspresija iRNK za BDNF u hipokampusu nije značajno izmenjena nakon aplikacije antidepresiva, desipramina (10 mg/kg, tokom 14 dana) ili fluoksetina (10 mg/kg, tokom 14 dana) kod zdravih miševa (Vinet i sar., 2004). Interesantno je pomenuti da je kod transgenih miševa koje odlikuje poremećaj glukokortikoidne signalizacije, hronična primena desipramina, kao i fluoksetina, u pomenutim dozama, indukovala primetan porast transkripcije BDNF u DG hipokampusa. Pored toga, fluoksetin je doveo do značajnog povećanja nivoa iRNK za BDNF u CA3 regiji hipokampusa kod transgenih miševa (Vinet i sar., 2004). Opisane razlike u nalazima istraživanja mogu se pripisati različitim eksperimentalnim protokolima, prewashodno uticaju dužine tretmana i vremena koje protekne od poslednjeg tretmana do uzorkovanja, kao i široko potkrepljenoj hipotezi da je efekat primene antidepresiva na ekspresiju BDNF proteina u mozgu značajno veći kod stresiranih životinja. Dodatno, imajući u vidu veću kliničku efikasnost elektrokonvulzivnog tretmana i MAO inhibitora, naročito u lečenju TRD, pretpostavka je da se porast ekspresije BDNF može razmotriti kao jedan od biomarkera terapijskog odgovora kod osoba koje boluju od depresivnog poremećaja (Altar i sar., 2003). Interesantno je da se povećanje ekspresije BDNF javlja prilikom hronične primene antidepresiva i da prati razvoj terapijskog efekta (Duman i Monteggia, 2006). Međutim, jedan od glavnih ciljeva ostaje translacija dobijenih rezultata prekliničkih studija i ispitivanje terapijske efikasnosti u okviru kliničke primene. U prilog nalazima prekliničkih istraživanja govore i izveštaji *post mortem* analize tkiva hipokampusa osoba koje su patile od depresivnog poremećaja. Otkriveno da je nivo BDNF značajno veći kod pacijenata koji su neposredno pre smrti primenjivali antidepresive u odnosu na osobe koje nisu uzimale ovu farmakoterapiju (Chen i sar., 2001).

U cilju daljeg ispitivanja farmakološkog profila antidepresiva, u kontekstu neuroprotektivnog dejstva, analizirani su efekti hronične primene fluoksetina (18 mg/kg/dan, tokom tri nedelje) kod miševa u prethodno pomenutom modelu depresivnog ponašanja indukovano kortikosteronom (David i sar., 2009). Pokazano je da fluoksetin deluje stimulatorno na sve faze procesa neurogeneze kod odraslih jedinki izloženih tretmanu kortikosteronom. Naime, zapaženo je da fluoksetin dovodi do upadljivog porasta proliferacije ćelija i da pritom stimuliše sazrevanje i povećava preživljavanje neurona u hipokampusu ovih životinja (David i sar., 2009). Pretpostavlja se da je stimulatorni efekat na proliferaciju ćelija bar delom posredovan aktivacijom 5-HT_{1A} receptora. Navedena tvrdnja proizilazi iz studije u kojoj je pokazano da delecija ovog podtipa serotoninских receptora potpuno suprimira proliferaciju i bihevioralne efekte fluoksetina u animalnom modelu depresivnog ponašanja, koje se ogleda u smanjenom unosu hrane u novoj sredini (Santarelli i sar., 2003). Takođe, primećeno je da kod eksperimentalnih životinja fluoksetin dovodi do neznatnog porasta broja proliferišućih BrdU⁺ ćelija u hipokampusu, nakon svega 5 dana tretmana, i pritom ovaj efekat postaje značajan posle 7 dana primene (Malberg i sar., 2000; Micheli i sar., 2017). Neophodno je pomenuti da pored selektivnih inhibitora preuzimanja serotoninа, nalazi studija govore u prilog hipotezi da i druge terapijske klase antidepresiva, uključujući inhibitore monoamino oksidaze, triciklične antidepresive, selektivne inhibitore preuzimanja noradrenalina, atipične antidepresive, kao i elektrokonvulzivni tretman, indukuju proliferaciju ćelija u DG hipokampusa (Sairanen i sar., 2005; Duman i Monteggia, 2006).

Tokom protekle decenije, nekoliko ispitivanja imalo je za cilj da utvrdi da li je BDNF neophodan za ostvarivanje terapijskog efekta antidepresiva. Pokazano je da homozigotni BDNF knockout miševi umiru veoma rano tokom postnatalnog razvoja, što je uslovalo korišćenje heterozigotnih BDNF^{+/-} miševa u bihevioralnim studijama. Međutim, primećeno je da heterozigotni BDNF^{+/-} miševi ne ispoljavaju promene u ponašanju karakteristične za depresivni fenotip, dok sa druge strane, bihevioralni efekat antidepresiva imipramina (30 mg/kg), primenjenog 30 min pre FST, kod ovih životinja izostaje (Saarelainen i sar., 2003). Dobijeni nalazi upućuju da

BDNF ima presudnu ulogu u ispoljavanju antidepresivnog dejstva imipramina. Kasnije su usledile studije u kojima je izvršena selektivna delecija gena za BDNF u hipokampusu (Adachi i sar., 2008). Zapaženo je da gubitak BDNF u hipokampusu *per se* ne indukuje razvoj depresivnog ponašanja kod miševa, međutim selektivni gubitak ekspresije ovog proteina u DG hipokampusa za rezultat ima neminovno smanjenje efikasnosti desipramina i citaloprama u bihevioralnom testu. Navedena otkrića potkrepljuju hipotezu, po kojoj je BDNF u hipokampusu, prevashodno u DG regiji, neophodan za ispoljavanje antidepresivnog efekta (Adachi i sar., 2008; Björkholm i Monteggia, 2016).

Pored toga, interesantno je pomenuti da BDNF pospešuje razvoj serotonergičkih neurona (Eaton i sar., 1995), stimuliše sintezu, kao i metabolizam serotonina (Martin-Iverson i sar., 1994; Siuciak i sar., 1996). Istraživanja su pokazala da intracerebralna infuzija BDNF proteina pospešuje rast i grananje centralnih serotonergičkih neurona kod pacova (Mamounas i sar., 1995), dok bilateralna primena ovog neurotrofičnog faktora direktno u DG hipokampusa u modelima depresivnog ponašanja ispoljava antidepresivni efekat kod životinja (Shirayama i sar., 2002; Ye i sar., 2011). Sa druge strane, otkriveno je da primena BDNF proteina direktno u ventralnu tegmentalnu oblast (eng. ventral tegmental area, VTA) eksperimentalnih životinja, regiju koja predstavlja izvor dopaminergičke inervacije za PFC i limbička jedra, ima prodepresivno delovanje (Eisch i sar., 2003).

U skladu sa navedenim otkrićima, hronična peroralna primena magnezijuma u našoj studiji indukovala je proliferaciju ćelija i porast nivoa BDNF proteina u hipokampusu kod kontrolnih, nestresiranih životinja, ali i kod pacova izloženih dugotrajnom ACTH tretmanu, kao jednom od glavnih molekulskih medijatora stresa. Pomenuti rezultati našeg istraživanja idu u prilog hipotezi da primena magnezijuma ima antidepresivni efekat kod eksperimentalnih životinja koje ispoljavaju eminentne bihevioralne i neuroendokrine promene, karakteristične za depresivni fenotip, rezistentan na terapiju tricikličnim antidepresivima. Prema našim saznanjima, ovo je prva *in vivo* studija u kojoj je pokazano stimulatorno delovanje magnezijuma na proces adultne neurogeneze kod životinja. Pre tačno jedne decenije, Slutsky i sar. (2010) su otkrili da povećanje koncentracije Mg u mozgu primenom nosintetisanog jedinjenja Mg, magnezijum-L-treonata, pospešuje učenje, kratkotrajnu i dugotrajnu memoriju kod mladih, kao i starih pacova. Hronični tretman magnezijum-L-treonatom doveo je do porasta ekspresije NMDA receptora koji sadrže NR2B subjedinicu, kao i povećane aktivacije i/ili ekspresije nishodnih signalnih molekula u hipokampusu. Pomenuti efekti su bili udruženi sa upadljivim porastom kratkotrajne sinaptičke facilitacije i dugotrajne potencijacije, koje ispoljavaju ključni značaj za učenje i pamćenje. Na molekulskom nivou, Slutsky i sar. (2010) su primetili povećanu gustinu aksonskih terminala koji sadrže sinaptofizin i sinaptobrevin, markere sazrevanja neurona i sinaptičkih vezikula, nakon primene magnezijum-L-treonata. Potom je uočeno da suplementacija magnezijum-L-treonatom, u trajanju od 28 dana, poboljšava vizualno-prostornu diskriminaciju kod pacova i ispoljava protektivni efekat kada je u pitanju generalizacija straha (Abumaria i sar., 2013). Pored modulacije sinaptičke plastičnosti, tokom daljih ispitivanja uloge magnezijuma u ostvarivanju kognitivnih funkcija, u *in vitro* studiji je zabeleženo da tretman primarne kulture neuralnih progenitorskih ćelija magnezijum sulfatom ili magnezijum hloridom pospešuje neuralnu diferencijaciju i pritom inhibira diferencijaciju glija ćelija. Neuralne progenitorske ćelije su prethodno bile izolovane iz dentatnog girusa odraslih mužjaka miševa C57BL/6J soja (Liao i sar., 2017). Pretpostavlja se da stimulatorni uticaj na neuralnu diferencijaciju *in vitro*, magnezijum ostvaruje aktivacijom nishodnog puta koji uključuje ekstraćelijskim signalima regulisane kinaze (eng. extracellular signal-regulated kinases, ERK) i transkripcioni faktor CREB (eng. cAMP response element-binding protein) (Liao i sar., 2017), međutim, da li ova signalizacija posreduje i u *in vivo* efektima ostaje da se utvrdi. Opisani nalazi, zajedno sa rezultatima našeg istraživanja, upućuju na stimulatorni efekat Mg i značaj ovog

bioelementa za odvijanje hipokampalne neurogeneze, kao i na opravdanost kliničkih ispitivanja Mg kao potencijalnog, adjuvantnog terapijskog sredstva u lečenju osoba koje pate od depresije.

Dalja istraživanja imala su za cilj karakterizaciju prokognitivnih i neuroprotektivnih efekata Mg. Međutim, interesantno je da je još ranije zabeleženo da primena magnezijum sulfata (100 mg/kg i 200 mg/kg, 7 dana, intraperitonealno) ublažava kognitivni deficit kod miševa u modelu Alchajmerove bolesti indukovane streptozotocinom (Xu i sar., 2014). Naime, u ovom istraživanju je otkriveno da Mg ispoljava supresivni efekat kada je u pitanju hiperfosforilacija tau proteina, dok istovremeno ima stimulatorno delovanje i dovodi do porasta dugotrajne potencijacije i povećanja ekspresije presinaptičkog proteina sinapsina 1, kao i postsinaptičkih proteina PSD95, PSD93, GluR1 i GluR2 u hipokampusu. Opisane promene koje se javljaju nakon Mg tretmana, za posledicu imaju poboljšanje kognitivnih funkcija u modelu Alchajmerove bolesti, prevashodno učenja i pamćenja kod miševa (Xu i sar., 2014). Kasnije je primećeno da kombinacija obogaćene sredine i dugotrajne primene magnezijum-L-treonata (75 mg/kg/dan elementarnog Mg) ispoljava sinergistički efekat u modelu Alchajmerove bolesti, i dovodi do poboljšanja prostorne memorije kod miševa (Huang i sar., 2018). Dodatno, uočeno je da navedeni kombinovani tretman umanjuje gubitak sinapsi, kao jednu od značajnih patoloških promena koje nastupaju kod ovih životinja, što se manifestuje povećanom ekspresijom sinaptofizina, markera gustine sinapsi, u DG hipokampusa (de Wilde i sar., 2016; Huang i sar., 2018).

Na osnovu rezultata naše studije, može se zaključiti da je u modelu depresije indukovane hroničnim ACTH tretmanom i rezistentne na primenu TCA, antidepresivni efekat magnezijuma nastupio delom kao posledica stimulatornog delovanja na proces neurogeneze kod odraslih mužjaka pacova. Pored toga, magnezijum je ispoljio neuroprotektivni efekat kod nestresiranih životinja. Navedeni efekti zabeleženi su zahvaljujući analizi molekulskih medijatora procesa adultne neurogeneze i manifestovali su se povećanom proliferacijom ćelija i porastom ekspresije BDNF proteina u dentatnom girusu hipokampusa.

Mehanizam i signalni putevi koji su u osnovi opisanih neuroprotektivnih efekata magnezijuma, kao i modulatorni uticaj na neuroplastičnost i proces neurogeneze, do danas, nisu u potpunosti rasvetljeni. Međutim, postoji nekoliko pretpostavki. Poznato je da se očuvanje homeostaze intracelularnog Mg dovodi u blisku vezu sa ćelijskim rastom, diferencijacijom, energetske metabolizmom i apoptozom. Pomenute fiziološke funkcije ostvaruju se zahvaljujući regulatornom delovanju koje Mg ispoljava i kontroli aktivnosti određenih enzima, pojedinih jonskih kanala i stabilnosti DNK i RNK lanca (Yamanaka i sar., 2019). Jedna od predloženih hipoteza, koja objašnjava ulogu Mg u proliferaciji i maturaciji neurona, kao i sinaptogenezi, upućuje na aktivaciju mTOR (eng. mammalian target of rapamycin, ciljani molekul za rapamicin kod sisara) signalnog puta. Naime, tokom sazrevanja neurona, prilikom oslobađanja neurotransmitera i vezivanja za receptore na postsinaptičkoj membrani, javlja se mobilizacija intracelularnog Mg iz mitohondrija u citosol, koji potom stimuliše aktivnost posredovanu mTOR nishodnim putem. Pokazano je da mTOR učestvuje u integraciji signala i pritom ostvaruje jednu od glavnih uloga u regulaciji ćelijskog rasta, proliferacije, metabolizma i translacije. Neophodno je pomenuti i da tokom neurogeneze aktivacija mTOR signalizacije prethodi grananju dendrita (LiCausi i Hartman, 2018; Yamanaka i sar., 2019). Takođe, istraživanja su poslednjih godina dovela do otkrića da nakon produžene supresije aktivnosti NMDA receptora, značajnu ulogu u procesu sinaptičke potencijacije ima BDNF i pritom, pretpostavlja se, stimuliše ushodnu regulaciju postsinaptičkih AMPA receptora (Autry i sar., 2011; Nosyreva i sar., 2013; Björkholm i Monteggia, 2016).

5.3. Uticaj hronične primene magnezijuma na nivo biogenih amina u plazmi u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive

Prilikom uspostavljanja ranije opisanog modela depresivnog ponašanja, koji se temelji na izlaganju mužjaka pacova hroničnoj primeni jednog od hormona stresa, dosadašnje teorije su dopunjene novim otkrićima koja objašnjavaju neke od neuroendokrinih promena, karakterističnih za ovaj neuropsihijatrijski poremećaj. Takođe, u skladu sa našim saznanjima, rezultati u sklopu ove disertacije, po prvi put pružaju uvid u mehanizme protektivnog i antidepresivnog efekta magnezijuma u animalnom modelu depresije rezistentne na terapiju. Naime, u okviru eksperimenata prve faze, pokazano je da, u odsustvu delovanja akutnog stresora, koncentracije adrenalina, noradrenalina i serotonina u plazmi ne pokazuju značajne razlike između eksperimentalnih grupa. Sa druge strane, akutni stres indukovano izlaganjem životinja testu forsiranog plivanja, izazvao je očekivan porast nivoa cirkulišućeg adrenalina, i ovaj efekat je bio izražen kod svih glodara, izuzev životinja ACTH grupe. U tom kontekstu, neophodno je pomenuti da je najupadljiviji efekat zabeležen u Mg grupi, kao i da je hronična primena magnezijuma, pored povećanja nivoa analiziranih kateholamina, prilikom izlaganja organizma akutnom stresu, dovela i do veoma izraženog porasta cirkulišućeg serotonina. Pored toga, primećeno je da se kod glodara podvrgnutih hroničnoj primeni ACTH, kao i Mg tretmanu, u toku odgovora na akutni stresor javlja primetan porast adrenalina i noradrenalina u plazmi. U svetlu prethodno opisanih nalaza, koji se odnose na bihevioralnu karakterizaciju ovih životinja, porast nivoa analiziranih kateholamina u plazmi se može razmatrati kao jedan od protektivnih mehanizama.

Uprkos tome što je identifikovan veliki broj hormona koji učestvuju u odgovoru organizma na stres, smatra se da dve kategorije čine centralne komponente neuroendokrinog odgovora, i to su kateholamini, adrenalin i noradrenalin, i glukokortikoidi (Romero i Butler, 2007). Naime, periferni simpato-adrenomedularni i centralni kateholaminergički sistem ostvaruju dominantne uloge u očuvanju homeostaze i gotovo trenutno, izrazito se povećava njihova aktivnost u svakoj situaciji koju jedinka percipira kao preteću, bilo da je u pitanju izlaganje organizma psihocijalnom i/ili fizičkom stresu. U toku akutnog stresa, uključujući hipoglikemiju, hemoragiju i/ili traumu, asfiksiju, kao i emocionalni distres, povećava se oslobađanje i neminovno, javlja se porast nivoa kateholamina i glukokortikoida u krvotoku (McCarty i sar., 1988; Goldstein, 2003; Dronjak i Gavrilović, 2006; Romero i Butler, 2007; Goldstein, 2010), što omogućava preživljavanje jedinke u datoj situaciji. Zabeleženo je da akutni stres dovodi do povećanja nivoa adrenalina i noradrenalina u humanoj plazmi približno dva do deset puta. Međutim, u izvesnim okolnostima, kao što je na primer hipoglikemija indukovana primenom insulina, primećeno je da vrednosti adrenalina u krvi rastu oko 10 do 30 puta (Tank i Wong, 2015). Poznato je da kateholamini ispoljavaju brojne efekte, prevashodno na ponašanje, metabolizam, kardiovaskularni, kao i respiratorni sistem, što za rezultat ima reakciju jedinke definisanu kao "bori se ili beži" ili "fight-or-flight" odgovor (Goldstein, 2003; Romero i Butler, 2007). Kateholamini uzrokuju kontrakciju glatke muskulature krvnih sudova na periferiji, povećavaju frekvenciju rada srca i snagu kontrakcije, što dovodi do porasta krvnog pritiska, izazivaju bronhodilataciju, relaksaciju glatkih mišića gastrointestinalnog trakta i mišića detrusora mokraćne bešike i midrijazu. Dodatno, kateholamini imaju metabolička delovanja, koja obuhvataju stimulaciju glikogenolize i glukoneogeneze u jetri, kao i lipolize u masnom tkivu, u cilju mobilizacije supstrata i povećane proizvodnje energije, neophodne za pojačanu mišićnu aktivnost, prilikom izlaganja stresoru (Tank i Wong, 2015). Opisane efekte kateholamini ostvaruju posredstvom interakcije sa svojim receptorima koji pripadaju klasi receptora udruženih sa G-proteinima. Međutim, hipoteza koja ukazuje na značaj kateholamina, dovodi u vezu dugoročno povišen nivo cirkulišućih adrenomedularnih neurohormona sa razvojem brojnih oboljenja za koja je stres jedan od glavnih predisponirajućih faktora, uključujući depresiju, anksiozne poremećaje,

kardiovaskularne bolesti i metaboličke poremećaje (Tank i Wong, 2015; Stefanović i sar., 2019). Istraživanja su pokazala pozitivnu korelaciju između simptoma depresije i povećane ekskrecije noradrenalina putem urina, kod osoba koje boluju od ishemijske bolesti srca (Otte i sar., 2005). Smatra se da je hronično visok nivo noradrenalina prognostički marker i značajan faktor rizika za neželjene kardiovaskularne događaje. Nalazi studija govore u prilog tome da se kod osoba koje pate od asimptomatske disfunkcije leve komore, povišen nivo cirkulišućeg noradrenalina razmatra kao jedan od prediktora kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (Benedict i sar., 1996). Patološki mehanizmi koji se pominju i posreduju u efektima noradrenalina uključuju direktno toksično dejstvo na kardiomiocite, svojstvo noradrenalina da prouzrokuje tahiaritmije i stimulatorni efekat na agregaciju trombocita (Otte i sar., 2005).

Aktivacija struktura limbičkog sistema i hipotalamusa omogućava integraciju neuroendokrinih i emotivnih komponenti i na taj način uslovljava dužinu trajanja, kao i intenzitet neurohumoralnog odgovora na stres. Nalazi studija ukazuju da različite vrste stresa mogu u izvesnim okolnostima dovesti do različitih bihevioralnih i neurobioloških odgovora (Jedema i sar., 1999; Goldstein, 2003), što može objasniti izveštaje vezane za interindividualne varijacije u koncentraciji parametara HPA ose, kateholamina i serotonina u plazmi kod pacijenata obolelih od depresivnog poremećaja (Veith i sar., 1994; Gold i Chrousos, 2002; Otte i sar., 2005), kao i u animalnim modelima hroničnog stresa/depresije (McCarty i sar., 1988; Dronjak i Gavrilović, 2006). Opisani fenomen ilustruje i činjenica da u našem modelu depresije indukovane hroničnom primenom ACTH, nakon tri nedelje, suprotno očekivanjima nije bilo značajnih promena u vrednostima kateholamina u plazmi u odnosu na zdrave životinje. Shodno tome, može se pretpostaviti da je dugotrajna izloženost ACTH, kao jednom od glavnih molekularnih medijatora stresa i aktivnosti HPA osovine, za posledicu imala adaptaciju simpatikusnog adrenomedularnog sistema. Pomenuti fenomen opisan je i u drugim istraživanjima, uključujući studiju koju su sprovedi Dronjak i Gavrilović (2006), u kojoj je uočena adaptacija adrenalnih žlezda na hronični stres socijalne izolacije, kod mužjaka pacova. Interesantno je da su ranija ispitivanja pokazala značajno povišenu bazalnu aktivnost noradrenergičkih neurona *locus ceruleus*-a kod životinja izloženih hroničnom stresu (Mana i Grace, 1997; Oosterhof i sar., 2016). Pretpostavlja se da su pomenute elektrofiziološke promene aktivnosti neurona zapravo indirektni pokazatelj i rezultat smanjenog nivoa noradrenalina u ekstracelularnoj tečnosti *locus ceruleus* (LC), što kao posledicu ima smanjenu inhibiciju koja se ostvaruje posredstvom ovog neurohormona i α_2 adrenergičkih autoreceptora. Primenom protokola koji se zasniva na izlaganju eksperimentalnih životinja prenatalnom stresu, koji je ranije prihvaćen kao neurorazvojni model depresivnog ponašanja, u istraživanju koje su sprovedi Oosterhof i sar. (2016), zapažen je porast aktivnosti neurona LC kod mužjaka pacova, ali ne i karakteristične bihevioralne promene koje reflektuju depresivni fenotip. Dobijeni rezultati i odstupanja navode na pretpostavku da je hiperaktivnost noradrenergičkih neurona LC zapravo neuralni mehanizam adaptacije, koji doprinosi otpornosti organizma na stres, što sprečava razvoj depresivnog poremećaja kod ovih životinja. Takođe, pokazano je da kod životinja izloženih prenatalnom stresu, FST ima supresivni efekat na aktivnost noradrenergičkih neurona LC, dok kod zdravih životinja ispoljava suprotno dejstvo (Oosterhof i sar., 2016).

Izveštaji ranijih studija ukazuju da kod depresivnog poremećaja nivo centralnih i perifernih kateholamina može biti povišen, snižen, ali i nepromenjen (Gold i Chrousos, 1999; 2002). Naime, prema prvobitnoj, široko potkrepljenoj hipotezi, depresivni poremećaj, kao jedna od dominantnih karakteristika, odlikuje hiperaktivnost simpatikusnog dela autonomnog nervnog sistema, praćena povišenim nivoom cirkulišućeg adrenalina i noradrenalina. Takođe, smatra se da, kod određenog broja pacijenata obolelih od depresije, aktivacija simpatikusa pokazuje pozitivnu korelaciju sa intenzitetom i dužinom trajanja simptoma (Veith i sar., 1994). Danas je poznato da je depresija heterogeno oboljenje, pri čemu se dijagnostički razlikuju dva podtipa: melanholična i atipična

depresija. Kod osoba koje pate od melanholične depresije pojačan je odgovor na stres, prisutni su anksioznost, strah od budućnosti, insomnija i gubitak apetita. Interesantno je pomenuti da neurohumoralne mehanizme regulacije odlikuje hiperaktivnost HPA osovine i simpatikusa, što se manifestuje hiperkortizolemijom i povišenim nivoom kateholamina u plazmi (Gold i Chrousos, 1999). Sa druge strane, kod pacijenata koji boluju od atipične depresije javljaju se apatija, letargija, hiperfagija, hipersomnija, prisutna je hipofunkcija HPA ose, kao i smanjena aktivnost simpatikusa, praćene hipokortizolemijom i sniženim vrednostima kateholamina u plazmi (Gold i sar., 1988; 1996; Gold i Chrousos, 1999; 2002). U animalnim modelima depresivnog ponašanja, primena različitih oblika stresa, obrasci, kao i dužina izlaganja, umnogome su usloveli razvoj specifičnog fenotipa, odnosno ispoljavanje bihevioralnih i neuroendokrinih promena koje verno oslikavaju melanholičnu ili sa druge strane, atipičnu depresiju. Prilikom ispitivanja neurobioloških promena koje nastupaju, vezanih prevashodno za monoaminički sistem i cirkulišuće kateholamine, pokazano je da kod odraslih mužjaka pacova Wistar soja dugotrajni stres uzrokovan socijalnom izolacijom životinja dovodi do značajnog smanjenja nivoa deponovanog noradrenalina u hipotalamusu, bez ispoljavanja uticaja na koncentraciju kateholamina deponovanih u adrenalnim žlezdama (Dronjak i Gavrilović, 2006). Sa druge strane, u ovom istraživanju je zapaženo da akutni stres indukovani imobilizacijom životinja ne dovodi do promene nivoa kateholamina u hipotalamusu, kod jedinki prethodno izloženih socijalnoj izolaciji, dok kod zdravih životinja za posledicu ima značajno smanjenje nivoa noradrenalina u hipotalamusu i hipokampusu. Dodatno, akutni stres uzrokovan imobilizacijom je doveo do upadljivog smanjenja sadržaja adrenalina (za približno 72%) i noradrenalina (za približno 50%) u hromafinim ćelijama medule nadbubrega kod zdravih, ali i životinja prethodno podvrgnutih dugotrajnoj socijalnoj izolaciji (Dronjak i Gavrilović, 2006). Pored utemeljene i dobro potkrepljene teorije, koja prevashodno navodi zavisnost efekta od vrste, načina izlaganja i dužine trajanja stresa, nameće se pretpostavka da desenzitizacija kateholaminergičkog sistema pokazuje tkivnu specifičnost.

Sa druge strane, ispitivanja su pokazala da deficijencija Mg kod eksperimentalnih životinja za posledicu ima porast nivoa kateholamina, kao i poremećaj regulacije krvnog pritiska posredstvom refleksa sa baroreceptora (Altura i sar., 1984; Murasato i sar., 1999). U okviru daljih istraživanja korelacije između hipomagnezemije i metabolizma neurohormona, otkriveno je da selektivan uzgoj miševa, čiji genotip uslovljava smanjen nivo Mg u krvi, dovodi do porasta koncentracije noradrenalina u mozgu i povećanja urinarne ekskrecije ovog biogenog amina, bez uticaja na nivo dopamina i serotonina u mozgu ovih životinja (Amyard i sar., 1995). Potom su usledila ispitivanja u kojima je pažnja bila usmerena na utvrđivanje povezanosti između izloženosti organizma stresu i homeostaze magnezijuma. Utvrđeno je da akutni stres uzrokuje porast koncentracije Mg u plazmi i izaziva povećanje urinarne ekskrecije ovog biometala (Murck, 2002). Pretpostavlja se da se zabeleženi porast vrednosti Mg u plazmi odigrava zahvaljujući pomaku ovog jona iz intracelularne u ekstracelularnu tečnost i smatra se da ovaj mehanizam ostvaruje protektivno dejstvo i umanjuje nepovoljne efekte stresa. Međutim, ukoliko je organizam tokom dužeg perioda izložen stresu, može se javiti deficit Mg i hipomagnezemija, što povećava osetljivost na dejstvo novog stresora i kod pacova se, u sklopu bihevioralnih promena, može manifestovati kao pojačana iritabilnost i agresivnost (Cuciureanu i Vink, 2011).

Dodatno, neophodno je pomenuti izveštaje koji dovode u vezu farmakološke efekte magnezijuma i aktivnost adrenomedularnog i kateholaminergičkog sistema. Nalazi studija upućuju na jedan od mehanizama kojim magnezijum ostvaruje svoj efekat, koji se može uporediti sa simpatolitičkim dejstvom. Shimosawa i sar. (2004) su došli do interesantnog otkrića kada su u studiji na pacovima Sprague–Dawley soja primetili da Mg inhibira sekreciju kateholamina iz adrenalnih žlezda i da deluje supresivno na oslobađanje noradrenalina iz nervnih završetaka blokadom perifernih Ca-voltažno zavisnih kanala N-tipa. Kasnije su Komaki i sar. (2013) potvrdili

ovaj supresorni efekat na lučenje hormona srži nadbubrega i pritom je zapaženo da intravenska primena magnezijuma kod mužjaka pacova Wistar soja inhibira i oslobađanje acetilholina iz preganglijskih simpatikusnih vlakana koja inervišu medulu adrenalne žlezde. Opisani modulatorni efekat na neurohumoralni odgovor organizma može objasniti i farmakološku intravensku primenu magnezijum sulfata u toku endotrahealne intubacije, kao i laparoscopske holecistektomije, u cilju sprečavanja porasta nivoa cirkulišućih kateholamina (Jee i sar., 2009).

Međutim, u našem istraživanju je prvi put zapaženo da hronični tretman magnezijum sulfatom indukuje porast nivoa adrenalina, noradrenalina i serotonina kod zdravih mužjaka pacova, prilikom izlaganja organizma akutnom stresu u formi FST. Dodatno, primena magnezijum sulfata ispoljava protektivni efekat u modelu depresivnog ponašanja, što se, takođe, delom može objasniti porastom adrenalina i noradrenalina u plazmi tokom izvođenja FST. Smatra se da povećanje nivoa pomenutih kateholamina i serotonina u plazmi životinja zapravo određuje ponašanje jedinke i preusmerava odgovor na akutni stres ka aktivnostima koje imaju za cilj pronalaženje izlaza iz naizgled beznadežne situacije kojoj su podvrgnute u toku bihevioralnog testa. Opisani obrazac ponašanja je u suprotnosti sa bihevioralnim karakteristikama koje odlikuju depresivni fenotip, koje su primećene i u našem istraživanju kod mužjaka pacova tretiranih adrenokortikotropnim hormonom, i koje se ispoljavaju kao produženo vreme imobilnosti i redukovano vreme plivanja, što reflektuje osećaj beznada kod životinja. Postoji još jedna pretpostavka, prema kojoj Mg stimuliše oslobađanje serotonina iz granula trombocita, što za rezultat ima primetan porast koncentracije ovog biogenog amina u plazmi, koji je u našem ispitivanju detektovan kod glodara tretiranih magnezijum sulfatom. U svetlu ovih otkrića, značajno je pomenuti da hronična i akutna primena fluoksetina, indukuju izražen porast adrenalina i noradrenalina u plazmi, kod pacijenata obolelih od depresivnog poremećaja (Blardi i sar., 2005).

5.4. Efekti hronične primene magnezijuma na parametre aktivnosti HPA osovine u plazmi eksperimentalnih životinja u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive

Koncept stresa koji je danas opšteprihvaćen prvi put je uveden dvadesetih godina prošlog veka, zahvaljujući istraživanjima koja su predvodili Walter B. Cannon i Hans Selye (Cannon 1914; 1928; Selye, 1936; McCarty i sar., 1988). Imajući u vidu da jednu od centralnih komponenti fiziološkog odgovora organizma na stres čine molekularni medijatori koji se oslobađaju aktivacijom HPA ose, ali i ulogu disregulacije ovog sistema u nastanku depresivnog poremećaja, u sklopu eksperimenata prve faze ispitivali smo promene u koncentraciji ACTH, kortikosterona i IL-6 u plazmi životinja. Rezultati ove disertacije su pokazali da tretman adrenokortikotropnim hormonom u dozi od 10 µg/dan i trajanju od 21 dan, kod mužjaka pacova Wistar soja dovodi do razvoja depresivnog fenotipa koji karakteriše hiperaktivnost HPA osovine, što se manifestuje izraženim porastom nivoa kortikosterona u plazmi. Zabeleženi porast kortikosterona kod nestresiranih glodara javio se isključivo u ACTH grupi, dok je kod ACTH/Mg životinja primena magnezijum sulfata, putem vode za piće (300 mg magnezijuma/L, tokom 28 dana) suprimirala ovaj efekat. Takođe, primećeno je da je nivo cirkulišućeg IL-6 značajno redukovano kod zdravih životinja Mg grupe i da je pritom ovaj fenomen pokazao trend smanjenja kod glodara izloženih hroničnom ACTH/Mg tretmanu.

U svetlu ovih otkrića, nekoliko istraživačkih grupa razmatra hiperaktivnost HPA ose kao potencijalni biomarker depresivnog poremećaja, što dodatno potvrđuje učestalost ovog nalaza u animalnim modelima, ali i kod depresivnih pacijenata (Heuser i sar., 1994; Stetler i Miller, 2011; Lok i sar., 2012; Oosterhof i sar., 2016). Ispitivanja su pokazala da izloženost stresu u toku perioda

ranog razvoja, predstavlja značajan faktor rizika koji kasnije tokom života uslovljava razvoj prekomerne aktivacije HPA osovine i ispoljavanje različitih psihopatologija (Maccari i sar., 1995; Brown i sar., 2000; Rice i sar., 2007; Entringer i sar., 2009; Heim i sar., 2010). Ward i Weisz (1984) su prvi opisali neurorazvojni model, koji se zasniva na izlaganju trudnih ženki pacova stresu uzrokovanim fizičkim sputavanjem. Tokom poslednje dve decenije, pomenuti neurorazvojni model je postao jedan od najčešće primenjivanih modela prenatalnog stresa koji dovodi do poremećaja učenja i pamćenja (Lemaire i sar., 2000), pojave anksioznosti (Van den Hove i sar., 2014) i depresivnog ponašanja kod životinja u adultnom dobu (Maccari i sar., 1995; Sun i sar., 2013). Smatra se da je kod glodara poslednja nedelja gestacije jedan od najosetljivijih perioda prenatalnog razvoja i da izloženost visokom nivou kortikosterona u ovom dobu, kasnije tokom života, dovodi do trajnih bihevioralnih poremećaja. Objašnjenje se može potražiti u izveštajima koji upućuju da se tokom ovog perioda razvija hipotalamo-hipofizno-adrenalni sistem fetusa (Oosterhof i sar., 2016). Naime, mineralokortikoidni i glukokortikoidni receptori, preko kojih se ostvaruje mehanizam negativne povratne sprege i regulacija aktivnosti HPA osovine, pokazuju ekspresiju u hipokampusu fetusa počevši od 13. dana gestacije (Diaz i sar., 1998). Pokazano je da visok nivo glukokortikoida s vremenom dovodi do smanjenja ekspresije mineralokortikoidnih receptora u hipokampusu, što za posledicu ima produženu aktivaciju HPA ose nakon stresa, kod odraslih jedinki (Maccari i sar., 1995; Oosterhof i sar., 2016).

Interesantno je da postoji nekoliko puteva i signalnih sistema koji omogućavaju koordinaciju aktivnosti i međusobnu komunikaciju HPA osovine i monoaminergičkog sistema. Na primer, noradrenergički neuroni LC ostvaruju svoje projekcije na neurone PVN hipotalamusa i aktiviraju HPA osu posredstvom α adrenergičkih receptora (Cummings i Seybold, 1988; Leibowitz i sar., 1989). Noradrenalin deluje stimulatorno i na amigdaloidna jedra, moždane strukture koje stimulišu ekspresiju CRF, samim tim povećavaju aktivnost HPA sistema. Dodatno, noradrenalin ispoljava inhibitorni efekat na medijalni prefrontalni korteks, strukturu koja u fiziološkim uslovima suprimira aktivnost HPA osovine (Wong i sar., 2000). Sa druge strane, aktivacija CRF1 receptora posredstvom kortikotropin-oslobađajućeg faktora, smeštenih u LC regiji mozga, uzrokuje porast aktivnosti noradrenergičkih neurona i samim tim za ishod ima povećano oslobađanje ovog neurotransmitera (Page i Abercrombie, 1999; Jedema i Grace, 2004). Pored toga, serotoniniski neuroni dorzalnog *raphe nucleus* daju projekcije i formiraju sinapse sa neuronima PVN hipotalamusa, uzrokujući aktivaciju HPA ose delovanjem na 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptore (Zhang i sar., 2004; Oosterhof i sar., 2016). Nasuprot tome, pokazano je da glukokortikoidi ispoljavaju inhibitorni efekat na ekspresiju 5-HT_{1A} receptora u dorzalnom *raphe nucleus* pacova (Laaris i sar., 1995; Wissink i sar., 2000).

U ispitivanju koje su sproveli Oosterhof i sar. (2016), u modelu prenatalnog stresa koji se zasniva na izlaganju trudnih ženki pacova fizičkom sputavanju, primećeno je da se kod potomaka kada dostignu polnu zrelost bazalni nivo kortikosterona u krvi ne razlikuje u odnosu na vrednosti ovog parametra kod zdravih jedinki iz kontrolne grupe. Međutim, kod jedinki izloženih prenatalnom stresu, nivo kortikosterona je ostao izrazito povišen 60 min nakon izvođenja FST, što najverovatnije odražava poremećaj negativne povratne sprege koja posreduje u regulaciji funkcije HPA osovine, nalaz koji se često sreće kod jedinki podvrgnutih stresu u intrauterinom periodu (Oosterhof i sar., 2016). U našoj studiji, u odsustvu delovanja akutnog stresora, nivo kortikosterona u plazmi je bio značajno povišen u ACTH grupi, dok je nakon testa forsiranog plivanja izostao očekivani porast glukokortikoida kod životinja tretiranih adrenokortikotropnim hormonom. Naime, neuroendokrini odgovor organizma na akutni stres je bio izmenjen u ACTH, kao i u ACTH/Mg grupi. Prilikom analize vrednosti kortikosterona u plazmi, kada se izvrši poređenje između životinja koje nisu podvrgnute FST i životinja koje su bile izložene ovom bihevioralnom testu, nije bilo značajnih razlika unutar ACTH, ali i ACTH/Mg grupe. Pretpostavka je da se opisani efekat, koji

karakterišu hiperaktivnost u uslovima sličnim bazalnim i smanjena reaktivnost na akutni stres, u našoj studiji, razvio kao posledica poremećaja funkcije HPA osovine, praćenog razvojem depresivnog fenotipa, indukovanog hroničnim ACTH tretmanom. Opisani nalazi, dobijeni u sklopu naših eksperimenata, u skladu su sa rezultatima studije koju su sproveli Kitamura i sar. (2002a), koristeći pritom isti model depresije, uz neznatne varijacije u protokolu. U pomenutom istraživanju, nakon dugotrajne primene ACTH (100 µg/dan, *s.c.*, tokom 14 dana), kod mužjaka pacova Wistar soja je zabeležen upadljiv porast korikosterona u plazmi, koji reflektuje hiperaktivnost HPA osovine, u odnosu na životinje kontrolne grupe. Kasnije, u ispitivanju koje su sproveli Kobayashi i Segi-Nishida (2019), primenom modifikovanog protokola, nakon hronične aplikacije ACTH (0,45 mg/kg/dan, *s.c.*, tokom 18 dana) bazalne vrednosti kortikosterona u plazmi se nisu značajno razlikovale između ACTH i kontrolne grupe miševa. Interesantno je zapažanje da je u značajnom broju studija, u različitim modelima hroničnog stresa koji indukuje razvoj depresivnog ponašanja kod eksperimentalnih životinja, uključujući model hroničnog blagog i nepredvidivog stresa (Ferland i Schrader, 2011; Le i sar., 2016; Zhou i sar., 2018), model socijalne izolacije (Dronjak i sar., 2004; Ruscio i sar., 2007; Hawkley i sar., 2012), kao i stres uzrokovan ponavljanom imobilizacijom (Zhu i sar., 2008), potvrđeno prisustvo visokog nivoa cirkulišućih glukokortikoida. Međutim, u drugim prekliničkim ispitivanjima, u validiranim modelima hroničnog stresa, zabeležen je snižen (Hermes i sar., 2006; Đorđević i sar., 2010), ali i nepromenjen nivo kortikosterona (Scaccianoce i sar., 2006; Grippo i sar., 2007) kod stresiranih u poređenju sa zdravim životinjama. Navedena odstupanja u izveštajima mogu se pripisati razlikama u izboru vrsta, starosnom dobu životinja, kao i eksperimentalnim protokolima, u najvećoj meri samoj prirodi i dužini delovanja stresora (Hawkley i sar., 2012).

Rezultati našeg istraživanja su, nakon ekstrapolacije, konzistentni sa nalazima kliničkih studija u kojima je dokazano prisustvo hiperkortizolemije kod osoba koje boluju od depresivnog poremećaja (Sachar i sar., 1980; Pfohl i sar., 1985; Wong i sar., 2000; Vreeburg i sar., 2009; Lok i sar., 2012; Jia i sar., 2019). Treba pomenuti i da je u nekim ispitivanjima zapažena pozitivna korelacija između nivoa cirkulišućeg kortizola i intenziteta depresivnih simptoma, i pri tom je najveći porast ovog hormona stresa zabeležen u grupi pacijenata koji pate od teške depresije (Jia i sar., 2019). Hronično povišen nivo kortizola ostvaruje brojne nepovoljne efekte i dovodi se u vezu sa insulinskom rezistencijom, povećanom masom visceralnog masnog tkiva i pratećim proaterogenim sekvelama, osteopenijom/osteoporozom, sarkopenijom, inhibicijom imunskog odgovora posredovanog pomoćničkim Th1 limfocitima i supresijom mezolimbičkog dopaminergičkog sistema nagrade (Gold i Chrousos, 2002). Tokom akutnog stresa, aktivacija glukokortikoidnih receptora eksprimiranih u prefrontalnom korteksu, hipotalamusu i hipokampusu, za ishod ima inhibiciju aktivnosti HPA osovine. Međutim, dugotrajna signalizacija posredstvom glukokortikoidnih receptora lokalizovanih u neuronima hipokampusa, uzrokuje oštećenje ovih ćelija, posledično se smanjuje inhibitorna kontrola koju ova moždana struktura ispoljava nad HPA osom i dalje se produbljuje hiperkortizolemija (Sapolsky, 1990; Gold i Chrousos, 2002).

Neophodno je istaći da je u kliničkim ispitivanjima pokazano da nivo kortizola u plazmi/serumu kod depresivnih pacijenata može biti nepromenjen (Wang i sar., 2018), ali i snižen u poređenju sa zdravim osobama (Brouwer i sar., 2005; Bremmer i sar., 2007; Kabia i sar., 2016). Navedena otkrića nisu iznenađujuća, imajući u vidu da depresivni poremećaj predstavlja jedno heterogeno, rekurentno oboljenje i da se klinička slika i neuroendokrini profil razlikuju u zavisnosti od podtipa depresije. Pored atipične depresije, primećeno je da se hipokortizolemija u kontekstu depresivnog poremećaja, neretko javlja kod osoba ženskog pola, pušača i udružena sa bolestima zglobova (Bremmer i sar., 2007). Jedna od hipoteza je da hipokortizolemija kod obolelih od depresije nastaje usled hroničnog iscrpljivanja bioloških mehanizama i signalnih puteva koji posreduju u aktivaciji HPA osovine. Prema drugoj hipotezi, koju su najpre usvojili Yehuda i sar.

(1990) i koja ne isključuje prethodnu, hroničan stres dovodi do adaptacije organizma i povećava osetljivost hipotalamusa i hipofize na glukokortikoide, što potencira inhibitorni efekat kortizola na ove komponente neuroendokrinog HPA sistema i vodi ka daljoj supresiji HPA osovine. Takođe, zapaženo je da je nizak nivo cirkulišućeg kortizola jedna od upečatljivih endokrinih promena koje prate posttraumatski stresni poremećaj (Yehuda i sar., 1990) i sindrom hroničnog umora (Scott i Dinan, 1998), nezavisno od postojećih komorbiditeta i /ili prisustva simptoma depresije (Oldehinkel i sar., 2001).

U sklopu naše studije je pokazano da hronični tretman magnezijum sulfatom suprimira prekomernu sekreciju kortikosterona i normalizuje aktivnost HPA osovine, u modelu depresivnog ponašanja indukovano kod mužjaka pacova Wistar soja. Dobijeni rezultati konzistentni su sa nalazima ispitivanja koje su sproveli Sartori i sar. (2012), koji ukazuju da kod mužjaka miševa, C57Bl/6N i BALB/c soja, primena dijetete sa smanjenim unosom Mg (obezbeđuje oko 10% dnevnih potreba magnezijuma), tokom tri nedelje, dovodi do poremećaja funkcije neuroendokrinog HPA sistema. Disregulacija HPA osovine se manifestovala porastom ekspresije iRNK za prepro-CRF u paraventrikularnom jedru hipotalamusa i nivoa cirkulišućeg ACTH kod eksperimentalnih životinja, što potencijalno odražava hiperaktivnost HPA sistema (Sartori i sar., 2012). Navedena saznanja, zajedno sa izveštajima *in vitro* eksperimenata, upućuju na pretpostavku da Mg prevashodno inhibira sekreciju CRF, kao centralnog molekuskog regulatora funkcije HPA osovine i na taj način suprimira hiperaktivnost ovog neuroendokrinog sistema (Cratty i Birkle, 1999). Dodatno, u istraživanju koje su sproveli Zhou i sar. (2018), uočeno je da se u modelu hroničnog blagog i nepredvidivog stresa, kod mužjaka pacova Sprague-Dawley soja značajno povećava ekspresija i aktivnost sinaptičkih glutamatergičkih NMDA receptora, smeštenih u membrani neurona PVN u hipotalamusu, koji oslobađaju CRF. Smatra se da porast signalizacije posredstvom NMDA receptora i neminovno sekrecije CRF, u znatnoj meri doprinosi hiperaktivnosti HPA osovine i prekomernom oslobađanju kortikosterona (Zhou i sar., 2018). Shodno tome, možemo izneti hipotezu, prema kojoj je magnezijum, zahvaljujući osobini negativnog alosternog modulatora NMDA receptora, suprimirao glutamatergičku transmisiju u hipotalamusu, što je za posledicu imalo inhibiciju prekomerne sekrecije kortikosterona i normalizaciju funkcije neuroendokrinog HPA sistema u modelu depresivnog ponašanja. U skladu sa našim saznanjima, ovo je prvo *in vivo* istraživanje čiji rezultati upućuju na modulatorni, prevashodno inhibitorni efekat hroničnog Mg tretmana, koji omogućava kontrolu i supresiju povišene aktivnosti HPA ose kod glodara, u modelu depresije. Imajući u vidu da su neuroni PVN hipotalamusa, koji sintetišu i oslobađaju CRF, glavna komponenta koja determiniše aktivnost HPA sistema, modulacija njihove funkcije posredstvom NMDA receptora omogućava jedan novi terapijski pristup u lečenju afektivnih poremećaja i upravo u tome se ogleda translaciona vrednost naše studije.

Danas je prihvaćeno nekoliko teorija, posvećenih rasvetljavanju etiopatoloških mehanizama i neurobioloških i psihosocijalnih faktora u osnovi depresivnog poremećaja. Uprkos tome što se prva otkrića vezuju za pedesete godine prošlog veka i monoaminsku hipotezu, nakon koje su usledile teorija o poremećaju funkcije HPA sistema, neurotrofična hipoteza i citokinska teorija, patofiziološki mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni (Jia i sar., 2019). Poslednjih godina, fokus istraživanja je pretežno usmeren na glukokortikoide i proinflamatorne citokine, kao centralne molekulske medijatore koji posreduju u nastanku i progresiji depresije. Pored hiperaktivnosti HPA osovine i poremećaja regulacije koja se ostvaruje zahvaljujući mehanizmu negativne povratne sprege i kortizolu, jedan od najkonzistentnijih nalaza kod depresivnih pacijenata je rezistencija na glukokortikoide (Pace i sar., 2007; Nikkheslat i sar., 2015; Jia i sar., 2019). Naime, jedan od najupadljivijih farmakoloških efekata glukokortikoida je snažno antiinflamatorno, kao i imunosupresivno dejstvo. Etiologija rezistencije na glukokortikoide, koja se sreće kod inflamatornih i neuropsihijatrijskih oboljenja, nije poznata, iako se pominje uticaj velikog broja faktora, među

kojima je i genetska predispozicija. Povrh toga, istraživanja ukazuju da inflamacija, sama po sebi, smanjuje osetljivost ciljnih tkiva na efekte glukokortikoida (Pace i sar., 2007; Nikkheslat i sar., 2015). U našoj studiji hronična primena ACTH kod mužjaka pacova Wistar soja nije uticala na nivo proinflamatornog citokina IL-6 u plazmi. Slični rezultati zabeleženi su i u istraživanju koje su sproveli Donner i sar. (2012), u ranije pomenutom modelu hiperkortizolemije, praćene razvojem depresivnog ponašanja, koji se zasniva na tronedeljnom tretmanu kortikosteronom (40 µg/mL, 100 µg/mL ili 400 µg/mL). U ovoj studiji je pokazano da primena kortikosterona, u navedenim dozama, ne dovodi do značajnih promena koncentracije IL-6 u plazmi odraslih mužjaka pacova (Donner i sar., 2012), što nije iznenađujuće imajući u vidu heterogenu prirodu depresivnog poremećaja. Sa druge strane, određeni broj studija je ukazao da se kod obolelih od depresije može razviti sistemska inflamacija, kojoj u znatnoj meri doprinosi smanjena ekspresija i desenzitizacija glukokortikoidnih receptora (Nikkheslat i sar., 2015). Izveštaji upućuju da kod osoba koje pate od depresije nivoi cirkulišućih IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, kao i C-reaktivnog proteina (CRP, eng. C-reactive protein), mogu biti značajno povišeni (Pace i sar., 2007; Nikkheslat i sar., 2015; Köhler i sar., 2017). Rezultati dobijeni u prvom setu eksperimenata, u okviru ove disertacije, ukazuju da hronična primena magnezijum sulfata dovodi do smanjenja nivoa inflamatornog citokina IL-6 u plazmi eksperimentalnih životinja. Opisani efekat je zabeležen kod zdravih, ali i kod pacova izloženih dugotrajnom ACTH tretmanu, i može biti posledica modulacije HPA sistema, ali i drugih, nezavisnih i do danas, u sklopu ovog modela depresije, nepoznatih mehanizama. Interesantno je da se efekat smanjenja cirkulišućeg IL-6 razvio i kod životinja podvrgnutih akutnom stresu, ali je u ovom slučaju bio izražen samo kod ACTH/Mg glodara. Shodno tome, naši rezultati upućuju na zaključak da primena magnezijuma, u modelu depresije rezistentne na terapiju, ima antiinflamatorna svojstva i u prilog ovoj tvrdnji govore izveštaji prekliničkih i kliničkih studija. Primera radi, u modelu hipotiroidizma, stanja koje odlikuje hronična inflamacija niskog stepena, primena magnezijum sulfata (80 mg/kg/dan, *i.p.*, tokom 14 dana) kod mužjaka pacova je indukovala značajno smanjenje nivoa CRP, IL-6, TNF- α , intercelularnog adhezionog molekula-1 (ICAM-1, eng. intercellular adhesion molecule-1) i vaskularnog ćelijskog adhezionog molekula-1 (VCAM-1, eng. vascular cell adhesion molecule-1) u plazmi (Abbas i Sakr, 2016). U skladu sa ovim saznanjima, pokazano je da suplementacija magnezijumom kod amaterskih ragbi igrača (500 mg/dan, tokom 28 dana), kao i kod osoba koje se rekreativno bave sportom (500 mg/dan, tokom 7 dana) dovodi do značajnog smanjenja vrednosti cirkulišućeg IL-6 (Dmitrašinović i sar., 2016; Steward i sar., 2019). Dodatno, zapaženo je da primena magnezijum sulfata, najpre u obliku bolus injekcije (30 mg/Kg, tokom 5 min), a potom u vidu intravenske infuzije, u dozi održavanja od 10 mg/Kg/h, tokom izvođenja kardiopulmonalnog bajpasa, za rezultat ima značajno snižen nivo IL-6, kao i TNF- α , u serumu pacijenta, postoperativno, u odnosu na placebo grupu (Aryana i sar., 2014). U randomizovanom, kontrolisanom kliničkom ispitivanju koje su sproveli Mojtahedzadeh i sar. (2016), utvrđeno je da aplikacija magnezijum sulfata u obliku kontinuirane intravenske infuzije (10 g MgSO₄ tokom 12 h) snažno suprimira sekreciju IL-6, nakon otvorene hirurške reparacije aneurizme abdominalne aorte. U svetlu ovih nalaza, interesantno je pomenuti da je još tridesetih godina prošlog veka primećeno da se kod pacova podvrgnutih dijetarnom režimu sa smanjenim unosom Mg, javljaju klinički znaci inflamacije (Mazur i sar., 2007). Opaženo je prisustvo karakterističnih simptoma koji odgovaraju alergijskoj reakciji, praćenih eritemom, hiperemijom i edemom, kod ovih životinja. Usledila su istraživanja koja su potvrdila ovo otkriće i predlažu se mehanizmi, koji posreduju u razvoju inflamacije u stanjima deficijencije Mg, i uključuju: povećan ulazak Ca u ćelije i olakšanu aktivaciju makrofaga, otvaranje Ca kanala i aktivaciju NMDA receptora, pojačano oslobađanje supstance P i aktivaciju NF- κ B (Mazur i sar., 2007). Opisana saznanja dopunjena su rezultatima još jednog istraživanja (Sugimoto i sar., 2012), koje je pokazalo da terapija magnezijum sulfatom kod trudnica, prilikom porođaja, kao i *in vitro*, ispoljava inhibični efekat na produkciju IL-6 i TNF- α u monocitima, supresijom aktivacije NF- κ B.

5.5. Efekti hroničnog tretmana magnezijumom na telesnu masu, apsolutnu i relativnu masu adrenalnih žlezda u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive

Depresija je klinički sindrom, poremećaj raspoloženja koji karakterišu duboko ukorenjen osećaj tuge i beznada, anhedonija, iritabilnost, kognitivni deficiti, ali i neurovegetativni simptomi, od kojih se neretko javljaju poremećaji apetita i spavanja (Krishnan i Nestler, 2008). Naime, značajne promene telesne mase kod obolelih od depresije mogu doprineti приметnom porastu rizika za razvoj gojaznosti, kasnije i metaboličkog sindroma. Pored toga, epidemiološki izveštaji upućuju na potencijalne biološke mehanizme koji u osnovi povezuju gojaznost i depresivni poremećaj, i ukazuju na činjenicu da prisustvo jednog od navedenih povećava rizik za nastanak drugog oboljenja (Mannan i sar., 2016; Milaneschi i sar., 2019). Shodno tome, u okviru prvog seta eksperimenata naših istraživanja, jedan od ciljeva je bio praćenje promena telesne mase u modelu depresivnog ponašanja indukovano dugotrajnom aplikacijom ACTH. Dobijeni rezultati ukazuju da je telesna masa životinja izloženih hroničnoj primeni ACTH bila značajno manja nakon tronedelnog tretmana u poređenju sa zdravim jedinkama. Međutim, primena magnezijum sulfata, putem vode za piće, u trajanju od 28 dana, delovala je protektivno kod životinja ACTH/Mg grupe i antagonizovala je negativne efekte ACTH tretmana na telesnu masu. Naši rezultati su konzistentni sa izveštajima ranijih studija, u kojima je zabeleženo da ponavljana primena hormona stresa, adrenokortikotropnog hormona ili kortikosterona, kod eksperimentalnih životinja indukuje značajno smanjenje telesne mase ili redukuje dobijanje na telesnoj masi. Naime, u istraživanju koje su sproveli Haack i sar. (1978), primećeno je da tretman odraslih mužjaka pacova Wistar soja adrenokortikotropnim hormonom (0,5 mg/kg/dan, *s.c.*), u trajanju od 10 dana, uzrokuje приметno smanjenje telesne mase. Pretpostavlja se da je gubitak telesne mase koje se javlja tokom prva dva dana ACTH tretmana, prevashodno posledica gubitka vode, dok nakon toga, od trećeg dana nadalje, primarni uzrok ove pojave se može objasniti smanjenim unosom hrane, kao i metaboličkim efektima glukokortikoida (Haack i sar., 1978). U skladu sa ovim saznanjima su i rezultati studije u kojoj su Donner i sar. (2012) pokazali da je nakon tronedeljne aplikacije kortikosterona, u dozama od 40 µg/mL i 100 µg/mL, porast telesne mase kod ovih jedinki bio značajno manji u poređenju sa zdravim životinjama kontrolne grupe. Primena kortikosterona u dozi od 400 µg/mL, u datom modelu hroničnog stresa, indukovala je izraženi gubitak telesne mase (Donner i sar., 2012). Opisane promene kod eksperimentalnih životinja, prevashodno redukovano povećanje telesne mase pacova, tokom tretmana kortikosteronom (100 µg/mL, *per os*, 21 dan), potvrđeno je u istovetnom animalnom modelu hroničnog stresa, koji su u svojoj laboratoriji uveli Stanić i sar. (2017). Sa druge strane, u modelu koji se zasniva na hroničnoj oralnoj primeni kortikosterona kod miševa C57BL/6 soja (25 µg/mL, 14 dana) i Sprague-Dawley pacova (50 µg/mL, 14 dana), Gourley i Taylor (2009) su pokazali odsustvo značajnih promena u telesnoj masi ovih jedinki u odnosu na životinje kontrolne grupe. Prilikom tumačenja naših rezultata i izveštaja drugih istraživanja, treba imati u vidu da su efekti ACTH na telesnu masu u značajnoj meri posredovani glukokortikoidima, kao i da je pre više od dve decenije pokazano da primena niskih doza kortikosterona ima anaboličko delovanje, dok umerene i visoke doze ovog hormona stresa pospešuju kataboličke procese u organizmu (Santana i sar., 1995). Dakle, možemo da pretpostavimo da je u našim eksperimentima, u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive, tokom hroničnog ACTH tretmana, hipersekrecija kortikosterona ispoljila stimulatorni efekat na kataboličke procese, što je za posledicu imalo приметno smanjenje telesne mase eksperimentalnih životinja.

Rezultati našeg istraživanja su očekivano potvrdili ranije nalaze da dugotrajna izloženost visokom nivou cirkulišućeg ACTH dovodi do hipertrofije nadbubrežne žlezde. Navedeni parametar se neretko prati, u cilju procene efikasnosti egzogene primene ACTH kod eksperimentalnih

životinja. Dodatno, u sklopu naših eksperimenata je zabeleženo da hronični tretman magnezijum sulfatom ne umanjuje negativne efekte koje ima ACTH na apsolutnu i relativnu masu adrenalnih žlezda kod pacova.

Odavno je poznato da ACTH ispoljava trofični efekat na nivou kore nadbubrežnih žlezda, kao i da hiperaktivnost HPA ose i povišen nivo cirkulišućeg ACTH indukuju morfološke i funkcionalne promene koje zahvataju ove endokrine žlezde (Dallman, 1984-85; Ferreira i sar., 2004; Füchsl i sar., 2013a, 2013b). Prilikom aktivacije HPA osovine, parvocelularni neurosekretorni neuroni dorzomedijalnog PVN hipotalamusa oslobađaju CRF i AVP, peptidne hormone koji stimuliše sekreciju ACTH iz kortikotropnih ćelija adenohipofize. ACTH je peptid sačinjen iz 39 aminokiselina i nastaje razgradnjom prekursorog molekula- proteina proopiomelanokortina (Füchsl i sar., 2013a; Novoselova i sar., 2019). Putem krvotoka, ACTH se transportuje do ciljnih tkiva, primarno adrenalnih žlezda, gde ostvaruje svoje efekte preko melanokortinskih receptora tipa 2 (MC2R, eng. melanocortin 2 receptor), poznatijih kao receptori za adrenokortikotropni hormon (ACTHR). MC2R je jedinstveni pripadnik familije melanokortinskih receptora, čiji je specifični, fiziološki ligand ACTH. Potvrđeno je da su MC2R eksprimirani u svim zonama adrenalnog korteksa, međutim, glavno mesto delovanja ACTH je zona fascikulata, u kojoj stimuliše sintezu i sekreciju glukokortikoida (Novoselova i sar., 2018, 2019). Regulacija i supresija prekomerne aktivnosti HPA osovine zasnivaju se na mehanizmu negativne povratne sprege i pritom glavna mesta inhibitornog dejstva kortizola/kortikosterona su adenohipofiza, hipokampus i PVN hipotalamusa. Na nivou hipofize, inhibitorni efekat glukokortikoida se ostvaruje zahvaljujući represiji gena koji kodira proopiomelanokortin, supresijom oslobađanja ACTH i negativnim uticajem na vezivanje CRH za CRH1 receptore (Füchsl i sar., 2013b). Istraživanja su pokazala da ponavljana primena ACTH, putem injekcija ili intravenske infuzije, za rezultat ima hipertrofiju kortikalnih ćelija nadbubrežne žlezde, karakterisanu značajnim porastom sinteze RNK i proteina. U zavisnosti od primenjene doze, ovaj efekat se javlja nekoliko sati ili dana od početka primene i kasnije je praćen hiperplazijom adrenokortikalnih ćelija (Dallman, 1984-85). U ispitivanju koje su sproveli Ferreira i sar. (2004), primećeno je da kod pacova intraperitonealna primena ACTH (0,2 mg/kg/dan) u trajanju od tri ili 15 dana, dovodi do značajnog povećanja mase adrenalne žlezde, što je u skladu sa rezultatima naše studije. Takođe, izveštaji ove studije ukazuju da je hipertrofija nadbubrežne žlezde bila primetna i 24 h nakon akutnog ACTH tretmana, dok sa druge strane, ovaj efekat nije zabeležen posle 2 h, kao ni 18 h nakon akutne primene ACTH. Dodatno, nakon ponavljanog ACTH tretmana (tokom 3 ili 15 dana), hipertrofija adrenalne žlezde je bila praćena upadljivim porastom nivoa cirkulišućeg kortikosterona, što upućuje na hiperaktivnost neuroendokrinog HPA sistema kod ovih životinja (Ferreira i sar., 2004). Dosadašnja saznanja, uključujući i nalaze naše studije, vezane za promene koje se odvijaju na nivou nadbubrežnih žlezda, još jednom su potvrdili Kobayashi i Segi-Nishida (2019), koristeći pritom, uz određene modifikacije protokola, isti model depresije rezistentne na triciklične antidepressive, indukovane ACTH tretmanom (0,45 mg/kg/dan, 18 dana).

Literaturni podaci ukazuju da je i u drugim modelima hroničnog stresa ili depresije kod eksperimentalnih životinja prisutna disregulacija HPA ose, što se neretko manifestuje poremećajem sekretorne aktivnosti kortikotropnih ćelija adenohipofize i značajnim morfološkim promenama na nivou adrenalnih žlezda, koje uključuju atrofiju ili hipertrofiju. Füchsl i sar. (2013a, 2013b) su u modelu psihosocijalnog stresa, zasnovanom na uzgajanju mužjaka miševa sa dominantnim mužjakom istog soja, pokazali izraženi porast jutarnjeg bazalnog nivoa ACTH u plazmi ovih jedinki. Takođe, kod ovih životinja su zabeležene i povišene vrednosti cirkulišućeg ACTH 10 min nakon izvođenja FST, upadljiv porast mase leve i desne nadbubrežne žlezde, kao i njihovog zbiru, u poređenju sa navedenim parametrima zdravih, kontrolnih životinja (Füchsl i sar., 2013a, 2013b). Primera radi, Donner i sar. (2012) su pokazali da tronedeljni tretman kortikosteronom indukuje

atrofiju adrenalnih žlezda kod odraslih mužjaka pacova Sprague Dawley soja. Primećeno je da ovaj efekat pokazuje doznu-zavisnost i da se kod životinja značajno smanjuje dijametar same žlezde, kao i korteksa (Donner i sar., 2012). Dodatno, zapaženo je da kortikosteron ispoljava najizraženiji efekat na širinu zone fascikulate, odnosno da se najupadljivije promene javljaju na nivou samih ćelija koje proizvode glukokortikoide. Pretpostavlja se da atrofija nadbubrežnih žlezda nastaje usled aktivacije negativne povratne sprege, koja ostvaruje inhibitornu kontrolu nad komponentama neuroendokrinog HPA sistema. U datim eksperimentalnim uslovima regulatorni mehanizam negativne povratne sprege snažno potencira egzogena aplikacija kortikosterona (Donner i sar., 2012). Slični rezultati zabeleženi su i u studiji koju su sproveli Stanić i sar. (2017), u kojoj je korišćen isti model hroničnog stresa, uz izbor srednje doze kortikosterona koja je primenjivana u ranijim istraživanjima (100 µg/mL, putem vode za piće). Naime, pored atrofije nadbubrežne žlezde, kod odraslih mužjaka Wistar pacova je uočeno značajno smanjenje površine adrenalnog korteksa i medule nakon tronedeljnog tretmana kortikosteronom (Stanić i sar., 2017). Suprotno dosadašnjim saznanjima, u ranije pomenutoj studiji koju su sproveli Gourley i Taylor (2009), nije zabeležena statistički značajna razlika u masi adrenalnih žlezda između glodara izloženih hroničnom tretmanu kortikosteronom i životinja kontrolne grupe, što se može tumačiti metodološkim razlikama.

Prema našim saznanjima, u okviru ove disertacije po prvi put su ispitivani efekti hronične aplikacije magnezijum sulfata na telesnu masu i masu nadbubrežnih žlezda, u animalnom modelu depresivnog ponašanja. Pokazano je da magnezijum suprimira hiperaktivnost HPA osovine i na taj način u znatnoj meri inhibira štetne efekte koje ispoljava ACTH tretman, sprečavajući pritom smanjenje telesne mase životinja. Uprkos tome što je delovao modulatorno na aktivnost HPA sistema, magnezijum nije ispoljio protektivni efekat na nivou adrenalnih žlezda, što se ogleda u činjenici da nije ublažio njihovu hipertrofiju uzrokovanu adrenokortikotropnim hormonom.

Interesantno je pomenuti da je u animalnom modelu anksioznog ponašanja, tronedeljna dijeta, zasnovana na restrikciji unosa magnezijuma (50 mg Mg/kg hrane, što obezbeđuje približno 10% dnevnih potreba za magnezijumom), dovela do značajno većeg porasta telesne mase kod miševa C57Bl/6N soja u poređenju sa životinjama kontrolne grupe, dok je kod BALB/c miševa ostvarila suprotan efekat (Sartori i sar., 2012). Prilikom korišćenja istog modela anksioznog ponašanja, Singewald i sar. (2004) su primetili da je nakon tri nedelje, telesna masa miševa C57Bl/6J soja, podvrgnutih datom režimu ishrane, smanjena za približno 5% u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod životinja kontrolne grupe. Iako tačan mehanizam nije razjašnjen, ova otkrića upućuju na zaključak da posledice deplecije magnezijuma kod eksperimentalnih životinja u velikoj meri zavise od vrste i soja. U kliničkim studijama, pažnja je pretežno bila usmerena na ispitivanje korelacije između unosa magnezijuma i kardiometaboličkih parametara i postoji skroman broj istraživanja u kojima je kod učesnika praćen efekat suplementacije magnezijumom na telesnu masu (Huang i sar., 2012; Cosaro i sar., 2014). Na primer, Moslehi i sar. (2012) su ispitivali uticaj suplementacije magnezijumom (magnezijum oksid, 250 mg/dan, 8 nedelja) na markere inflamacije kod osoba ženskog pola, prekomerne telesne težine, i tom prilikom je zapaženo da nije bilo značajnih promena telesne mase, kao ni visoko senzitivnog C-reaktivnog proteina (eng. high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP), fibrinogena i IL-6, po okončanju studije. Uprkos tome, pokazano je da magnezijum ima blagotvorno delovanje, koje se ogleda u primetnom smanjenju procenta telesnih masti i masnog tkiva kod ispitanika (Moslehi i sar., 2012). Rezultati kliničkih studija, ukazuju na blisku povezanost između visokog unosa magnezijuma putem ishrane i povećane osetljivosti na insulin (Cahill i sar., 2013). Uočeno je da postoji dozno zavisna povezanost između unosa magnezijuma i insulinske rezistencije, koja ne zavisi od starosti, pola, ukupnog kalorijskog unosa, fizičke aktivnosti, upotrebe lekova i gojaznosti. Takođe, ova inverzna korelacija je izraženija kod gojaznih i osoba sa prekomernom telesnom masom, što ovu populaciju čini posebno osetljivom na povoljne efekte Mg (Cahill i sar., 2013). Odavno je poznato da magnezijum

ostvaruje brojne uloge u metaboličkim procesima, uključujući sintezu proteina, glikolizu, reakcije fosforilacije, kao i da ima blag stimulatorni efekat na ulazak glukoze u ćelije. Jedna od pretpostavki je da Mg interreaguje sa aktivnošću tirozin-kinaza insulinskog receptora (Cahill i sar., 2013; Cosaro i sar., 2014). Imajući u vidu kompleksnu prirodu metaboličkih promena u uslovima hiperaktivnosti HPA ose i jasnu korelaciju između hiperkortizolemije i gojaznosti, metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2, neophodno je dalje istražiti efekte suplementacije magnezijumom u datim uslovima i utvrditi da li postoji povoljan uticaj ovog biometala na kardiometaboličke parametre.

5.6. Ispitivanje uticaja hroničnog tretmana magnezijumom na nivo bioelemenata u prefrontalnom korteksu mužjaka pacova u modelu depresivnog ponašanja

Esencijalni elementi su neophodni za pravilno funkcionisanje organizma i poremećaji njihove homeostaze se vezuju za brojna patološka stanja, uključujući depresiju. U najvećem broju istraživanja na temu deficijencije mikronutrijenata i depresivne simptomatologije, ispitivana je korelacija između nivoa Mg i/ili Zn u organizmu i prisustva depresivnog poremećaja, kao i težine kliničke slike (Młyniec i Nowak, 2012). U našoj studiji, u sklopu eksperimenata druge faze, u modelu depresivnog ponašanja indukovano adrenokortikotropnim hormonom, izvršeno je određivanje nivoa biometala – Fe, Cu, Zn i Mg u prefrontalnom korteksu mužjaka pacova hronično izloženih Mg suplementaciji. Gvožđe ima centralnu ulogu u transportu kiseonika, sintezi DNK molekula i određenih neurotransmitera (Młyniec i sar., 2014). Bakar je kofaktor brojnih enzima i ostvaruje važnu ulogu u biohemijskim procesima, uključujući ćelijsku respiraciju, eritropoezu, metabolizam gvožđa, holesterola i glukoze, kao i sintezu određenih hormona (Styczeń i sar., 2016). Cink ostvaruje esencijalnu ulogu u velikom broju fizioloških procesa, uključujući replikaciju, transkripciju, sintezu proteina, ćelijsku deobu i diferencijaciju (Młyniec i sar., 2014). U hipokampusu i korteksu, joni cinka regulišu aktivaciju brojnih ligand- i voltažno-zavisnih jonskih kanala (Wang i sar., 2018). Pored toga, u prekliničkim modelima je pokazano da cink ispoljava antidepresivni efekat kod životinja (Szewczyk i sar., 2002; Sowa-Kućma i sar., 2008). Navedeni biometali su neophodni za razvoj i fiziološke funkcije centralnog nervnog sistema, i svi su izučavani u kontekstu njihove uloge u nastanku i psihopatologiji depresivnog poremećaja (Prohaska i Smith, 1982; Maserejian i sar., 2012; Sowa-Kućma i sar., 2013; Młyniec i sar., 2014; Młyniec i sar., 2015; Styczeń i sar., 2016; Wang i sar., 2018).

U našoj studiji je zapaženo da Mg dovodi do primetnog porasta nivoa Cu, praćenog porastom odnosa Cu/Zn u prefrontalnom korteksu, jednoj od ključnih regija mozga, koja pokazuje atrofiju kod depresivnih pacijenata. Opisani efekat Mg, zajedno sa nalazima dobijenim u okviru prvog seta eksperimenata, o stimulatornom dejstvu Mg na oslobađanje adrenalina i noradrenalina kod zdravih, ali i kod životinja izloženih aplikaciji ACTH, govori u prilog hipotezi o povezanosti između Mg i monoaminergičkog sistema. Literaturni podaci ukazuju da deficit Cu kod glodara može dovesti do značajnog smanjenja nivoa noradrenalina u mozgu (Prohaska i Smith, 1982; Maes i sar., 1997; Maserejian i sar., 2012; Sowa-Kućma i sar., 2013; Młyniec i sar., 2014; Młyniec i sar., 2015; Wang i sar., 2018). Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije upućuju na pretpostavku da smanjenjem nivoa Cu u prefrontalnom korteksu, ACTH izaziva poremećaj noradrenergičke transmisije, dok primena Mg inhibira ovaj efekat. Interesantno je da ni ACTH ni Mg nisu uticali na homeostazu Zn i Fe u prefrontalnom korteksu u datom modelu depresivnog ponašanja.

Poremećaj homeostaze gvožđa, i u odsustvu anemije, utiče na raspoloženje i dovodi do pojave simptoma sličnih simptomima koji se susreću kod depresivnih pacijenata (Młyniec i sar., 2014). Pokazano je da psihosocijalni stres dovodi do porasta sadržaja gvožđa u mozgu (Młyniec i

sar., 2014), što nije u skladu sa nalazima naše studije. Povišen nivo gvožđa u mozgu uzrokuje smanjenje aktivnosti superoksid dismutaze i pad nivoa glutaciona, što smanjuje antioksidativnu zaštitu. Međutim, zapaženo je takođe da hronična i teška deficijencija gvožđa u detinjstvu dovodi do poremećaja kognitivnih i motornih funkcija, kao i pojave simptoma depresije i anksioznosti u adultnom dobu (Lozoff i sar., 2000). Styczeń i sar. (2016) su pokazali da je koncentracija Cu u serumu pacijenata koji pate od depresije za 11% niža u odnosu na zdrave osobe, što ne predstavlja statistički značajnu razliku. Takođe, zabeleženo je da nema razlike u nivou Cu u serumu tokom epizode depresije i faze remisije, kao ni između kontrola i osoba koje su u fazi remisije. Sa druge strane, u određenom broju istraživanja je zabeleženo da je koncentracija Cu značajno veća (za 22% i za 14%, redom) u krvi depresivnih pacijenata u poređenju sa zdravim ispitanicima (Manser i sar., 1989; Narang i sar., 1991). Interesantno je da su Maes i sar. (1997) primetili da, i pored odsustva značajne razlike u nivou Cu u serumu, između pacijenata koji pate od TRD i zdravih osoba, nakon terapijske primene antidepresiva se javlja značajan pad nivoa Cu. U ovoj studiji je uočeno da nema značajne korelacije između koncentracije Cu u serumu i težine depresije, trajanja epizode depresije, kao i dužine trajanja ovog oboljenja (Maes i sar., 1997). Međutim, pokazano je da je nivo Zn u serumu značajno niži kod osoba koje boluju od TRD u poređenju sa zdravim dobrovoljcima (Maes i sar., 1997). U skladu sa ovim izveštajem su nalazi studija u kojima je primećena pozitivna korelacija između deficijencije Zn i težine simptoma depresije (Wang i sar., 2018). Maserejian i sar. (2012) su na primer, pokazali korelaciju između deficijencije Zn i simptoma depresije kod žena, ali ne i kod muškaraca. U ispitivanju koje su sprovedeli Maes i sar (1997), primena antidepresiva nije uticala na nivo Zn u serumu. Dodatno, neophodno je pomenuti istraživanje Sowa-Kučma i sar. (2013) u kom je pokazan poremećaj homeostaze Mg i Zn u hipokampusu osoba koje su počinile samoubistvo. Otkriveno je da je koncentracija Mg bila značajno snižena u hipokampusu ovih osoba (Sowa-Kučma i sar., 2013), što je u izvesnoj meri, nakon ekstrapolacije, u skladu sa našim rezultatima koji ukazuju na smanjenje nivoa Mg u prefrontalnom korteksu za 23% nakon ACTH tretmana, iako data vrednost nema statističku značajnost. Sa druge strane, nivo Zn je ostao nepromenjen u hipokampusu osoba koje su izvršile samoubistvo (Sowa-Kučma i sar., 2013), ali i u prefrontalnom korteksu mužjaka pacova nakon dugotrajnog izlaganja ACTH u našoj studiji. Potrebno je istaći i da je interakcija Mg i Zn sa NMDA receptorima u hipokampusu ovih osoba podlegla promenama i da se smanjio inhibitorni uticaj koji Mg i Zn ostvaruju na aktivnost NMDA receptora (Sowa-Kučma i sar., 2013).

Primeru radi, Falchuk i sar. (1977) su pokazali da infuzija ACTH dovodi do značajnog smanjenja nivoa Zn u serumu. Smatra se da ovaj efekat nije posredovan glukokortikoidima, jer je zabeležen i kod pacijenata kojima su uklonjene adrenalne žlezde. Takođe, ovaj efekat se javio kod zdravih dobrovoljaca, kao i kod hospitalizovanih pacijenata u akutnoj fazi bolesti, kojima je dijagnostikovao karcinom, infektivno oboljenje ili reumatoidni artritis (Falchuk i sar., 1977).

Prema našim saznanjima, tokom izrade ove disertacije, po prvi put je ispitivan status bioelemenata – Fe, Cu, Zn i Mg u prefrontalnom korteksu u modelu TRD, kao i nakon Mg suplementacije. Literaturni podaci, ali i naši nalazi govore u prilog tome da potencijalna primena ovih mikronutrijenata kao biomarkera depresivnog poremećaja nije opravdana i da su neophodne dalje studije u cilju identifikacije subpopulacija pacijenata kod kojih suplementacija, kao adjuvantno sredstvo može da ispolji pozitivan efekat na depresivnu simptomatologiju.

5.7. Hronična suplementacija magnezijumom suprimira razvoj intersticijalne fibroze miokarda indukovane adrenokortikotropnim hormonom u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive

Iako je povezanost između hroničnog stresa i patohistoloških promena na srcu davno primećena, biološki mehanizmi i neurohumoralni medijatori, do danas, nisu u potpunosti rasvetljeni. U sklopu eksperimenata ove disertacije, po prvi put su ispitivane morfološke promene koje se javljaju na miokardu nakon tronedelnog ACTH tretmana. ACTH i kortizol, pored cirkulišućeg adrenalina i noradrenalina, čine osnovu neuroendokrinog stres sistema (Lightman, 2008; Herman i sar., 2016). Odavno je poznato da ACTH i kortizol ostvaruju kompleksne uloge u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata, proteina i lipida, prometa energije u organizmu, kao i u regulaciji osmolalnosti i volumena ekstracelularne tečnosti – fiziološkim funkcijama koje bilo neposredno ili posredno utiču na srčanu funkciju. U uslovima hroničnog stresa, neki od efekata koji se pripisuju ACTH i kortizolu su smanjena osetljivost na insulin, abdominalna gojaznost, hipertenzija, aktivacija trombocita, inflamacija, endotelna disfunkcija i poremećaj autonomne regulacije. Svi pomenuti efekti čine neraskidivi deo patogeneze ishemijske bolesti srca (Lundberg i sar., 2016; Popović i sar., 2017; Stimson i sar., 2017).

Po usvojenoj nomenklaturi, u literaturi je receptor za adrenokortikotropni hormon (ACTHR) poznat kao melanokortinski receptor tip 2 (eng. melanocortin 2 receptor, MC2R) (Yang i Harmon, 2017). MC2R je neophodan za ostvarivanje fiziološke funkcije adrenalnih žlezda i odvijanje procesa steroidogeneze i prema dosadašnjim saznanjima ovaj receptor je eksprimiran u adrenalnom korteksu, koži i masnom tkivu (Clark i sar., 2005; Popović i sar., 2014). Interesantno je da se ispituje značaj polimorfizma ACTHR kao potencijalnog prediktora morfoloških i funkcionalnih promena na srcu. U jednoj pilot studiji, kod zdravih ispitanika - sportista i kontrola koji vode sedentarni način života, primećeno je da osobe nosioce polimorfizma ACTHR odlikuje niža srčana frekvencija u mirovanju, kao i veća masa i dijametar leve komore (Popović i sar., 2014). Pored navedenih otkrića vezanih za ACTHR, neophodno je pomenuti da ACTH poseduje sposobnost da se veže, i potom aktivira, sve receptore članove familije melanokortina (MC1R-MC5R) (Yang i Harmon, 2017). Mountjoy i sar. (2003) su detektovali prisustvo iRNK MC4R u miokardu odraslih jedinki pacova, međutim, uloga ovog receptora u srcu do danas nije razjašnjena.

U našoj studiji, u animalnom modelu hiperaktivnosti HPA osovine indukovane primenom adrenokortikotropnog hormona, kod mužjaka Wistar pacova pokazano je prisustvo fenotipskih osobina depresivnog poremećaja i morfoloških promena na miokardu, indikativnih za intersticijalnu fibrozu. Rezultati dobijeni u drugom setu eksperimenata, u okviru izrade ove disertacije, pokazali su izraženi porast proliferacije fibroblasta i znatno povećanje sadržaja endomizijalnog kolagena nakon hronične izloženosti ACTH tretmanu, što reflektuje prisustvo intersticijalne fibroze miokarda kod ovih životinja. Prilikom analize markera proliferacije fibroblasta, imunohistohemijskom detekcijom ćelija koje eksprimiraju nuklearni faktor Ki-67 ili PCNA, primećen je upadljiv porast broja Ki-67 imunopozitivnih fibroblasta u miokardu u ACTH grupi u odnosu na kontrole. Kod ovih životinja, međutim, nije bilo značajnih promena u ekspresiji PCNA nakon ponavljane aplikacije ACTH u poređenju sa kontrolnom grupom. Treba imati u vidu da Ki-67 kao parametar proliferacije koji ima široku primenu u prekliničkom istraživanju, dijagnostici i proceni efikasnosti terapije, pokazuje specifičnost, robusnost i prediktivnu validnost. Sa druge strane, ekspresija PCNA proteina se povećava u ćeliji tokom proliferacije, ali i pri nastanku DNK oštećenja, kada nastupa proces reparacije (Bologna-Molina i sar., 2013). Shodno tome, možemo pretpostaviti da navedene osobine ovih markera dovode do odstupanja u našim rezultatima, kao i da ekspresija Ki-67 verno oslikava proliferativnu aktivnost fibroblasta u miokardu.

Nalazi naše studije su konzistentni sa izveštajima drugih istraživanja u kojima su opisane patološke promene koje se javljaju prilikom izlaganja hroničnom stresu ili visokom nivou cirkulišućih glukokortikoida. Pre više od dve decenije, zabeleženo je da se u uslovima socijalnog stresa, indukovano izlaganjem mužjaka pacova pripadniku iste vrste koji ispoljava agresivno ponašanje, remeti simpatovagalna regulacija srčane funkcije i da dominantnu kontrolu uspostavlja simpatikusni nervni sistem, što se dovodi u vezu sa povećanom incidencom ventrikularnih i supraventrikularnih tahiaritmija (Sgoifo i sar., 1999). Slične autonomne promene su primećene kod određenih akutnih i hroničnih patoloških stanja i smatra se da predstavljaju relevantne prediktore kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (Grippe i sar., 2011). Kasnije je pokazano da averzivni socijalni stimuli, poput navedenog, ostvaruju dugoročne efekte na brojne fiziološke i bihevioralne parametre, uključujući dnevne varijacije srčane frekvencije i telesne temperature, unos hrane, ali i eksploratorno i socijalno ponašanje (Costoli i sar., 2004). Primera radi, nakon dejstva akutnog stresora socijalne prirode, kardiovaskularni efekti ostaju izraženi i posle dve nedelje i neretko se manifestuju kao poremećaj cirkadijalne varijabilnosti srčane frekvencije (Meerlo i sar., 1999). Interesantno je pomenuti istraživanje koje su sprovedi Costoli i sar. (2004), u kom su opisane patološke promene koje se javljaju kod miševa prilikom ponavljanog izlaganja dominantnom mužjaku istog soja. Nakon 15 dana izlaganja eksperimentalnih životinja ovom obliku psihosocijalnog stresa, morfometrijska ispitivanja su ukazala na fokalni gubitak kardiomiocita praćen blagim porastom intersticijalne fibroze miokarda leve komore, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije. Jedna od pretpostavki je da ovaj oblik remodelovanja leve komore nastaje usled ponavljanog izlaganja visokom nivou cirkulišućih kateholamina (Costoli i sar., 2004). Usledila su ispitivanja u kojima je praćen uticaj socijalne izolacije na bihevioralne i kardiovaskularne parametre eksperimentalnih životinja. Otkriveno je da kod prerijskih voluharica, glodara koje odlikuje karakteristično monogamno ponašanje, socijalna izolacija u trajanju od 4 nedelje dovodi do razvoja simptoma depresije, poput anhedonije, uzrokuje porast broja srčanih otkucaja u minuti i pritom redukuje varijabilnost srčane frekvencije (Grippe i sar., 2011).

U daljim istraživanjima, u kojima je ispitivan uticaj hormona stresa na miokard, Otori i sar. (2014) su primetili da u modelu srčane insuficijencije, zasnovanom na visokom unosu soli putem hrane, kod osetljivog soja glodara, kortikosteron stimuliše sintezu kolagena u fibroblastima miokarda. Zapaženo je da u uslovima porasta oksidativnog stresa opisani efekat glukokortikoida nastupa zahvaljujući aktivaciji mineralokortikoidnih receptora u srcu, kao i da su date promene indikativne za fibrozu miokarda (Otori i sar., 2014). U skladu sa prikazanim rezultatima su i nalazi studije Xinxing i sar. (2014), u kojoj je izvršena analiza morfoloških promena koja nastaju u srcu, u modelu depresivnog ponašanja indukovano primenom hroničnog blagog stresa kod mužjaka Wistar pacova. Primećeno je da se nakon izlaganja različitim oblicima stresa, tokom 8 nedelja, kod životinja razvijaju karakteristike depresivnog fenotipa, poput anhedonije, praćene patološkim promenama na miokardu. Primenom elektronske mikroskopije, uočena je ruptura miofibrila i unutrašnje membrane mitohondrija, kao i marginacija nuklearnog hromatina. Takođe, zabeleženo je značajno povećanje nivoa apoptoze kardiomiocita u ovoj eksperimentalnoj grupi u poređenju sa kontrolama (Xinxing i sar., 2014). Kasnije, u ispitivanju koje je imalo za cilj praćenje sinergističkih efekata psihosocijalnog stresa i gojaznosti kod mužjaka C57BL/6 J miševa, pokazan je izraženi porast količine kolagena u intersticijumu miokarda, praćen indukcijom apoptoze kardiomiocita i oksidativnog stresa u levoj komori (Agrimi i sar., 2019). Pored prisustva intersticijalne fibroze, zapaženo je i remodelovanje velikih koronarnih arteriola kod ovih životinja. Mehanicistička analiza upućuje na redukovani nivo BDNF i njegovog TrkB receptora u srcu, što za posledicu ima poremećaj BDNF signalizacije (Agrimi i sar., 2019). U miokardu, konstitutivna BDNF-TrkB signalizacija ostvaruje jednu od istaknutih uloga tokom rasta i razvoja, učestvuje u koordinaciji kontrakcije i relaksacije u adultnom dobu i ispoljava protektivno dejstvo u prisustvu određenih proapoptotskih faktora (Donovan i sar., 2000; Feng i sar., 2015; Kermani i Hempstead, 2019).

Agrimi i sar. (2019) su u pomenutoj studiji takođe otkrili da psihosocijalni stres i gojaznost uzrokuju slabljenje srčane funkcije i primetno smanjenje ejakcione frakcije.

Fibroblasti su široko zastupljene ćelije vezivnog tkiva, mezenhimalnog porekla, koje stvaraju kolagen (kolagen tip I, III i VI) i ekspimiraju brojne faktore rasta i citokine. U srcu čine jednu od najbrojnijih populacija ćelija. Ostvaruju odlučujući doprinos u očuvanju strukturnih, biohemijskih, mehaničkih i električnih osobina miokarda (Camelliti i sar., 2005; Souders i sar., 2009). U fiziološkim uslovima, u srcu odrasle jedinke, nagomilavanje kolagena u ekstracelularnom matriksu je neznatno, međutim, izraženi porast se javlja kod određenih oboljenja, poput hipertrofije miokarda, srčane insuficijencije i nakon infarkta miokarda. Vlakna kolagena, glavnog strukturnog proteina intersticijuma, ispoljavaju nekoliko uloga: obezbeđuju potporu srčanim mišićnim ćelijama i krvnim sudovima, koordinišu prenos snage tokom kontrakcije, koju generišu kardiomiociti, opiru se deformaciji miokarda, učestvuju u očuvanju oblika i sprečavaju nastanak aneurizme i rupture ventrikula (Weber, 1989). Pojedini autori smatraju da se porast proliferativne aktivnosti fibroznog tkiva, može klasifikovati u dve kategorije: reparativnu fibrozu, koja se javlja u različitim, udaljenim zonama miokarda i reaktivnu fibrozu, koja se inicijalno odvija u blizini kapilara, a potom zahvata i druge delove miokarda (Weber, 1989). Istraživanja nedvosmisleno pokazuju da porast stepena proliferacije fibroblasta, kao i količine proteina ekstracelularnog matriksa u srcu, parametara indikativnih za prisustvo fibroze, značajno povećava rigiditet miokarda – jednu od glavnih patofizioloških osobina srčane disfunkcije (Camelliti i sar., 2005).

Eksperimentalna i epidemiološka istraživanja dovode u vezu hipertenziju i ishemijsku bolest srca i nizak unos magnezijuma putem ishrane (Finckenberg i sar., 2005). Međutim, nalazi randomizovanih kliničkih studija nisu konzistentni i ne postoje jasni dokazi o terapijskoj koristi suplementacije magnezijumom u cilju prevencije kardiovaskularnih oboljenja.

Izveštaji upućuju da incidenca hipomagnezemije u opštoj populaciji varira u opsegu od 2,5 do 15%, dok kod hospitalizovanih pacijenata u jedinicama intenzivne nege doseže 65% (Ayuk i Gittoes, 2014). Kada su u pitanju kardiovaskularne manifestacije hipomagnezemije, pokazano je da je deficit intracelularnog Mg praćen padom koncentracije intracelularnog K, što za posledicu ima poremećaj membranskog potencijala kardiomiocita u mirovanju, kao i faze repolarizacije. Na elektrokardiogramu kod ovih pacijenata mogu se uočiti zaravnjeni T talas, produženi QT interval i proširen QRS kompleks. Hipomagnezemija se dovodi u vezu sa atrijskim i ventrikularnim aritmijama, iako patološki mehanizmi do danas nisu u potpunosti objašnjeni i nije poznato da li se aritmije javljaju i kod osoba bez kardijalnog oboljenja (Ayuk i Gittoes, 2014; Kolte i sar., 2014).

Interesantno je pomenuti da su Touyz i sar. (2002) pokazali da hronična deficijencija magnezijuma dovodi do pogoršanja hipertenzije, uzrokuje endotelnu disfunkciju i vaskularno remodelovanje kod spontano hipertenzivnih pacova genetski podložnih moždanom udaru. Pretpostavka je da patološki supstrat u osnovi opisanih promena uključuje oksidativni stres i ushodnu regulaciju redoks-senzitivnih mitogenom aktiviranih protein (eng. mitogen-activated protein, MAP) kinaza (Touyz i sar., 2002). Takođe, u jednoj studiji je zabeleženo da se niska koncentracija Mg u ekstracelularnoj tečnosti dovodi u vezu sa lipidnom peroksidacijom i aktivacijom transkripcionog faktora NF- κ B u glatkim mišićnim ćelijama vaskularnih zidova cerebralne cirkulacije (Altura i sar., 2003).

U primenjenom modelu depresivnog ponašanja, rezistentnog na terapiju tricikličnim antidepressivima, pokazali smo po prvi put efikasnost suplementacije magnezijumom u prevenciji razvoja intersticijalne fibroze miokarda indukovane ACTH tretmanom kod mužjaka Wistar pacova. Hronična peroralna primena magnezijuma je kod eksperimentalnih životinja ispoljila efekat na

fibroproliferativne promene u srcu, koji se ogleda u činjenici da je Mg inhibirao proliferaciju fibroblasta i deponovanje endomizijalnog kolagena u miokardu. Molekularni mehanizmi u osnovi patofizioloških efekata ACTH i kardiprotektivnog dejstva Mg su kompleksni, nisu u potpunosti rasvetljeni i biće predmet budućih istraživanja. Međutim, u skladu sa ranije navedenom hipotezom, možemo pretpostaviti da kardiprotektivni efekat Mg bar delom nastaje zahvaljujući modulaciji aktivnosti NMDA receptora u hipotalamusu, supresiji hiperaktivnosti HPA osovine i normalizaciji nivoa cirkulišućeg kortikosterona.

Rezultati naše studije su konzistentni sa nalazima ispitivanja u kojima je, primenom različitih eksperimentalnih modela, pokazano da deficijencija Mg može dovesti do razvoja kardiomiopatije koju odlikuje prisustvo fokalne nekroze i fibroze miokarda (Bloom, 1988; Kumar i sar., 1997; Kumar i Shivakumar, 1997; Kumaran i Shivakumar, 2001). Primećeno je da se kao rezultat deficijencije magnezijuma u organizmu javlja porast sinteze i deponovanja kolagana u miokardu eksperimentalnih životinja, kao jedan od parametara reparativne fibroze. Postoje indicije koje upućuju da porast nivoa oksidativnog stresa doprinosi razvoju opisanih fibroproliferativnih promena u srcu. U prilog tome govori činjenica da je u miokardu ovih životinja zabeležen visok nivo lipidne peroksidacije, smanjena koncentracija redukovanog glutationa i snižena aktivnost superoksid dismutaze i katalaze (Kumar i sar., 1997; Kumar i Shivakumar, 1997). Dodatno, u modelu deficijencije magnezijuma, kod eksperimentalnih životinja je zapažen porast nivoa cirkulišućih proinflatornih citokina, poput TNF- α (Kumar i Shivakumar, 1997). Kada je reč o korelaciji između fibroproliferativnih promena u miokardu i nivou proinflatornih citokina, interesantno je da je u našoj studiji, u modelu depresivnog ponašanja, Mg suplementacija suprimirala razvoj intersticijalne fibroze miokarda i istovremeno indukovala smanjenje koncentracije cirkulišućeg IL-6. Naši nalazi su takođe u skladu sa rezultatima ispitivanja koje su sprovedli Finckenberg i sar. (2005) koristeći transgene pacove, nosioce humanih gena za renin i angiotenzinogen. U ovoj studiji, tronedeljna suplementacija magnezijumom je redukovala krvni pritisak, suprimirala nastanak oštećenja miokarda indukovano angiotenzinom II i ublažila hipertrofiju miokarda kod životinja. Arterije miokarda je kod transgenih životinja karakterisalo prisustvo perivaskularne inflamacije, fibroze i u izvesnim slučajevima fibrinoidne nekroze zida krvnih sudova, dok je primena magnezijuma delom suprimirala nastanak ovih patoloških promena (Finckenberg i sar., 2005). Naime, suplementacija magnezijumom je inhibirala primetan porast ekspresije faktora rasta vezivnog tkiva (eng. connective tissue growth factor, CTGF) u srcu. CTGF je profibrogeni medijator i promotor deponovanja kolagena i pokazano je da se njegova ekspresija prekomerno povećava kod različitih patologija, poput ateroskleroze, infarkta miokarda i renalne fibroze (Finckenberg i sar., 2005). Prilikom interpretacije naših nalaza, neophodno je pomenuti i rezultate istraživanja u kojima je ispitivan potencijalni protektivni efekat Mg na razvoj kardiomiopatije indukovane primenom antiretrovirusnih lekova (Mak i sar., 2009; 2013). Nakon pet nedelja suplementacije (0,6% MgO/kg hrane), magnezijum je ispoljio supresivno dejstvo na razvoj fibroze miokarda indukovane primenom inhibitora proteaze- ritonavira kod mužjaka pacova (Mak i sar., 2013). Primećeno je da kod životinja izloženih tretmanu ritonavinom, Mg smanjuje deponovanje kolagena i stepen infiltracije leukocita u srčanom tkivu. Dodatno, Mg suplementacija je ublažila sistolnu i dijastolnu disfunkciju miokarda i inhibirala nastanak hiperlipidemije, patoloških promena indukovanih primenom ritonavira kod pacova (Mak i sar., 2013). U drugoj studiji, u kojoj su praćeni kardiovaskularni efekti hronične aplikacije zidovudina, nukleozidnog inhibitora reverzne transkriptaze, pokazano je da tretman magnezijumom (0,6% MgO/kg hrane) inhibira endogenu aktivaciju cirkulišućih polimorfonukleara, smanjuje stvaranje superoksidnog anjona i stepen infiltracije miokarda leukocitima (Mak i sar., 2009).

Fibroza miokarda predstavlja jedan od glavnih patoloških procesa koji neminovno dovode do progresivnog slabljenja sistolne i dijastolne funkcije komora. U svetu trenutno postoji mali broj

terapijskih opcija sa ograničenom efikasnošću, usmerenih ka prevenciji i/ili lečenju fibroze. Smatra se da je prekomerni porast koncentracije Ca u kardiomiocitima jedan od glavnih patoloških supstrata u osnovi oštećenja miokarda. Supresija aktivnosti HPA osovine, indukovana primenom magnezijuma kod eksperimentalnih životinja, za posledicu ima smanjenu signalizaciju posredstvom glukokortikoidnih i mineralokortikoidnih receptora u srcu, ostvarujući kardioprotektivni efekat. Pored toga, na osnovu literaturnih podataka i brojnih studija u kojima su opisani molekularni mehanizmi preko kojih Mg deluje kao antagonist Ca, možemo pretpostaviti da kardioprotektivnom efektu Mg i prevenciji razvoja i progresije fibroze, doprinosi i inhibicija influksa Ca i održavanje odgovarajućeg nivoa Ca u kardiomiocitima (Ferrari i sar., 1986; DiNicolantonio i sar., 2018; Liu i sar., 2019). Naime, ova ideja je u skladu sa zapažanjima koja su izneli Ferrari i sar. (1986), da Mg perfuzija, neposredno nakon ishemije miokarda kod zečeva, sprečava prekomerno povećanje koncentracije Ca u mitohondrijama i omogućava nesmetano stvaranje energije u ćeliji. U našem eksperimentalnom modelu nije određivana koncentracija Mg, kao ni Ca, Na i K u kardiomiocitima. Međutim, na osnovu izveštaja ranijih studija, može se postaviti hipoteza da je u našem modelu hiperaktivnosti HPA osovine, praćene razvojem depresivnog fenotipa, Mg tretman uzrokovao smanjenje intracelularnog nivoa Ca i Na u kardiomiocitima, štiteći istovremeno ćelije od gubitka K. Homeostaza Mg je od presudnog značaja za aktivnost Na⁺/K⁺-ATPaze i održavanje potencijala membrane. Takođe, Mg kao fiziološki antagonist Ca, ostvaruje svoj protektivni efekat na srce, zahvaljujući blokadi voltažno zavisnih Ca kanala L-tipa, inhibiciji Na⁺/Ca²⁺ pumpe, supresiji oslobađanja Ca iz sarkoplazmatskog retikuluma i inhibiciji vezivanja Ca za troponin C (Matsusaka i sar., 2002). Buduća istraživanja fokusirana ka otkriću novih, adjuvantnih terapija, uključujući i ispitivanje efikasnosti primene Mg suplementacije, bi za cilj imala smanjenje rizika od razvoja srčane insuficijencije i povećanje stope preživljavanja pacijenata sa kardiovaskularnim oboljenjima.

5.8. Hronična primena magnezijuma inhibira vaskularno remodelovanje u malim krvnim sudovima srca indukovano adrenokortikotropnim hormonom kod mužjaka pacova

Pre više od pola veka, prvi put je zapaženo, kasnije i potvrđeno, da se tokom eksperimentalne, kao i terapijske primene ACTH javlja hemodinamski stres i da se kao jedan od kardiovaskularnih neželjenih efekata neretko razvija hipertenzija (Wen i sar., 1998; Whitworth i sar., 2001; Lorenz i sar., 2008). Prema literaturnim podacima, kortizol indukuje porast krvnog pritiska i smatra se odgovornim za većinu metaboličkih efekata ACTH. U prilog tome govori i činjenica da visok nivo glukokortikoida korelira sa razvojem hipertenzije kod osoba koje pate od Kušingovog sindroma (Whitworth i sar., 2001). Sa druge strane, klinički i eksperimentalni nalazi ukazuju da magnezijum ima ulogu u očuvanju integriteta i funkcije endotelnih ćelija. Naime, magnezijum ispoljava vazodilatatorno dejstvo, smanjuje vaskularni otpor i pospešuje protok krvi u sistemske, prevashodno koronarnoj, cerebralnoj i renalnoj cirkulaciji. Smatra se da i ekstracelularni i intracelularni slobodni joni magnezijuma modulišu tonus vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (Kolte i sar., 2014). Shodno tome, u našem istraživanju su praćeni efekti hronične primene ACTH i Mg suplementacije na proliferativnu aktivnost endotelnih ćelija mikrocirkulacije u srcu, kao i uticaj navedenih tretmana na ekspresiju antiapoptotskog proteina Bcl-2 u endotelu, kod mužjaka Wistar pacova. Pokazano je da ACTH indukuje proliferaciju vaskularnih endotelnih ćelija u srcu i stimuliše ekspresiju Bcl-2 u ovim ćelijama, dok magnezijum suprimira opisane efekte kod eksperimentalnih životinja.

Interesantno je da se endotelna disfunkcija u literaturi pominje kao jedan od patoloških supstrata koji povezuju stres i kardiovaskularna oboljenja (Steptoe i Kivimäki, 2013). Endotelne ćelije imaju jednu od ključnih uloga u regulaciji vaskularnog tonusa i protoka krvi, ali i u kontroli

permeabilnosti krvnih sudova i supresiji mehanizama uključenih u trombogenezu. Decenijama unazad je prihvaćeno da endotelna disfunkcija predstavlja jedan od centralnih događaja u patogenezi ateroskleroze, tromboze, hipertenzije i dijabetesa (Kolte i sar., 2014). U relativno novijim istraživanjima je pokazano da izloženost psihosocijalnom stresu može dovesti do razvoja endotelne disfunkcije. Naime, prilikom odgovora organizma na stres javlja se aktivacija adaptivnih mehanizama – neuroendokrine HPA ose i simpatikusnog nervnog sistema (Côco i de Oliveira, 2015). Poremećaj funkcije HPA ose, prevashodno hiperaktivnost HPA sistema, dovodi se u vezu sa kardiovaskularnim oboljenjima na ranije opisan način. Pored toga, aktivacija simpatikusa uzrokuje porast vaskularnog otpora, povećanje potrošnje kiseonika u miokardu, aktivaciju trombocita, kao i sistema renin-angiotenzin-aldosteron. U uslovima hronične prekomerne aktivnosti ovog dela vegetativnog nervnog sistema, opisane patološke promene u velikoj meri doprinose endotelnoj disfunkciji, što za ishod ima razvoj kardiovaskularnog oboljenja (Inoue, 2014; Côco i de Oliveira, 2015).

U animalnim modelima, tokom ispitivanja uticaja stresa na vaskularnu funkciju, uočeno je da se nakon izlaganja stresu, menja vaskularna reaktivnost na angiotenzin II kod glodara. Dodatno, u modelu depresivnog ponašanja, indukovanoj socijalnom izolacijom, zabeležena je smanjena osetljivost izolovanih arterija na endotel-zavisni vazodilatatorni efekat acetilholina (Peuler i sar., 2012). Takođe, kod pacijenata koji boluju od stabilne angine pektorisa, primećeno je da prisustvo i težina simptoma depresije značajno koreliraju sa endotelnom disfunkcijom (Chen i sar., 2013; Côco i de Oliveira, 2015). Pretpostavlja se da stres uzrokuje endotelnu disfunkciju zahvaljujući kompleksnom mehanizmu koji uključuje različite molekulske medijatore: glukokortikoide, kateholamine, angiotenzin II i proinflamatorne citokine (Côco i de Oliveira, 2015).

Literaturni podaci ukazuju da hipertenziju indukovanu dugotrajnom primenom ACTH, odlikuju porast renalnog vaskularnog otpora i disfunkcija NO sistema (Whitworth i sar., 2001). U našoj studiji, u cilju dalje karakterizacije efekata ACTH na hemodinamski profil, kao jednog od glavnih molekularnih efekatora neuroendokrinog HPA stres sistema, praćen je uticaj na vaskularni endotel miokarda, ispitivanjem promena u ekspresiji Bcl-2 i Ki-67 kod mužjaka Wistar pacova. Rezultati su pokazali značajno povećanje broja endotelnih ćelija koje ekspimiraju Bcl-2 u malim krvnim sudovima srca i izraženi porast proliferativne aktivnosti endotelnih ćelija.

Otkriće Bcl-2 se vezuje za 1988. godinu i B-ćelijski limfom, po kom je i dobio naziv (Reed, 2008). Bcl-2 je jedan od glavnih regulatora apoptoze, član familije antiapoptotskih proteina, molekula poznatih po svojoj ulozi u očuvanju integriteta spoljašnje membrane mitohondrija (Wang i sar., 2017). U *in vitro* ispitivanjima je dokazano da Bcl-2 inhibira apoptozu indukovanu zračenjem, hipertermijom i različitim klasama hemoterapeutika. Primećeno je da je inhibicioni efekat proporcionalan nivou ekspresije Bcl-2 (Chen i sar., 2002; Wang i sar., 2017). Takođe, u terminalnoj fazi srčane insuficijencije, ali i kod osoba koje pate od dilatativne kardiomiopatije, uočen je primetan porast ekspresije Bcl-2 u apeksu srca, levoj i desnoj komori (Latif i sar., 2000; Wang i sar., 2017). U našoj studiji porast ekspresije Bcl-2 u endotelnim ćelijama mikrovaskulature srca upućuje na povišen hemodinamski stres kom su izloženi krvni sudovi eksperimentalnih životinja tokom ACTH tretmana. Takođe, možemo pretpostaviti da istovremeni porast ekspresije Bcl-2 i Ki-67 u ovim ćelijama ukazuju na oštećenje miokarda, kao i kompenzatorni mehanizam koji se razvija i uključuje proces angiogeneze. Interesantno je da modulacija ekspresije Bcl-2 ostvaruje jednu od ključnih uloga u procesu angiogeneze. Bcl-2 deluje kao pro-angiogeni faktor, indukcijom ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta (eng. vascular endothelial growth factor, VEGF) i hipoksijom-indukovanog faktora 1 (eng. hypoxia-inducible factor 1, HIF-1), nezavisno od njegove uloge u inhibiciji apoptoze (Zaitoun i sar., 2015). Anti-angiogeni faktori suprimiraju proces angiogeneze nishodnom regulacijom ekspresije Bcl-2. U istraživanjima je dokazano da članovi

familije Bcl-2 proteinskih regulatora apoptoze imaju tkivno specifičnu ulogu u razvoju i remodelovanju vaskularnog endotela, kao i neovaskularizaciji u različitim organima, uključujući bubrege, pluća i retinu (Wang i sar., 2005; Grutzmacher i sar., 2010; Zaitoun i sar., 2015).

Proliferacija vaskularnih endotelnih ćelija mikrocirkulacije u srcu se može posmatrati u svetlu potencijalne neovaskularizacije- fenomena koji se vezuje za oštećenje miokarda i predstavlja jedan od ključnih događaja u procesu reparacije (Ubil i sar., 2014). Smatra se da bliska interakcija koju ostvaruju fibroblasti i endotelne ćelije ima regulatorno dejstvo tokom zarastanja i stvaranja ožiljnog tkiva, nakon oštećenja miokarda. U ranijim istraživanjima je otkriveno da nakon infarkta miokarda, tokom remodelovanja tkiva, fibroblasti proliferišu i ekspimiraju proangiogene faktore, uključujući VEGF i faktor rasta fibroblasta (eng. fibroblast growth factor, FGF), i na taj način stimulišu proliferaciju vaskularnih endotelnih ćelija (Chintalgattu i sar., 2003; Souders i sar., 2009; Ubil i sar., 2014). U srcu, angiogeneza se najčešće vezuje za reparaciju i formiranje ožiljnog tkiva, koji nastupaju nakon infarkta miokarda. Angiogeni odgovor otpočinje u graničnim zonama infarktne područja i potom se širi ka nekrotičnom području (Wu i sar., 2021). Odgovarajuća koordinacija angiogenog odgovora se dovodi u vezu sa povoljnim ishodom u animalnim modelima akutnog infarkta miokarda i u prilog tome govore manji ožiljci, smanjen stepen remodelovanja i do izvesne mere očuvana kontraktilnost srčanog mišića (Rafii i sar., 2016). Do danas, nije u potpunosti razjašnjeno na koji način, nakon oštećenja miokarda, angiogeneza pospešuje reparaciju tkiva. Formiranje guste kapilarne mreže, koje nastupa neposredno nakon infarkta miokarda obezbeđuje put za inflamatorne ćelije, olakšava razmenu gasova, difuziju nutrijenata, kao i uklanjanje štetnih produkata, što zadovoljava visoke metaboličke potrebe na mestu inflamacije i poboljšava preživljavanje kardiomiocita (Farbehi i sar., 2019; Wu i sar., 2021). Poznato je da je hipoksija snažan angiogeni stimulus tokom perioda razvoja, ali i u različitim patološkim stanjima (Fraisl i sar., 2009; Wu i sar., 2021). Primećeno je da nakon infarkta miokarda, hipoksični uslovi kod miševa stimulišu proliferaciju endotelnih ćelija i neovaskularizaciju u infarktne području (Nakada i sar., 2017). U našoj studiji, u modelu depresivnog ponašanja, po prvi put je ispitivan uticaj ACTH na remodelovanje vaskularnog endotela u srcu. Proces angiogeneze treba da ostvari protektivni efekat, ali u našem istraživanju takođe ukazuje na patološke promene i oštećenje miokarda, uzrokovanih aplikacijom ACTH. Priroda kompleksnih interakcija između fibroblasta i endotelnih ćelija u srcu, kao i kliničke implikacije opisanog fenomena angiogeneze prilikom izlaganja jednom od glavnih hormona stresa, zahtevaju dalja istraživanja.

Odavno je poznato da sistemska primena magnezijuma kod sisara indukuje dozno-zavisno smanjenje arterijskog krvnog pritiska (Yang i sar., 2000). Hemodinamski efekti nastaju kao posledica relaksacije vaskularnih glatkih mišića, uzrokovane direktnim i indirektnim dejstvom jona Mg. Naime, pokazano je da Mg ispoljava vazodilatatorna svojstva i da smanjuje vaskularni tonus inhibicijom influksa jona Ca u citoplazmu, kao i stimulacijom transporta jona Ca u intracelularne depoe posredstvom kalcijumove pumpe (Saris i sar., 2000; Touyz, 2003; Finckenberg i sar., 2005). U ranijim istraživanjima je takođe primećeno da Mg pospešuje stvaranje endotel-zavisnih vazodilatatornih molekula, poput prostaciklina (Watson i sar., 1986) i NO (Yang i sar., 2000). Kada je u pitanju modulacija aktivnosti endogenih vazodilatatora, pre više od tri decenije je otkriveno da relaksacija vaskularnih glatkih mišića indukovana acetilholinom pokazuje primetnu zavisnost od ekstracelularne koncentracije Mg. Porast koncentracije Mg u ekstracelularnoj tečnosti iznad fiziološkog nivoa inhibira spontanu mehaničku aktivnost i smanjuje bazalni tonus krvnih sudova, dok pad koncentracije Mg ispod 0,6 mM za rezultat suprotne efekte - dovodi do povećanja tonusa i kontraktilnosti vaskularnih mišićnih ćelija (Yang i sar., 2000). Možemo pretpostaviti da opisani mehanizmi, doprinose protektivnom dejstvu magnezijuma na mikrovaskulaturu srca, suprotstavljajući se negativnim hemodinamskim efektima i vaskularnom remodelovanju, promena uzrokovanih primenom ACTH kod mužjaka pacova.

Nedavno je sprovedena meta-analiza randomizovanih, kontrolisanih studija u kojima su ispitivani efekti oralne suplementacije magnezijumom na vaskularnu funkciju (Marques i sar., 2020). Meta-analiza je obuhvatila pet randomizovanih, kontrolisanih studija i ukupno 202 učesnika. Dobijeni rezultati su pokazali da je primena magnezijuma dovela do značajnog poboljšanja vaskularne funkcije samo kada je Mg suplementacija trajala najmanje 6 meseci i u studijama koje su obuhvatile subpopulacije pacijenata koji boluju od hipertenzije, ishemijske bolesti srca i/ili bubrežne isnutificijencije, osobe sa BMI ≥ 25 kg/m² (indeks telesne mase; eng. Body Mass Index) ili osobe starije od 50 godina. Nalazi meta-analize upućuju da u drugim populacijama Mg suplementacija nije ostvarila značajan efekat na endotelnu funkciju i elastičnost arterija (Marques i sar., 2020).

Interesantno je da su *in vitro* istraživanja pokazala da veoma niske koncentracije ekstracelularnog Mg inhibiraju proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija, dok izraženi porast koncentracije Mg (>0,8 mM) u kulturi deluje stimulatorno (Banai i sar., 1990). Međutim, neophodno je imati na umu kompleksne interakcije između Mg i aktivnosti neuroendokrinog HPA sistema koje postoje u živom organizmu, prisustvo brojnih pro-angiogenih i anti-angiogenih faktora, kao i prirodu odnosa između fibroblasta i vaskularnih endotelnih ćelija u srcu i fiziološke posledice porasta njihove proliferativne aktivnosti. Dobijeni rezultati i literaturni podaci ukazuju da je potrebno sprovesti dalja randomizovana, kontrolisana ispitivanja u cilju identifikacije subpopulacija pacijenata, uključujući i studije koje obuhvataju osobe koje boluju od depresije, u svrhu određivanja potencijalnog povoljnog učinka ovog bioelementa na hemodinamski profil pacijenta.

5.9. Efekti hronične primene magnezijuma i adrenokortikotropnog hormona na proliferativnu aktivnost i dijametar kardiomiocita u modelu depresivnog ponašanja

Nakon postavljanja dijagnoze srčane slabosti, polovina pacijenata umire u periodu od 5 godina, dok oko 40% bolesnika umre u prvoj godini (Azevedo i sar., 2016). Patološke promene koje se javljaju nakon oštećenja miokarda, najčešće nakon infarkta, obuhvataju progresivni gubitak kardiomiocita usled apoptoze i nekroze, porast proliferativne aktivnosti fibroblasta i povećano deponovanje kolagena u srcu, promene u transportu i intracelularnoj koncentraciji Ca i porast oksidativnog stresa. Opisane promene uzrokuju promene u arhitekturi srca i smanjenje kontraktilnosti miokarda i neminovno dovode do razvoja srčane insuficijencije. U velikom broju eksperimentalnih istraživanja na životinjama i kliničkih ispitivanja dokazano je da stres ima ulogu u razvoju i progresiji bolesti srca i krvnih sudova, i to prevashodno kod osoba koje su u detinjstvu bile izložene psihičkom i/ili fizičkom zlostavljanju, kao i kod pacijenata kod kojih su prisutni drugi, nezavisni kardiovaskularni faktori rizika (Azevedo i sar., 2016; Kivimäki i Steptoe, 2018; Iob i Steptoe, 2019). Uprkos tome, u našoj studiji je po prvi put ispitivan uticaj dugotrajnog tretmana adrenokortikotropnim hormonom, jednim od glavnih medijatora stresa, na morfologiju srca kod mužjaka Wistar pacova. Pored opisanog porasta proliferacije fibroblasta, povećanog deponovanja endomizijalnog kolagena i vaskularnog remodelovanja, uočen je porast proliferativne aktivnosti kardiomiocita nakon izlaganja eksperimentalnih životinja hroničnoj aplikaciji ACTH. Prilikom ispitivanja kardioprotektivnih efekata Mg u implementiranom modelu depresivnog ponašanja indukovano ACTH tretmanom, pokazano je da Mg suplementacija dovodi do izraženog porasta proliferacije kardiomiocita. Pored toga, zapaženo je da kod eksperimentalnih životinja i ACTH i Mg uzrokuju smanjenje dijametara kardiomiocita.

Jedno od najvažnijih pitanja u medicini je kako povećati regenerativnu sposobnost srčanog mišića nakon oštećenja tkiva, prevashodno nakon infarkta miokarda. Nakon akutnog infarkta miokarda, veliki broj kardiomiocita umire usled neadekvatne perfuzije. Miokard odlikuje veoma ograničen regenerativni kapacitet, što vodi ka razvoju fibroze - zamene mišićnog tkiva ožiljnim tkivom i nepovratnog slabljenja funkcije srčanog mišića (He i Zhou, 2017). Decenijama je bila prihvaćena hipoteza da je odraslo srce postmitotski organ i da kardiomiociti kao terminalno diferencirane ćelije nemaju sposobnost proliferacije. Međutim, jednu od potencijalnih prekretnica u kardiovaskularnoj fiziologiji predstavlja istraživanje koje su sprovedi Kajstura i sar. (1998), koje je obuhvatilo pacijente u terminalnoj fazi srčane insuficijencije, i otkriće da se u odraslom humanom srcu može javiti proliferacija kardiomiocita. Beltrami i sar. (2001) su potom objavili svoje nalaze, potvrđujući ovo revolucionarno otkriće, i navodeći da u humanom miokardu odraslih osoba, u infarktnom području 4% srčanih mišićnih ćelija eksprimira molekul Ki-67 u svom jedru, dok u udaljenoj zoni ovaj protein eksprimira 1% kardiomiocita. Opisani rezultati nedvosmisleno ukazuju na mitotsku deobu kardiomiocita u odraslom humanom srcu. Bergmann i sar. (2009) su kasnije implementirali model, zasnovan na integraciji ^{14}C u DNK materijal, predviđajući da se kod osoba starosti 20 godina na godišnjem nivou obnavlja 1% kardiomiocita, dok kod osoba starih 75 godina taj procenat iznosi svega 0,3%. Neminovno, prirodni regenerativni kapacitet humanog miokarda u adultnom dobu je veoma mali, nedovoljan da spreči progresivni gubitak funkcije nakon oštećenja srčanog mišićnog tkiva i stoga nema klinički značaj. Međutim, dalja ispitivanja potencijalnih terapija usmerenih ka stimulaciji endogenih regenerativnih procesa u srcu, i pored za sada neizvesnih kliničkih implikacija, pružaju nadu za povećanje preživljavanja i poboljšanje kvaliteta života kardiovaskularnih pacijenata, pre svega osoba sa dijagnozom srčane insuficijencije.

Danas postoje dve paradigme koje objašnjavaju poreklo novonastalih kardiomiocita u odraslom srcu: jedna koja glasi da vode poreklo od kardijačnih stem ćelija, koje se aktiviraju posle oštećenja tkiva, i druga, prema kojoj se formiraju zahvaljujući reaktivaciji i deobi postojećih kardiomiocita (He i Zhou, 2017; Hashmi i Ahmad, 2019). Takođe, nameće se pitanje kako obezbediti električnu i mehaničku sinhronizaciju aktivnosti novoformiranih kardiomiocita sa okolnim strukturama, pre svega mišićnim i nodalnim ćelijama u srcu?

Tokom poslednje dve decenije, studije na životinjama potvrđuju hipotezu i pružaju nove dokaze o proliferaciji kardiomiocita u srcu odraslih jedinki sisara, nakon infarkta miokarda. Tumačenje nalaza i izvođenje nedvosmislenog zaključka značajno otežava činjenica da se nivo ekspresije markera proliferacije i procenat novonastalih kardiomiocita, u velikoj meri razlikuju između laboratorija i da na njih primetno utiče starost životinje, metoda praćenja ulaska u ćelijski ciklus, anatomska lokalizacija ćelija i vreme koje protekne od oštećenja miokarda do analize (Soonpaa i sar., 2013). Interesantno je na primer, da su Soonpaa i Field (1997) u ispitivanju na odraslim miševima, prilikom praćenja sinteze DNK korišćenjem obeleženog timidina, zabeležili da se na godišnjem nivou obnavlja 1,095% kardiomiocita, što je približno vrednostima dobijenim na humanim uzorcima. Senyo i sar. (2013) su pokazali da u srcu mladih, odraslih jedinki miševa u normalnim, homeostatskim uslovima, deobom mišićnih ćelija nastaje oko 0,76% novih kardiomiocita godišnje. Takođe, u pomenutoj studiji je primećeno da se ovaj procenat smanjuje starenjem, dok se nakon infarkta miokarda, u graničnoj zoni, ova vrednost četverostruko povećava (Senyo i sar., 2013).

U našem istraživanju je prvi put pokazano da i ACTH i Mg ostvaruju stimulatorni efekat na proliferaciju kardiomiocita kod odraslih mužjaka pacova Wistar soja. Naime, imunohistohemijskom metodom detekcije je otkriveno da dugotrajna primena ACTH, ali i Mg suplementacija kod zdravih životinja, kao i u modelu depresivnog ponašanja, indukuju primetan porast nivoa ekspresije Ki-67 u srčanim mišićnim ćelijama. Molekul Ki-67 je od centralnog značaja za ćelijsku proliferaciju i

ekspimiran je u proliferišućim ćelijama tokom aktivnog ćelijskog ciklusa, ali ne i tokom G0 faze mirovanja (Li i sar., 2013). Međutim, neophodno je imati na umu da pojedini kardiomiociti nakon reaktivacije i ulaska u ćelijski ciklus, ekspimiraju Ki-67, ali ne podležu ćelijskoj deobi, već endoreplikaciji. Proces endoreplikacije za rezultat ima poliploidizaciju i hipertrofiju srčane mišićne ćelije (Meckert i sar., 2005; Li i sar., 2013).

Poliploidizacija je proces koji podrazumeva formiranje jednog ili više dodatnih, kompletnih setova hromozoma. Primećeno je da se kod sisara poliploidizacija javlja u određenim tipovima ćelija tokom perioda razvoja, starenja, ali i kao odgovor ćelije na stres i prilikom regeneracije tkiva. Smatra se da pored povećanja volumena ćelije, poloploidizacija doprinosi genetičkom diverzitetu i može se posmatrati kao adaptivni mehanizam koji se razvija u uslovima hroničnog delovanja stresora i/ili oštećenja tkiva (Pandit i sar., 2013). U srcu odraslih jedinki sisara, reaktivacija kardiomiocita i ulazak u ćelijski ciklus ne dovode uvek do citokineze, već zahvaljujući određenim, još uvek nedovoljno poznatim mehanizmima, za ishod imaju poliploidizaciju u jednom jedru (duplikacija DNK molekula u odsustvu deobe jedra) ili multinukleaciju (kariokineza – deoba jedra se odvija, ali izostaje citokineza) (Derks i Bergmann, 2020). U skladu s tim, postoji pretpostavka da je u našem istraživanju, u modelu depresivnog ponašanja, prilikom hroničnog izlaganja ACTH tretmanu, određeni broj Ki-67 imunopozitivnih kardiomiocita podlegao poliploidizaciji. Međutim, u populaciji srčanih mišićnih ćelija koje ekspimiraju Ki-67, u ovom trenutku je nemoguće jasno razgraničiti i sa sigurnošću utvrditi koji procenat ćelija je podlegao proliferaciji, multinukleaciji ili poliploidizaciji u jednom jedru.

Neophodno je istaći da su u istraživanjima zastupljeni i drugi markeri proliferacije, poput 5-bromo-2'-deoksiuridina (BrdU), 5-etinil-2'-deoksiuridina (EdU), fosfohistona 3, kao i da primena različitih markera ima značaj u određivanju faze ćelijskog ciklusa (Salic i Mitchison, 2008; Mollova i sar., 2013; Nakada i sar., 2017; Gabisonia i sar., 2019; Derks i Bergmann, 2020). Međutim, smatra se da nijedan od navedenih markera proliferacije nema prednost u odnosu na Ki-67, kada je u pitanju robustnost i prediktivna validnost metode. Interesatno je da na primer, ni kombinovanom primenom markera Ki-67 i fosfohistona H3 ne može sa sigurnošću da se utvrdi da li je srčana mišićna ćelija ušla u proces multinukleacije ili proliferacije (Gabisonia i sar., 2019). Sa druge strane, nakon izolacije miokarda, prilikom enzimske disocijacije tkiva u cilju određivanja ukupnog broja kardiomiocita, sam proces razgradnje tkiva može se odraziti na broj specifičnih populacija ćelija (Mollova i sar., 2013; Derks i Bergmann, 2020). Takođe, nukleotidni analozi BrdU i EdU, koji se inkorporiraju u DNK molekul tokom S faze, ometaju biohemijske reakcije u ćeliji i samim tim i aktivnost tokom ćelijskog ciklusa (Nakada i sar., 2017). U literaturi se navodi i da je glavni nedostatak primene BrdU kao parametra proliferacije, činjenica da se prilikom denaturacije koriste koncentrovana hlorovodonična kiselina ili smeša metanola i sirćetne kiseline i da se pod ovim uslovima neizbežno javljaju varijacije u intenzitetu boje koja se razvija tokom detekcije (Salic i Mitchison, 2008).

U našem istraživanju, prilikom ispitivanja proliferativne aktivnosti kardiomiocita, pored molekula Ki-67, praćen je nivo ekspresije PCNA primenom imunohistohemijske metode detekcije. Uočeno je da je ekspresija PCNA značajno snižena kod ACTH/Mg životinja, dok je u ostalim eksperimentalnim grupama ovaj parameter ostao relativno nepromenjen. Naime, PCNA je protein koji ima neizostavnu ulogu u procesima replikacije i reparacije DNK, i neretko se u istraživanjima koristi kao marker ćelijske proliferacije. Primećeno je da molekul PCNA pokazuje visok nivo ekspresije u fetalnom i neonatalnom srčanom mišićnom tkivu (Marino i sar., 1996; Dispersyn i sar., 1999). Sa druge strane, primera radi, u animalnom modelu koji se zasniva na indukciji hronične atrijalne fibrilacije, primenom imunohistohemijske metode nije detektovana ekspresija PCNA u kardiomiocitima odraslih jedinki sisara (Dispersyn i sar., 1999). Po izvesnim autorima, PCNA se

retko imunohistohemijski detektuje u srcu zdravih odraslih jedinki sisara (Dispersyn i sar., 1999). Međutim, poznato je da DNK oštećenje i proces apoptoze dovode do ushodne regulacije PCNA u ćeliji (Berges i sar., 1993; Savio i sar., 1998), što potencijalno može objasniti dobijene razlike u našoj studiji u nivou ekspresije Ki-67 i PCNA u kardiomiocitima, u sklopu iste eksperimentalne grupe. Prema tome, nameće se pretpostavka da smanjen nivo ekspresije PCNA u srčanim mišićnim ćelijama životinja izloženih kombinovanom ACTH i Mg tretmanu u našoj studiji, reflektuje smanjen stepen DNK oštećenja, a ne odsustvo proliferativne aktivnosti.

Danas se smatra da povećanje mase miokarda, tokom perioda rasta, nastaje kao rezultat aktivacije dva ćelijska mehanizma: proliferacije i uvećanja mase - hipertrofije srčanih mišićnih ćelija. U ispitivanju koje su sprovedi Mollova i sar. (2103), nakon *post mortem* analize humanih uzoraka miokarda, potvrđeno je da se proliferacija kardiomiocita javlja i u postnatalnom periodu. Otkriveno je da nakon rođenja, kod zdravih osoba broj kardiomiocita raste do 20. godine života (Mollova i sar., 2013). Za razliku od proliferacije koje se završava kompletnom citokinezom, povećanje mase miokarda izazvano hipertrofijom ne dovodi do reorganizacije sarkomera i privremenog gubitka kontraktilne funkcije (Pandit i sar., 2013). Rezultati našeg istraživanja ukazuju da je hronična aplikacija ACTH, kao i peroralna Mg suplementacija kod odraslih mužjaka pacova, uzrokovala primetno smanjenje dijametra kardiomiocita. Interesantno je da, nasuprot očekivanjima, efekat magnezijuma na dati parametar je izraženiji, dok je kombinovana primena ACTH i Mg za posledicu imala normalizaciju prosečnog dijametra kardiomiocita. Možemo pretpostaviti da su opisane razlike nastale zahvaljujući različitim fazama ćelijskog ciklusa u kojima su bili kardiomiociti u trenutku prikupljanja uzoraka. Drugo objašnjenje, koje ne isključuje prethodno navedeno, podrazumeva da su razlike u transnuklearnom dijametru kardiomiocita posledica ekscentrične hipertrofije koja se javila kod mužjaka pacova hronično izloženih ACTH. Neophodno je istaći da postoje koncentrična i ekscentrična hipertrofija miokarda. Prilikom razvoja ekscentrične hipertrofije, kontraktilni proteini koji izgrađuju sarkomere se međusobno serijski povezuju, što dovodi do izraženog povećanja dužine ćelije i neretko smanjenja dijametra (Kehat i sar., 2011). Sa druge strane, koncentričnu hipertrofiju kardiomiocita karakteriše paralelno povezivanje kontraktilnih jedinica i povećanje dijametra srčanih mišićnih ćelija. Smatra se da koncentrična i ekscentrična hipertrofija nastaju kao rezultat aktivacije specifičnih intracelularnih signalnih puteva, koji do danas nisu u potpunosti razjašnjeni (Kehat i sar., 2011).

Interesantno je pomenuti da ekstracelularni matriks u srcu ostvaruje jednu od centralnih uloga u regulaciji sazrevanja i ćelijskog ciklusa kardiomiocita (Bassat i sar., 2017; Dixon i sar., 2019). Remodelovanje ekstracelularnog matriksa, koje je prisutno kod različitih kardiovaskularnih oboljenja, kontrolišu fibroblasti i nedavno je pokazano da prelazak fibroblasta iz neonatalnog u adultni tip predstavlja jedan od ključnih procesa vezanih za regulaciju maturacije i reaktivacije kardiomiocita (Wang i sar., 2020; Derks i sar., 2020). U našem ispitivanju, u modelu depresivnog ponašanja indukovano adrenokortikotropnim hormonom, pokazano je da izraženi porast proliferacije fibroblasta i povećanje sadržaja endomizijalnog kolagena u srcu, prati vaskularno remodelovanje, ali i proliferacija kardiomiocita. Pored navedenog otkrića, pokazano je da Mg suplementacija suprimira razvoj fibroze i inhibira vaskularno remodelovanje izazvano ACTH tretmanom, i istovremeno Mg stimuliše proliferaciju srčanih mišićnih ćelija kod zdravih i životinja hronično izloženih ACTH. Fenotip i broj fibroblasta u srcu podležu promenama, kako tokom starenja, tako i kod različitih oboljenja miokarda (Derks i sar., 2020). Shodno tome, dalja istraživanja i otkriće kompleksnih mehanizama i ćelijskih medijatora koji posreduju u komunikaciji fibroblasta i kardiomiocita su neophodni u cilju pronalaska optimalne strategije i poboljšanja regenerativnog kapaciteta miokarda.

5.10. Razvoj i implementacija 3D modela sferoida srčanih mišićnih ćelija i ispitivanje *in vitro* efekata ACTH na humane kardiomiocite

Remodelovanje srca i/ili hipertrofija miokarda obuhvataju niz promena na molekularnom i ćelijskom nivou, koje se javljaju u cilju održavanja minutnog volumena, i kao posledica povećanih zahteva organizma ili patoloških procesa. Hipertrofija miokarda je nezavisni faktor rizika za razvoj srčane insuficijencije, aritmija i iznenadne srčane smrti (Kehat i sar., 2011). Odavno je poznata uloga glukokortikoida i mineralokortikoidnih receptora u remodelovanju srca i razvoju srčane insuficijencije, međutim, imajući u vidu dostupne literaturne podatke, do danas nisu sprovedena istraživanja u cilju određivanja potencijalnih direktnih efekata ACTH na srčane mišićne ćelije. U tu svrhu, u trećoj fazi istraživanja u sklopu ove disertacije, najpre je implementiran i validiran 3D model sferoida nastalih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija, i potom su u datom modelu ispitivani efekti različitih koncentracija ACTH na kardiomiocite.

Primena *in vitro* modela danas ima esencijalni značaj u izučavanju patoloških mehanizama i razvoju novih terapijskih pristupa (Karakikes i sar., 2015). Kardiomiociti formirani indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija predstavljaju relativno novu eksperimentalnu platformu koja otvara dodatne mogućnosti i obezbeđuje inovativni pristup koji povećava robustnost i prediktivnu validnost dobijenih nalaza. Naime, ova platforma je od ključnog značaja u istraživanju patološkog supstrata u osnovi remodelovanja srca, regenerativne sposobnosti miokarda, ispitivanju kardiotoksičnog potencijala, kao i kandidata za nove lekove (Beauchamp i sar., 2015; Karakikes i sar., 2015; Gintant i sar., 2016; Polonchuk i sar., 2017; Campbell i sar., 2019). Proteklih godina fokus istraživanja je preusmeren na trodimenzionalne *in vitro* modele ćelijskih kultura kardiomiocita, koji verno oslikavaju morfološke i funkcionalne fenotipske osobine srčanih mišićnih ćelija i u poređenju sa dvodimenzionalnim sistemima tokom znatno dužeg perioda imaju očuvanu vijabilnost, gensku ekspresiju i elektrofiziološke karakteristike. Rezultati naše studije, dobijeni u okviru treće eksperimentalne faze, prilikom razvoja i implementacije 3D modela sferoida humanih kardiomiocita, potvrđuju ove nalaze. Primećeno je da je vijabilnost kardiomiocita, praćena merenjem nivoa ATP u kulturi, nakon sedam dana od zasejavanja ćelija, značajno veća u 3D modelu sferoida u poređenju sa tradicionalnim 2D modelom. Takođe, tokom analize uticaja različitih medijuma za ćelijske kulture, na vijabilnost i ekspresiju specifičnih i relevantnih gena u kardiomiocitima, uključujući *MYL2*, *MYL7*, *PLN* i *NKX2.5*, ustanovljeno je da najveću vijabilnost i očuvane fenotipske osobine kardiomiociti imaju u 3D modelu sferoida kada se ćelije zaseju u PM i nakon formiranja sferoida kultura nastavi u WE medijumu. Interesantno je da u našem 3D modelu sferoida dodatak B-27 suplementa, insulinu sličnog faktora rasta 1, vaskularnog endotelnog faktora rasta, faktora rasta fibroblasta 2 i transformišućeg faktora rasta beta 1 u WES medijum za ćelijske kulture nije pokazao prednost u odnosu na WE medijum. U skladu sa dobijenim nalazima, sledeći korak u sklopu trećeg seta eksperimenata podrazumevao je implementaciju našeg modela sferoida humanih kardiomiocita, što obuhvata: zasejavanje ćelija u PM, transfer formiranih sferoida u WE medijum i počevši od šestog dana u kulturi tretman fiziološkim i suprafiziološkim koncentracijama ACTH. Izlaganje sferoida humanih kardiomiocita fiziološkim koncentracijama ACTH nije ispoljilo negativne efekte na vijabilnost kardiomiocita, ekspresiju *MYL2*, *PLN* i *NKX2.5*, i nije izazvalo porast aktivnosti kaspaze 3, parametra koji odražava nivo apoptoze u kulturi. Dodatno, nakon 19 dana ACTH tretmana, uočeno je dozno-zavisno smanjenje nivoa aktivirane kaspaze 3 u 3D modelu sferoida humanih kardiomiocita.

Tokom proteklih godina, u istraživanjima je pokazano da proliferaciju kardiomiocita kod sisara i hipertrofiju miokarda povezuju zajednički signalni putevi i ćelijski medijatori (Matrone i sar., 2017). Ventrikularna hipertrofija predstavlja adaptivni odgovor na hroničan hemodinamski

stres, prevashodno hipertenziju i valvularna oboljenja (Samak i sar., 2016). Pokazano je da patološku hipertrofiju miokarda odlikuje izraženo povećanje dimenzija komora, fibroza i disfunkcija miokarda. Promene koje se javljaju na ćelijskom nivou uključuju povećanje volumena ćelije, povećanu sintezu proteina, promene u arhitekturi sarkomera, poremećaj funkcije mitohondrija i reaktivaciju fetalnih gena (Carlson i sar., 2013; Samak i sar., 2016). Rezultati naše studije pokazuju da je nakon dugotrajne izloženosti ACTH tretmanu, nivo Ki-67 u sferoidima humanih kardiomiocita, kao pokazatelj proliferativne aktivnosti u kulturi, ostao nizak. Nasuprot tome, u *in vivo* ispitivanju, nakon tronedeljne primene ACTH, zabeležen je izraženi porast broja kardiomiocita koji ekspimiraju Ki-67, što ukazuje da stimulatorni efekat koji ostvaruje ACTH na proliferaciju kardiomiocita kod mužjaka Wistar pacova, nastaje zahvaljujući pojačanom oslobađanju kortikosterona i aktivaciji glukokortikoidnih i/ili mineralokortikoidnih receptora u srcu. Smatra se da je glukokortikoidna signalizacija u kardiomiocitima neophodna za normalan razvoj i fiziološke funkcije miokarda, dok je mineralokortikoidna signalizacija uključena u razvoj i progresiju srčanih oboljenja (Oakley i Cidlowski, 2015). Sa druge strane, interesantno je da je u našem *in vitro* istraživanju zabeležen značajan porast nivoa ATP u kardiomiocitima, nakon izlaganja veoma visokoj koncentraciji ACTH (30x ACTH). Povećanje nivoa intracelularnog ATP, u odsustvu proliferacije, potencijalno upućuje na porast volumena kardiomiocita. Takođe, opisano otkriće govori u prilog hipotezi da su u osnovi određenih efekata ACTH na miokard mehanizmi i signalni putevi nezavisni od kortizola/kortikosterona i glukokortikoidnih i mineralokortikoidnih receptora. Na osnovu rezultata dobijenih u sklopu treće eksperimentalne faze ove disertacije, možemo pretpostaviti da je tretman visokim koncentracijama ACTH uzrokovao hipertrofiju kardiomiocita nastalih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija, koji verno reflektuju morfološke i funkcionalne karakteristike srčanih mišićnih ćelija odraslih, zdravih osoba. U prilog našoj hipotezi govore rezultati prospektivne studije, u kojoj je tokom primene ACTH u terapiji miokloničnih napada kod pedijatrijske populacije, ehokardiografijom ustanovljeno prisustvo hipertrofije miokarda. Primećeno je da se hipertrofija javila svega nekoliko dana od početka terapije, međutim, neophodno je istaći i da se u roku od 5 meseci, od okončanja primene ACTH, normalizovala veličina i geometrija srca (Lang i sar., 1984; Bobele i sar., 1993). Smatra se da je ACTH indukovao razvoj hipertrofije miokarda i pretpostavka je da mehanizmi koji su tome doprineli uključuju: deponovanje glikogena u srčanom mišićnom tkivu, hiperinsulinizam, arterijsku hipertenziju i porast medijatora koji deluju pozitivno inotropno.

Početakom devedesetih godina prošlog veka, zapaženo je da se tokom lečenja bronhopulmonalne displazije kod prevremeno rođenih beba, kao najozbiljniji neželjeni efekat terapije deksametazonom, razvila hipertrofična kardiomiopatija (Israel i sar., 1993). Kasnije su *in vivo* i *in vitro* ispitivanja potvrdila da glukokortikoidi dovode do razvoja hipertrofije miokarda (La Mear i sar., 1997; Whitehurst Jr i sar., 1999; Ren i sar., 2012). Naime, Whitehurst Jr i sar. (1999) su pokazali da inkubacija sa deksametazonom u ćelijskoj kulturi, za posledicu ima razvoj hipertrofije kardiomiocita prethodno izolovanih iz srca mladunaca pacova. Pretpostavka je da pojačana aktivacija voltažno zavisnih Ca kanala L-tipa ima ulogu u razvoju opisane hipertrofije srčanih mišićnih ćelija mladunaca pacova. U istraživanju koje su sprovedili Ren i sar. (2012), takođe je uočeno značajno povećanje volumena kardiomiocita, indukovano *in vitro* tretmanom deksametazonom. Pored toga, zabeležena je ushodna regulacija biomarkera hipertrofije miokarda, poput atrijalnog natriuretskog peptida, teškog lanca β -miozina i α -aktina skeletnih mišića (Ren i sar., 2012). U skladu sa navedenim rezultatima *in vitro* eksperimenata su nalazi *in vivo* studije La Mear i sar. (1997), koji su pokazali da aplikacija deksametazona kod mladunaca Sprague-Dawley pacova izaziva hipertrofiju miokarda. Analogno, izveštaji ispitivanja u humanoju populaciji ukazuju da visok nivo cirkulišućih glukokortikoida, koji se javlja kod određenih patoloških stanja, uključujući Kušingov sindrom, često dovodi do razvoja hipertenzije i metaboličkog sindroma, koji se danas ubrajaju među vodeće faktore rizika za nastanak bolesti srca. Epidemiološke studije su

otkrile značajnu povezanost između suprafizioloških doza i/ili koncentracija glukokortikoida i srčane insuficijencije (Oakley i Cidlowski, 2015).

Imajući na umu nalaze naše *in vitro* studije i navedene rezultate drugih istraživanja, možemo izneti hipotezu da i visok nivo ACTH i glukokortikoidi uzrokuju nastanak hipertrofije miokarda, kao i da su *in vivo* efekti ACTH na kardiomiocite delom posredovani kortizolom/kortikosteronom, ali i drugim, nezavisnim mehanizmima koji zahtevaju dalja istraživanja. U cilju karakterizacije direktnih efekata ACTH na srce i rasvetljavanja potencijalne uloge melanokortinskih receptora i nishodne signalizacije u razvoju hipertrofije miokarda, neophodno je utvrditi da li se nakon *in vitro* ACTH tretmana javlja reaktivacija fetalnih gena i promene u ekspresiji atrijskog natriuretskog peptida, teškog lanca β -miozina i moždanog natriuretskog peptida (eng. brain natriuretic peptide, BNP), parametara indikativnih za hipertrofiju. Terapijski pristup pacijentima kod kojih je tokom dužeg vremenskog perioda prisutan visok nivo cirkulišućeg ACTH, usled hiperaktivnosti HPA osovine, ili egzogene aplikacije ACTH u cilju lečenja infantilnog spazma, kao jedan od glavnih ciljeva ima prevenciju remodelovanja i razvoja hipertrofije miokarda. Nalazi naše studije ukazuju na opravdanost, ali i potrebu za ispitivanjem efikasnosti i potencijalnog kardioprotektivnog efekta Mg suplementacije, kao adjuvantnog terapijskog sredstva, u datoj populaciji.

6. ZAKLJUČAK

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

- U modelu hiperaktivnosti HPA osovine, koji je u ranijim studijama validiran i implementiran kao model depresije rezistentne na triciklične antidepresive, primena magnezijuma u trajanju od 28 dana ispoljava anksiolitički i antidepresivni efekat kod mužjaka pacova. Navedeni efekat je pokazan zahvaljujući primeni relevantnih bihevioralnih testova (test otvorenog polja i test forsiranog plivanja).
- Hronični tretman magnezijumom deluje stimulatorno na proces adultne neurogeneze kod zdravih životinja, ali i u modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive. Opisani efekat se manifestuje značajnim porastom broja ćelija koje eksprimiraju marker proliferacije Ki-67 i BDNF, molekularni medijator proliferacije i sazrevanja novih neurona, kao i sinaptogeneze, u dentatnom girusu hipokampusa. Dugotrajna primena ACTH je dovela do primetnog porasta broja Ki-67 imunopozitivnih ćelija u hipokampusu, ali je ekspresija BDNF proteina ostala nepromenjena kod ovih životinja.
- Hronična primena magnezijuma deluje modulatorno na aktivnost monoaminergičkog sistema, što se ogleda u porastu nivoa kateholamina i serotonina u plazmi, ali i nivoa Cu u prefrontalnom korteksu. Magnezijum izaziva značajan porast oslobađanja adrenalina i noradrenalina, prilikom izlaganja akutnom stresu u obliku testa forsiranog plivanja, kao i povećanje nivoa Cu u prefrontalnom korteksu u modelu depresivnog ponašanja. Kod zdravih jedinki magnezijum dovodi do izraženog porasta cirkulišućih kateholamina i serotonina, koji je praćen nepromenjenim statusom Cu u prefrontalnom korteksu.
- U modelu depresivnog ponašanja, rezistentnog na triciklične antidepresive, hronična primena magnezijuma suprimira hiperaktivnost HPA osovine. Navedeni efekat se manifestuje smanjenjem nivoa glavnog hormona stresa - kortikosterona u plazmi, i padom nivoa cirkulišućeg proinflamatornog citokina IL-6, koji je blisko povezan sa funkcijom HPA ose. Kod zdravih životinja, dugotrajna primena magnezijuma takođe indukuje pad koncentracije IL-6 u plazmi.
- Hronični tretman magnezijumom suprimira negativne efekte ACTH na telesnu masu životinja i sprečava smanjenje telesne mase, koje se javlja prilikom dugotrajnog izlaganja ACTH. U modelu depresivnog ponašanja, visok nivo cirkulišućeg ACTH dovodi do hipertrofije nadbubrežne žlezde, dok protektivni efekat magnezijuma na ove endokrine žlezde izostaje.
- U modelu depresije rezistentne na triciklične antidepresive, hronična primena magnezijuma suprimira razvoj intersticijalne fibroze miokarda indukovane adrenokortikotropnim hormonom. Visok nivo cirkulišućeg ACTH, tokom dužeg vremenskog perioda, stimuliše proliferaciju fibroblasta i deponovanje endomizijalnog kolagena, parametara indikativnih za prisustvo fibroze u srcu eksperimentalnih životinja, dok magnezijum deluje kardioprotektivno i inhibira navedene efekte.

- U modelu depresivnog ponašanja, visoka koncentracija ACTH izaziva vaskularno remodelovanje, koje se ogleda u porastu broja endotelnih ćelija mikrocirkulacije srca koje eksprimiraju marker proliferacije Ki-67 i anti-apoptotski protein Bcl-2. Tretman magnezijumom u trajanju od 28 dana deluje protektivno i inhibira razvoj vaskularnog remodelovanja.
- Hronična primena magnezijuma kod zdravih životinja i u modelu depresivnog ponašanja, ali i dugotrajni ACTH tretman, stimulišu proliferaciju kardiomiocita, koja se manifestuje izraženim porastom broja srčanih mišićnih ćelija koje eksprimiraju Ki-67. Kod eksperimentalnih životinja i ACTH i Mg dovode do smanjenja dijametra kardiomiocita, dok je kombinovani tretman praćen normalizacijom ovog parametra.
- U trodimenzionalnom *in vitro* modelu sferoida kardiomiocita, formiranih indukcijom humanih pluripotentnih stem ćelija, dugotrajni tretman suprafiziološkom koncentracijom ACTH izaziva izraženi porast nivoa ATP, dok je ekspresija Ki-67 nepromenjena. Opisani efekat ukazuje na dejstvo ACTH na kardiomiocite, koje se ispoljava posredstvom mehanizama koji su nezavisni od glukokortikoidne signalizacije. Visok nivo ATP u kulturi, u odsustvu proliferacije, upućuje na hipertrofiju kardiomiocita izazvanu veoma visokim koncentracijama ACTH.

Na osnovu prikazanih rezultata istraživanja u okviru doktorske disertacije, može se zaključiti da je opravdano sprovesti kliničko ispitivanje i utvrditi ulogu Mg suplementacije, kao adjuvantnog terapijskog sredstva, koje potencijalno ispoljava povoljne efekte i kardioprotektivno dejstvo, kod osoba koje boluju od depresivnog poremećaja praćenog visokim nivoom cirkulišućeg kortizola.

7. LITERATURA

Abbas, A.M., Sakr, H.F., 2016. Effect of magnesium sulfate and thyroxine on inflammatory markers in a rat model of hypothyroidism. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94, 426-432.

Abdallah, C.G., Adams, T.G., Kelmendi, B., Esterlis, I., Sanacora, G., Krystal, J.H., 2016. Ketamine's mechanism of action: a path to rapid-acting antidepressants. *Depress. Anxiety* 33, 689-697.

Abumaria, N., Luo, L., Ahn, M., Liu, G., 2013. Magnesium supplement enhances spatial-context pattern separation and prevents fear overgeneralization. *Behav. Pharmacol.* 24, 255-263.

Adachi, M., Barrot, M., Autry, A.E., Theobald, D., Monteggia, L.M., 2008. Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy. *Biol. Psychiatry* 63, 642-649.

Aggio, V., Poletti, S., Ambrée, O., Colombo, C., Arolt, V., Benedetti, F., 2016. Brain-derived neurotrophic factor associates with gray matter volumes and early adverse experiences in bipolar disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26, S68-S69.

Agrimi, J., Spalletti, C., Baroni, C., Keceli, G., Zhu, G., Caragnano, A., Matteucci, M., Chelko, S., Ramirez-Correa, G.A., Bedja, D., Casieri, V., Di Lascio, N., Scalco, A., Beltrami, A.P., Paolocci, N., Caleo, M., Lionetti, V., 2019. Obese mice exposed to psychosocial stress display cardiac and hippocampal dysfunction associated with local brain-derived neurotrophic factor depletion. *EBioMedicine.* 47, 384-401.

Airan, R.D., Meltzer, L.A., Roy, M., Gong, Y., Chen, H., Deisseroth, K., 2007. High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. *Science* 317, 819-823.

Alonso, R., Griebel, G., Pavone, G., Stemmelin, J., Le, F.G., Soubrie, P., 2004. Blockade of CRF(1) or V(1b) receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol. Psychiatry* 9, 278-286.

Altar, C.A., Whitehead, R.E., Chen, R., Wortwein, G., Madsen, T.M., 2003. Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biol. Psychiatry* 54, 703-709.

Altura, B.M., Altura, B.T., Gebrewold, A., Ising, H., Gunther, T., 1984. Magnesium deficiency and hypertension: correlation between magnesium-deficient diets and microcirculatory changes in situ. *Science* 223, 1315-1317.

Altura, B.M., Gebrewold, A., Zhang, A., Altura, B.T., 2003. Low extracellular magnesium ions induce lipid peroxidation and activation of nuclear factor-kappa B in canine cerebral vascular smooth muscle: possible relation to traumatic brain injury and strokes. *Neurosci. Lett.* 341, 189-192.

Amyard, N., Leyris, A., Monier, C., Frances, H., Boulu, R.G., Henrotte, J.G., 1995. Brain catecholamines, serotonin and their metabolites in mice selected for low (MGL) and high (MGH) blood magnesium levels. *Magnes. Res.* 8, 5-9.

Ardayfio, P., Kim, K., 2006. Anxiogenic-like effect of chronic corticosterone in the light—dark emergence task in mice. *Behav. Neurosci.* 120, 249—256.

Aryana, P., Rajaei, S., Bagheri, A., Karimi, F., Dabbagh, A., 2014. Acute effect of intravenous administration of magnesium sulfate on serum levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in patients undergoing elective coronary bypass graft with cardiopulmonary bypass. *Anesth. Pain Med.* 4, e16316.

Autry, A.E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E.S., Los, M.F., Cheng, P.F., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2011. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 475, 91–95.

Aydemir, O., Deveci, A., Taneli, F., 2005. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 261–265.

Ayuk, J., Gittoes, N.J., 2014. Contemporary view of the clinical relevance of magnesium homeostasis. *Ann. Clin. Biochem.* 51, 179–188.

Azevedo, P.S., Polegato, B.F., Minicucci, M.F., Paiva, S.A., Zornoff, L.A., 2016. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arq. Bras. Cardiol.* 106, 62-69.

Banagozar Mohammadi, A., Torbati, M., Farajdokht, F., Sadigh-Eteghad, S., Fazljou, S.M.B., Vatandoust, S.M., Golzari, S.E.J., Mahmoudi, J., 2019. Sericin alleviates restraint stress induced depressive- and anxiety-like behaviors via modulation of oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in the prefrontal cortex and hippocampus. *Brain Res.* 1715, 47-56.

Banai, S., Haggroth, L., Epstein, S.E., Casscells, W., 1990. Influence of extracellular magnesium on capillary endothelial cell proliferation and migration. *Circ. Res.* 67, 645-650.

Bassat, E., Mutlak, Y.E., Genzelinakh, A., Shadrin, I.Y., Baruch Umansky, K., Yifa, O., Kain, D., Rajchman, D., Leach, J., Riabov Bassat, D., Udi, Y., Sarig, R., Sagi, I., Martin, J.F., Bursac, N., Cohen, S., Tzahor, E., 2017. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature* 547, 179-184.

Bath, K.G., Schilit, A., Lee, F.S., 2013. Stress effects on BDNF expression: effects of age, sex, and form of stress. *Neuroscience* 239, 149-156.

Beauchamp, P., Moritz, W., Kelm, J.M., Ullrich, N.D., Agarkova, I., Anson, B.D., Suter, T.M., Zuppinger, C., 2015. Development and characterization of a scaffold-free 3D spheroid model of induced pluripotent stem cell-derived human cardiomyocytes. *Tissue Eng. Part C Methods* 21, 852-861.

Beck, A.T., Alford, B.A., 2009. *Depression: Causes and Treatment.* (2nd ed.), University of Pennsylvania Press.

Bell, C.C., Lauschke, V.M., Vorrink, S.U., Palmgren, H., Duffin, R., Andersson, T.B., Ingelman-Sundberg, M., 2017. Transcriptional, functional, and mechanistic comparisons of stem cell-derived hepatocytes, HepaRG cells, and three-dimensional human hepatocyte spheroids as predictive *in vitro* systems for drug-induced liver injury. *Drug Metab. Dispos.* 45, 419–429.

- Beltrami, A.P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S.M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, A.C., Anversa, P., 2001. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 344, 1750-1757.
- Benedict, C.R., Shelton, B., Johnstone, D.E., Francis, G., Greenberg, B., Konstam, M., Probstfield, J.L., Yusuf, S., 1996. Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation* 94, 690–697.
- Benjamin, E.J., Virani, S.S., Callaway, C.W., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Chiuve, S.E., Cushman, M., Delling, F.N., Deo, R., de Ferranti, S.D., Ferguson, J.F., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jiménez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Lutsey, P.L., Mackey, J.S., Matchar, D.B., Matsushita, K., Mussolino, M.E., Nasir, K., O'Flaherty, M., Palaniappan, L.P., Pandey, A., Pandey, D.K., Reeves, M.J., Ritchey, M.D., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sampson, U.K.A., Satou, G.M., Shah, S.H., Spartano, N.L., Tirschwell, D.L., Tsao, C.W., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P., American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee., 2018. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 137, e67-e492.
- Berges, R.R., Furuya, Y., Remington, L., English, H.F., Jacks, T., Isaacs, J.T., 1993. Cell proliferation, DNA repair, and p53 function are not required for programmed death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90, 8910-8914.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., Jovinge, S., Frisén, J., 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98-102.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., Krystal, J.H., 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry* 47, 351–354.
- Björkholm, C., Monteggia, L.M., 2016. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology* 102, 72-79.
- Blardi, P., de Lalla, A., Auteri, A., Iapichino, S., Dell'Erba, A., Castrogiovanni, P., 2005. Plasma catecholamine levels after fluoxetine treatment in depressive patients. *Neuropsychobiology* 51, 72-76.
- Bloom, S., 1988. Magnesium deficiency cardiomyopathy. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* 2, 7–17.
- Bobele, G.B., Ward, K.E., Bodensteiner, J.B., 1993. Hypertrophic cardiomyopathy during corticotropin therapy for infantile spasms. A clinical and echocardiographic study. *Am. J. Dis. Child.* 147, 223-225.
- Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Mori-Estevez, A.D., Sánchez-Acuña, G., 2013. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* 18, e174-e179.
- Bremner, M.A., Deeg, D.J., Beekman, A.T., Penninx, B.W., Lips, P., Hoogendijk, W.J., 2007. Major depression in late life is associated with both hypo- and hypercortisolemia. *Biol. Psychiatry* 62, 479–486.

- Brouwer, J.P., Appelhof, B.C., Hoogendijk, W.J., Huyser, J., Endert, E., Zuketto, C., Schene, A.H., Tijssen, J.G., Van Dyck, R., Wiersinga, W.M., Fliers, E., 2005. Thyroid and adrenal axis in major depression: A controlled study in outpatients. *Eur. J. Endocrinol.* 152, 185–191.
- Brown, A.S., van Os, J., Driessens, C., Hoek, H.W., Susser, E.S., 2000. Further evidence of relation between prenatal famine and major affective disorder. *Am. J. Psychiatry* 157, 190–195.
- Brown, E.S., Varghese, F.P., McEwen, B.S., 2004. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biol. Psychiatry* 55, 1–9.
- Brunton, P.J., 2016. Neuroactive steroids and stress axis regulation: Pregnancy and beyond. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 160, 160-168.
- Cahill, F., Shahidi, M., Shea, J., Wadden, D., Gulliver, W., Randell, E., Vasdev, S., Sun, G., 2013. High dietary magnesium intake is associated with low insulin resistance in the Newfoundland population. *PLoS One* 8, e58278.
- Camelliti, P., Borg, T.K., Kohl, P., 2005. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 65, 40-51.
- Campbell, M., Chabria, M., Figtree, G.A., Polonchuk, L., Gentile, C., 2019. Stem cell-derived cardiac spheroids as 3D in vitro models of the human heart microenvironment. *Methods Mol. Biol.* 2002, 51-59.
- Campbell, S., Macqueen, G., 2004. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J. Psychiatry Neurosci.* 29, 417-426.
- Can, A., Dao, D.T., Arad, M., Terrillion, C.E., Piantadosi, S.C., Gould, T.D., 2012. The mouse forced swim test. *J. Vis. Exp.* 59, e3638.
- Cannon, W.B., 1914. The interrelationships of emotions as suggested by recent physiological researches. *Am. J. Psychol.* 25, 256-282.
- Cannon, W.B., 1928. The mechanism of emotional disturbance of bodily functions. *N. Engl. J. Med.* 198, 877-884.
- Carlson, C., Koonce, C., Aoyama, N., Einhorn, S., Fiene, S., Thompson, A., Swanson, B., Anson, B., Kattman, S., 2013. Phenotypic screening with human iPS cell-derived cardiomyocytes: HTS-compatible assays for interrogating cardiac hypertrophy. *J. Biomol. Screen.* 18, 1203-1211.
- Cattaneo, A., Bocchio-Chiavetto, L., Zanardini, R., Milanesi, E., Placentino, A., Gennarelli, M., 2010. Reduced peripheral brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are normalized by antidepressant treatment. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13, 103–108.
- Chattopadhyaya, B., Di Cristo, G., Wu, C.Z., Knott, G., Kuhlman, S., Fu, Y., Palmiter, R.D., Huang, Z.J., 2007. GAD67-mediated GABA Synthesis and Signaling Regulate Inhibitory Synaptic Innervation in the Visual Cortex. *Neuron* 54, 889-903.
- Chen, B., Dowlathshahi, D., MacQueen, G.M., Wang, J.F., Young, L.T., 2001. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol. Psychiatry* 50, 260–265.

- Chen, H., Zhang, L., Zhang, M., Song, X., Zhang, H., Liu, Y., Lv, S., 2013. Relationship of depression, stress and endothelial function in stable angina patients. *Physiol. Behav.* 118, 152-158.
- Chen, M.H., Lin, W.C., Tu, P.C., Li, C.T., Bai, Y.M., Tsai, S.J., Su, T.P., 2019. Antidepressant and antisuicidal effects of ketamine on the functional connectivity of prefrontal cortex-related circuits in treatment-resistant depression: A double-blind, placebo-controlled, randomized, longitudinal resting fMRI study. *J. Affect. Disord.* 259, 15-20.
- Chen, S.J., Wang, J.L., Chen, J.H., Huang, R.N., 2002. Possible involvement of glutathione and p53 in trichloroethylene- and perchloroethylene-induced lipid peroxidation and apoptosis in human lung cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 464–472.
- Chintalgattu, V., Nair, D.M., Katwa, L.C., 2003. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J. Mol. Cell Cardiol.* 35, 277-286.
- Clark, A.J., Matherell, L.A., Cheetham, M.E., Huebner, A., 2005. Inherited ACTH insensitivity illuminates the mechanisms of ACTH action. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 451-457.
- Côco, H., Oliveira, A.M., 2015. Endothelial Dysfunction Induced by Chronic Psychological Stress: A Risk Factor for Atherosclerosis. *Cardiovasc. Pharm. Open Access* 4, 168.
- Cohn, J.N., Ferrari, R., Sharpe, N., 2000. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 569-582.
- Compas, B.E., Connor-Smith, J., Jaser, S.S., 2004. Temperament, stress reactivity, and coping: implications for depression in childhood and adolescence. *J. Clin. Child Adolesc. Psychol.* 33, 21-31.
- Cosaro, E., Bonafini, S., Montagnana, M., Danese, E., Trettene, M.S., Minuz, P., Delva, P., Fava, C., 2014. Effects of magnesium supplements on blood pressure, endothelial function and metabolic parameters in healthy young men with a family history of metabolic syndrome; A randomized crossover trial. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 24, 1213-1220.
- Costello, R.B., Elin, R.J., Rosanoff, A., Wallace, T.C., Guerrero-Romero, F., Hruby, A., Lutsey, P.L., Nielsen, F.H., Rodriguez-Moran, M., Song, Y., Van Horn, L.V., 2016. Perspective: the case for an evidence-based reference interval for serum magnesium: The time has come. *Adv. Nutr.* 7, 977–993.
- Costoli, T., Bartolomucci, A., Graiani, G., Stilli, D., Laviola, G., Sgoifo, A., 2004. Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H2133-H2140.
- Cotruvo, J., Bartram, J., eds. 2009. *Calcium and Magnesium in Drinking-water: Public health significance*, Geneva, World Health Organization, 21pp.
- 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.

- Cuciureanu, M.D., Vink, R., 2011. Magnesium and stress. Magnesium in the Central Nervous System. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011. ISBN-13: 9780987073051
- Cummings, S., Seybold, V., 1988. Relationship of alpha-1- and alpha-2-adrenergic binding sites to regions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus containing corticotropin-releasing factor and vasopressin neurons. *Neuroendocrinology* 47, 523–532.
- Dallman, M.F., 1984-1985. Control of adrenocortical growth in vivo. *Endocr. Res.* 10, 213-242.
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Artymyshyn, R.P., Gardier, A.M., Gerald, C., Antonijevic, I.A., Leonardo, E.D., Hen, R., 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479-493.
- de Baaij, J.H., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., 2012. Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. *Clin. Kidney J.* 5, i15-i24.
- 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 Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–475.
- de Wilde, M.C., Overk, C.R., Sijben, J.W., Masliah, E., 2016. Meta-analysis of synaptic pathology in Alzheimer's disease reveals selective molecular vesicular machinery vulnerability. *Alzheimers. Dement.* 12, 633-644.
- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H., 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 339-350.
- Derks, W., Bergmann, O., 2020. Polyploidy in cardiomyocytes: roadblock to heart regeneration? *Circ. Res.* 126, 552-565.
- Derks, W., Murganti, F., Bergmann, O., 2020. Cardiomyocyte renewal in the failing heart: lessons from the neonate? *Biophys. Rev.* 12, 785-787.
- Derom, M.L., Martínez-González, M.A., Sayón-Orea Mdel, C., Bes-Rastrollo, M., Beunza, J.J., Sánchez-Villegas, A., 2012. Magnesium intake is not related to depression risk in Spanish university graduates. *J. Nutr.* 142, 1053-1059.
- Detke, M.J., Lucki, I., 1996. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav. Brain Res.* 73, 43–46.
- Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 121, 66-72.
- Diaz, R., Brown, R.W., Seckl, J.R., 1998. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J. Neurosci.* 18, 2570–2580.

- Diazgranados, N., Ibrahim, L., Brutsche, N.E., Newberg, A., Kronstein, P., Khalife, S., Kammerer, W.A., Quezado, Z., Luckenbaugh, D.A., Salvadore, G., Machado-Vieira, R., Manji, H.K., Zarate, C.A. Jr., 2010. A randomized add-on trial of an N-methyl-d-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 67, 793–802.
- Dimsdale, J.E., 2008. Psychological stress and cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 1237-1246.
- DiNicolantonio, J.J., O'Keefe, J.H., Wilson, W., 2018. Subclinical magnesium deficiency: a principal driver of cardiovascular disease and a public health crisis. *Open Heart* 5, e000668.
- Dinis-Oliveira, R.J., 2017. Metabolism and metabolomics of ketamine: a toxicological approach. *Forensic Sci. Res.* 2, 2-10.
- Dispersyn, G.D., Ausma, J., Thoné, F., Flameng, W., Vanoverschelde, J.L., Allessie, M.A., Ramaekers, F.C., Borgers, M., 1999. Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 43, 947-957.
- Dixon, I.M.C., Landry, N.M., Rattan, S.G., 2019. Periostin Reexpression in Heart Disease Contributes to Cardiac Interstitial Remodeling by Supporting the Cardiac Myofibroblast Phenotype. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1132, 35-41.
- 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.
- Doherty, T., Wajs, E., Melkote, R., Miller, J., Singh, J.B., Weber, M.A., 2020. Cardiac Safety of Esketamine Nasal Spray in Treatment-Resistant Depression: Results from the Clinical Development Program. *CNS Drugs* 34, 299-310.
- 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.
- Donovan, M.J., Lin, M.I., Wiegand, P., Ringstedt, T., Kraemer, R., Hahn, R., Wang, S., Ibañez, C.F., Rafii, S., Hempstead, B.L., 2000. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development.* 127, 4531-4540.
- Dronjak, S., Gavrilovic, L., 2006. Effects of stress on catecholamine stores in central and peripheral tissues of long-term socially isolated rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 785-790.
- Duman, C.H., Duman, R.S., 2015. Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurosci. Lett.* 601, 20-29.
- Duman, R., 2004a. Depression: A case of neuronal life and death? *Biol. Psychiatry* 56, 140 –145.
- Duman, R.S., 2014. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. *Depress. Anxiety* 31, 291-296.
- Duman, R.S., 2014. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. *Dialogues Clin. Neurosci.* 16, 11-27.

- Duman, R.S., Monteggia, L.M., 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry* 59, 1116-27.
- Duman, R.S., Sanacora, G., Krystal, J.H., 2019. Altered connectivity in depression: GABA and glutamate neurotransmitter deficits and reversal by novel treatments. *Neuron* 102, 75-90.
- Dwivedi, Y., 2010. Brain-derived neurotrophic factor and suicide pathogenesis. *Ann. Med.* 42, 87–96.
- Dwivedi, Y., Rizavi, H.S., Conley, R.R., Roberts, R.C., Tamminga, C.A., Pandey, G.N., 2003. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 804–815.
- Dorđević, A., Adžić, M., Dorđević, J., Radojčić, M.B., 2010. Chronic social isolation suppresses proplastic response and promotes proapoptotic signaling in prefrontal cortex of Wistar rats. *J. Neurosci. Res.* 88, 2524–2533.
- Eaton, M.J., Staley, J.K., Globus, M.Y., Whittemore, S.R., 1995. Developmental regulation of early serotonergic neuronal differentiation: the role of brain-derived neurotrophic factor and membrane depolarization. *Dev. Biol.* 170, 169–182.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2015. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for magnesium. *EFSA Journal* 13, 4186.
- Eisch, A.J., Bolaños, C.A., de Wit, J., Simonak, R.D., Pudiak, C.M., Barrot, M., Verhaagen, J., Nestler, E.J., 2003. Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol. Psychiatry* 54, 994–1005.
- Eisch, A.J., Petrik, D., 2012. Depression and Hippocampal Neurogenesis: A Road to Remission? *Science* 338, 72–75.
- Elin, R.J., 1994. Magnesium: the fifth but forgotten electrolyte. *Am. J. Clin. Pathol.* 102, 616-622.
- Entringer, S., Kumsta, R., Hellhammer, D.H., Wadhwa, P.D., Wüst, S., 2009. Prenatal exposure to maternal psychosocial stress and HPA axis regulation in young adults. *Horm. Behav.* 55, 292–298.
- Falchuk, K.H., Mathews, J. M., Doloff, C., 1977. Effect of acute disease and ACTH on serum zinc proteins. *N. Engl. J. Med.* 296, 1129-1134.
- Farbehi, N., Patrick, R., Dorison, A., Xaymardan, M., Janbandhu, V., Wystub-Lis, K., Ho, J.W., Nordon, R.E., Harvey, R.P., 2019. Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury. *eLife* 8, e43882.
- Fatin, M.F., Ruslinda, A.R., Md Arshad, M.K., Tee, K.K., Ayub, R.M., Hashim, U., Kamarulzaman, A., Gopinath, S.C.B., 2016. HIV-1 Tat biosensor: current development and trends for early detection strategies. *Biosens. Bioelectron.* 78, 358-366.
- Fawcett, W.J., Haxby, E.J., Male, D.A., 1999. Magnesium: physiology and pharmacology. *Br. J. Anaesth.* 83, 302-320.
- Feng, N., Huke, S., Zhu, G., Tocchetti, C.G., Shi, S., Aiba, T., Kaludercic, N., Hoover, D.B., Beck, S.E., Mankowski, J.L., Tomaselli, G.F., Bers, D.M., Kass, D.A., Paolocci, N., 2015. Constitutive

BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, 1880–1885.

Ferland, C.L., Schrader, L.A., 2011. Cage mate separation in pair-housed male rats evokes and acute stress corticosterone response. *Neurosci. Lett.* 489, 154–158.

Ferrari, A.J., Charlson, F.J., Norman, R.E., Patten, S.B., Freedman, G., Murray, C.J., Vos, T., Whiteford, H.A., 2013. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study. *PLoS Med.* 10, e1001547.

Ferrari, R., Albertini, A., Curello, S., Ceconi, C., Di Lisa, F., Raddino, R., Visioli, O., 1986. Myocardial recovery during post-ischaemic reperfusion: effects of nifedipine, calcium and magnesium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 18, 487–498.

Ferreira, J.G., Cruz, C., Vinson, G.P., Pignatelli, D., 2004. ACTH modulates ERK phosphorylation in the adrenal gland in a time-dependent manner. *Endocr. Res.* 30, 661-666.

Finckenberg, P., Merasto, S., Louhelainen, M., Lindgren, L., Vapaatalo, H., Müller, D.N., Luft, F.C., Mervaala, E.M., 2005. Magnesium supplementation prevents angiotensin II-induced myocardial damage and CTGF overexpression. *J. Hypertens.* 23, 375-380.

Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., Carmeliet, P., 2009. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev. Cell* 16, 167-179.

Füchsl, A.M., Uschold-Schmidt, N., Reber, S.O., 2013a. Chronic psychosocial stress in male mice causes an up-regulation of scavenger receptor class B type 1 protein in the adrenal glands. *Stress* 16, 461–468.

Gabisonia, K., Prodocimo, G., Aquaro, G.D., Carlucci, L., Zentilin, L., Secco, I., Ali, H., Braga, L., Gorgodze, N., Bernini, F., Burchielli, S., Collesi, C., Zandonà, L., Sinagra, G., Piacenti, M., Zacchigna, S., Bussani, R., Recchia, F.A., Giacca, M., 2019. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature* 569, 418–422.

Garcia, L.S., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Barbosa, L.M., Andreazza, A.C., Stertz, L., Fries, G.R., Gavioli, E.C., Kapczinski, F., Quevedo, J., 2008. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 140-144.

Garza, J.C., Guo, M., Zhang, W., Lu, X.Y., 2012. Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3 β /catenin signaling. *Mol. Psychiatry* 17, 790–808.

Gebara, E., Sultan, S., Kocher-Braissant, J., Toni, N., 2013. Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging. *Front. Neurosci.* 7, 145.

Gold, P., Chrousos, G., 1999. The endocrinology of melancholic and atypical depression: relation to neurocircuitry and somatic consequences. *Proc. Assoc. Am. Phys* 111, 22–34.

Gold, P.W., 2015. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Mol. Psych.* 20, 32-47.

- Gold, P.W., Chrousos, G.P., 2002. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol. Psychiatry* 7, 254–275.
- Gold, P.W., Goodwin, F.K., Chrousos, G.P., 1988. Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress (2). *N. Engl. J. Med.* 319: 413–420.
- Gold, P.W., Wong, M.L., Chrousos, G.P., Licinio, J., 1996. Stress system abnormalities in melancholic and atypical depression: molecular, pathophysiological, and therapeutic implications. *Mol. Psychiatry* 1, 257–264.
- Goldstein, D.S. 2003. Catecholamines and stress. *Endocr. Regul.* 37, 69-80.
- Goldstein, D.S., 2010. Adrenal responses to stress. *Cell Mol. Neurobiol.* 30, 1433-1440.
- Gong, Y., Tong, L., Yang, R., Hu, W., Xu, X., Wang, W., Wang, P., Lu, X., Gao, M., Wu, Y., Xu, X., Zhang, Y., Chen, Z., Huang, C., 2018. Dynamic changes in hippocampal microglia contribute to depressive-like behavior induced by early social isolation. *Neuropharmacology* 135, 223-233.
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A., Fuchs, E., 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 17, 2492–2498.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, G., Fuchs, E., 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3168–3171.
- Gourley, S.L., Taylor, J.R., 2009. Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 9: Unit 9.32.
- Grippe, A.J., Carter, C.S., McNeal, N., Chandler, D.L., Larocca, M.A., Bates, S.L., Porges, S.W., 2011. 24-hour autonomic dysfunction and depressive behaviors in an animal model of social isolation: implications for the study of depression and cardiovascular disease. *Psychosom. Med.* 73, 59-66.
- Grippe, A.J., Gerena, D., Huang, J., Kumar, N., Shah, M., Ughreja, R., Carter, C.S., 2007. Social isolation induces behavioral and neuroendocrine disturbances relevant to depression in female and male prairie voles. *Psychoneuroendocrinology* 32, 966-980.
- Grippe, A.J., Wu, K.D., Hassan, I., Carter, C.S., 2008. Social isolation in prairie voles induces behaviors relevant to negative affect: toward the development of a rodent model focused on co-occurring depression and anxiety. *Depress. Anxiety* 25, E17-E26.
- Gröber, U., Schmidt, J., Kisters, K., 2015. Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients* 7, 8199-8226.
- Grutzmacher, C., Park, S., Elmergreen, T.L., Tang, Y., Scheef, E.A., Sheibani, N., Sorenson, C.M., 2010. Opposing effects of bim and bcl-2 on lung endothelial cell migration. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 299, L607–L620.
- Haack, D., Engel, R., Vecsei, P., 1978. The effect of chronic ACTH treatment on blood pressure and urinary excretion of steroids in the rat. *Klin. Wochenschr.* 56 (Suppl 1), 183–186.

- Haj-Mirzaian, A., Amiri, S., Kordjazy, N., Rahimi-Balaei, M., Haj-Mirzaian, A., Marzban, H., Aminzadeh, A., Dehpour, A.R., Mehr, S.E., 2015. Blockade of NMDA receptors reverses the depressant, but not anxiogenic effect of adolescence social isolation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 750, 160-166.
- Hanson, N.D., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 2011. Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal. *Neuropsychopharmacology* 36, 2589–2602.
- Hashmi, S., Ahmad, H.R., 2019. Molecular switch model for cardiomyocyte proliferation. *Cell Regen.* 8, 12-20.
- Hawkley, L.C., Cole, S.W., Capitanio, J.P., Norman, G.J., Cacioppo, J.T., 2012. Effects of social isolation on glucocorticoid regulation in social mammals. *Horm. Behav.* 62, 314-323.
- He, L., Zhou, B., 2017. Cardiomyocyte proliferation: remove brakes and push accelerators. *Cell Res.* 27, 959-960.
- Heckers, S., Stone, D., Walsh, J., Shick, J., Koul, P., Benes, F.M., 2002. Differential hippocampal expression of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 messenger RNA in bipolar disorder and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 59, 521-529.
- Heim, C., Shugart, M., Craighead, W.E., Nemeroff, C.B., 2010. Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect. *Dev. Psychobiol.* 52, 671–690.
- Heine, V.M., Maslam, S., Joels, M., Lucassen, P.J., 2004. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol. Aging* 25, 361–375.
- Herman, J.P., McKlveen, J.M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., Myers, B., 2016. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr. Physiol.* 6, 603-621.
- Hermes, G.L., Rosenthal, L., Montag, A., McClintock, M.K. 2006. Social isolation and the inflammatory response: Sex differences in the enduring effects of a prior stressor. *Am. J. Physiol. Regulat. Integrat. Comparat. Physiol.* 290, R273–R282.
- Heuser, I., Yassouridis, A., Holsboer, F., 1994. The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J. Psychiatr. Res.* 28, 341–356.
- Huang, J.H., Lu, Y.F., Cheng, F.C., Lee, J.N., Tsai, L.C., 2012. Correlation of magnesium intake with metabolic parameters, depression and physical activity in elderly type 2 diabetes patients: a cross-sectional study. *Nutr. J.* 11, 41.
- Huang, Y., Huang, X., Zhang, L., Han, F., Pang, K.L., Li, X., Shen, J.Y., 2018. Magnesium boosts the memory restorative effect of environmental enrichment in Alzheimer’s disease mice. *CNS Neurosci. Ther.* 24, 70-79.
- Huang, Y.Z., Pan, E., Xiong, Z.Q., McNamara, J.O., 2008. Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron* 57, 546–558.
- Inoue, N., 2014. Stress and atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Atheroscler. Thromb.* 21, 391-401.

- Job, E., Steptoe, A., 2019. Cardiovascular disease and hair cortisol: a novel biomarker of chronic stress. *Curr. Cardiol. Rep.* 21, 116.
- Isingrini, E., Surget, A., Belzung, C., Freslon, J.L., Frisbee, J., O'Donnell, J., Camus, V., d'Audiffret, A., 2011. Altered aortic vascular reactivity in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice: UCMS causes relaxation impairment to ACh. *Physiol. Behav.* 103, 540-546.
- Israel, B.A., Sherman F.S., Guthrie, R.D., 1993. Hypertrophic cardiomyopathy associated with dexamethasone therapy for chronic lung disease in preterm infants. *Am. J. Perinatol.* 10, 307-310.
- Jacka, F.N., Overland, S., Stewart, R., Tell, G.S., Bjelland, I., Mykletun, A., 2009. Association between magnesium intake and depression and anxiety in community-dwelling adults: the Hordaland Health Study, Aust. N. Z. J. Psychiatry 43, 45–52.
- Jedema, H.P., Grace, A.A., 2004. Corticotropin-releasing hormone directly activates noradrenergic neurons of the locus ceruleus recorded *in vitro*. *J. Neurosci.* 24, 9703–9713.
- Jedema, H.P., Sved, A.F., Zigmond, M.J., Finlay, J.M., 1999. Sensitization of norepinephrine release in medial prefrontal cortex: effect of different chronic stress protocols. *Brain. Res.* 830, 211-217.
- Jee, D., Lee, D., Yun, S., Lee, C., 2009. Magnesium sulphate attenuates arterial pressure increase during laparoscopic cholecystectomy. *Br. J. Anaesth.* 103, 484-489.
- Jia, Y., Liu, L., Sheng, C., Cheng, Z., Cui, L., Li, M., Zhao, Y., Shi, T., Yau, T.O., Li, F., Chen, L., 2019. Increased serum levels of cortisol and inflammatory cytokines in people with depression. *J. Nerv. Ment. Dis.* 207, 271-276.
- Kabia, F.M., Rhebergen, D., van Exel, E., Stek, M.L., Comijs, H.C., 2016. The predictive value of cortisol levels on 2-year course of depression in older persons. *Psychoneuroendocrinology* 63, 320-326.
- Kajstura, J., Leri, A., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C.A., Anversa, P., 1998. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 8801-8805.
- Kalkman, H.O., Loetscher, E., 2003. GAD(67): the link between the GABA-deficit hypothesis and the dopaminergic- and glutamatergic theories of psychosis. *J. Neural. Transm. (Vienna)* 110, 803-812.
- Karakikes, I., Ameen, M., Termglinchan, V., Wu, J.C., 2015. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ. Res.* 117, 80–88.
- Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., Aubry, J.M., 2002a. Decreased serum brain derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res.* 109, 143–148.
- Karege, F., Schwald, M., Cisse, M., 2002b. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci. Lett.* 328, 261e4.

Karege, F., Vaudan, G., Schwald, M., Perroud, N., La Harpe, R., 2005. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 136, 29–37.

Kehat, I., Davis, J., Tiburcy, M., Accornero, F., Saba-El-Leil, M.K., Maillet, M., York, A.J., Lorenz, J.N., Zimmermann, W.H., Meloche, S., Molkenkin, J.D., 2011. Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ. Res.* 108, 176–183.

Kermani, P., Hempstead, B., 2019. BDNF actions in the cardiovascular system: roles in development, adulthood and response to injury. *Front. Physiol.* 10, 455.

Kim, J., Farchione, T., Potter, A., Chen, Q., Temple, R., 2019. Esketamine for Treatment-Resistant Depression - First FDA-Approved Antidepressant in a New Class. *N. Engl. J. Med.* 381, 1-4.

King, D.E., Mainous, A.G. 3rd, Geesey, M.E., Woolson, R.F., 2005. Dietary magnesium and C-reactive protein levels. *J. Am. Coll. Nutr.* 24, 166–171.

Kitamura, Y., Akiyama, K., Kitagawa, K., Shibata, K., Kawasaki, H., Suemaru, K., Araki, H., Sendo, T., Gomita, Y., 2008a. 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., 2002a. 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., Araki, H., Suemaru, K., Gomita, Y., 2002b. Effects of imipramine and lithium on wet-dog shakes mediated by the 5-HT_{2A} receptor in ACTH-treated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 397–402.

Kitamura, Y., Fujitani, Y., Kitagawa, K., Miyazaki, T., Sagara, H., Kawasaki, H., Shibata, K., Sendo, T., Gomita, Y., 2008b. Effects of imipramine and bupropion on the duration of immobility of ACTH-treated rats in the forced swim test: involvement of the expression of 5-HT_{2A} receptor mRNA. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 246–249.

Kitamura, Y., Shibata, K., Akiyama, K., Kimoto, S., Fujitani, Y., Kitagawa, K., Kanzaki, H., Ouchida, M., Shimizu, K., Kawasaki, H., Sendo, T., Gomita, Y., 2008c. Increased DOI-induced wet-dog shakes in adrenocorticotrophic hormone-treated rats are not affected by chronic imipramine treatment: possible involvement of enhanced 5-HT_{2A}-receptor expression in the frontal cortex. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 100–106.

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-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 382, 151–158.

Kivimäki, M., Steptoe, A., 2018. Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 215–229.

- Klein, A.B., Williamson, R., Santini, M.A., Clemmensen, C., Ettrup, A., Rios, M., Knudsen, G.M., Aznar, S., 2011. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Neuropsychopharmacol* 14, 347-353.
- Kobayashi, Y., Segi-Nishida, E., 2019. Search for factors contributing to resistance to the electroconvulsive seizure treatment model using adrenocorticotrophic hormone-treated mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 186, 172767.
- Kolte, D., Vijayaraghavan, K., Khera, S., Sica, D.A., Frishman, W.H., 2014. Role of magnesium in cardiovascular diseases. *Cardiol. Rev.* 22, 182–192.
- Komaki, F., Akiyama, T., Yamazaki, T., Kitagawa, H., Nosaka, S., Shirai, M., 2013. Effects of intravenous magnesium infusion on *in vivo* release of acetylcholine and catecholamine in rat adrenal medulla. *Auton. Neurosci.* 177, 123-128.
- Krishnan, V., Nestler, E.J., 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894–902.
- Kulkarni, S.K., Dhir, A., 2007. Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 31, 1248-1254.
- Kumar, B.P., Shivakumar, K., 1997. Depressed antioxidant defense in rat heart in experimental magnesium deficiency: implication for the pathogenesis of myocardial lesions. *Biol. Trace Elem. Res.* 60, 139–144.
- Kumar, B.P., Shivakumar, K., Kartha, C.C., 1997. Magnesium deficiency-related changes in lipid peroxidation and collagen metabolism *in vivo* in rat heart. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 129–134.
- Kumaran, C., Shivakumar, K., 2001. Superoxide-mediated activation of cardiac fibroblasts by serum factors in hypomagnesemia. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 882-886.
- La Mear, N.S., MacGilvray, S.S., Myers, T.F., 1997. Dexamethasone-induced myocardial hypertrophy in neonatal rats. *Biol. Neonate* 72, 175–180.
- Laaris, N., Haj-dahmane, S., Hamon, M., Lanfumey, L., 1995. Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT_{1A} autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 34, 1201–1210.
- Lang, D., Mühler, E., Kupferschmid, C., Tacke, E., von Bernuth, G., 1984. Cardiac hypertrophy secondary to ACTH treatment in children. *Eur. J. Pediatr.* 142, 121-125.
- Lapidus, K.A., Levitch, C.F., Perez, A.M., Brallier, J.W., Parides, M.K., Soleimani, L., Feder, A., Iosifescu, D.V., Charney, D.S., Murrough, J.W., 2014. A randomized controlled trial of intranasal ketamine in major depressive disorder. *Biol. Psychiatry* 76, 970–976.
- Latif, N., Khan, M.A., Birks, E., O'Farrell, A., Westbrook, J., Dunn, M.J., Yacoub, M.H., 2000. Upregulation of the Bcl-2 family of proteins in end stage heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 1769–1777.
- Lauschke, V.M., Vorrink, S.U., Moro, S.M., Rezayee, F., Nordling, Å., Hendriks, D.F., Bell, C.C., Sison-Young, R., Park, B.K., Goldring, C.E., Ellis, E., Johansson, I., Mkrtchian, S., Andersson, T.B., Ingelman-Sundberg, M., 2016. Massive rearrangements of cellular microRNA signatures are key drivers of hepatocyte dedifferentiation. *Hepatology* 64, 1743–1756.

- Lee, R.S., Tamashiro, K.L.K., Yang, X., Purcell, R.H., Harvey, A., Willour, V.L., Huo, Y., Rongione, M., Wand, G.S., Potash, J.B., 2010. Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinol.* 151, 4332–4343.
- Leibowitz, S.F., Diaz, S., Tempel, D., 1989. Norepinephrine in the paraventricular nucleus stimulates corticosterone release. *Brain Res.* 496, 219–227.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., Abrous, D.N., 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11032–11037.
- Lener, M.S., Niciu, M.J., Ballard, E.D., Park, M., Park, L.T., Nugent, A., Zarate, Jr. C.A., 2017. Glutamate and GABA Systems in the Pathophysiology of Major Depression and Antidepressant Response to Ketamine. *Biol. Psychiatry* 81, 886–897.
- Li, Y., Hu, S., Ma, G., Yao, Y., Yan, G., Chen, J., Li, Y., Zhang, Z., 2013. Acute myocardial infarction induced functional cardiomyocytes to re-enter the cell cycle. *Am. J. Transl. Res.* 5, 327–335.
- 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.
- LiCausi, F., Hartman, N.W., 2018. Role of mTOR Complexes in Neurogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1544.
- Liebscher, D.H., Liebscher, D.E., 2004. About the misdiagnosis of magnesium deficiency. *J. Am. Coll. Nutr.* 23, 730S–1.
- Lightman, S.L., 2008. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J. Neuroendocrinol.* 20, 880–884.
- Liu, C.H., Tan, Y.Z., Li, D.D., Tang, S.S., Wen, X.A., Long, Y., Sun, H.B., Hong, H., Hu, M., 2020. Zileuton ameliorates depressive-like behaviors, hippocampal neuroinflammation, apoptosis and synapse dysfunction in mice exposed to chronic mild stress. *Int. Immunopharmacol.* 78, 105947.
- Liu, M., Jeong, E.M., Liu, H., Xie, A., So, E.Y., Shi, G., Jeong, G.E., Zhou, A., Dudley, S.C. Jr., 2019. Magnesium supplementation improves diabetic mitochondrial and cardiac diastolic function. *JCI Insight* 4, e123182.
- Lok, A., Mocking, R.J.T., Ruhé, H.G., Visser, I., Koeter, M.W.J., Assies, J., Bockting, C.L.H., Olf, M., Schene, A.H., 2012. Longitudinal hypothalamic–pituitary–adrenal axis trait and state effects in recurrent depression. *Psychoneuroendocrinology* 37, 892–902.
- López-León, S., Janssens, A.C., González-Zuloeta Ladd, A.M., Del-Favero, J., Claes, S.J., Oostra, B.A., van Duijn, C.M., 2008. Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* 13, 772–785.

- Lorenz, J.N., Loreaux, E.L., Dostanic-Larson, I., Lasko, V., Schnetzer, J.R., Paul, R.J., Lingrel, J.B., 2008. ACTH-induced hypertension is dependent on the ouabain-binding site of the α_2 -Na⁺-K⁺-ATPase subunit. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H273-H280.
- Lozoff, B., Jimenez, E., Hagen, J., Mollen, E., Wolf, A.W., 2000. Poorer behavioral and developmental outcome more than 10 years after treatment for iron deficiency in infancy. *Pediatrics* 105, E51.
- Lu, L., Bao, G., Chen, H., Xia, P., Fan, X., Zhang, J., Pei, G., Ma, L., 2003. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp. Neurol.* 183, 600–609.
- Lucassen, P.J., Stumpel, M.W., Wang, Q., Aronica, E., 2010. Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. *Neuropharmacology* 58, 940–949.
- Lundberg, A.K., Jönsson, S., Stenmark, J., Kristenson, M., Jonasson, L., 2016. Stress-induced release of matrix metalloproteinase-9 in patients with coronary artery disease: The possible influence of cortisol. *Psychoneuroendocrinology* 73, 117-124.
- Maccari, S., Piazza, P., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H., Le Moal, M., 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J. Neurosci.* 15, 110–116.
- Maes, M., Vandoolaeghe, E., Neels, H., Demedts, P., Wauters, A., Meltzer, H.Y., Altamura, C., 1997. Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune/inflammatory response in that illness. *Biol. Psychiatry* 42, 349–358.
- Mahase, E., 2019. Esketamine is approved in Europe for treating resistant major depressive disorder. *BMJ.* 367, 17069.
- Mak, I.T., Chmielinska, J.J., Kramer, J.H., Weglicki, W.B., 2009. AZT-induced oxidative cardiovascular toxicity: attenuation by Mg supplementation. *Cardiovasc. Toxicol.* 9, 78 –85.
- Mak, I.T., Kramer, J.H., Chen, X., Chmielinska, J.J., Spurney, C.F., Weglicki, W.B., 2013. Mg supplementation attenuates ritonavir-induced hyperlipidemia, oxidative stress, and cardiac dysfunction in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R1102-R1111.
- Malberg, J., Duman, R.S., 2003. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: Reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28, 1562–1571.
- Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 20, 9104–9110.
- Mamounas, L.A., Blue, M.E., Siuciak, J.A., Altar, C.A., 1995. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J. Neurosci.* 15, 7929–7939.
- 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.
- Mannan, M., Mamun, A., Doi, S., Clavarino, A., 2016. Prospective associations between depression and obesity for adolescent males and females- a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *PLoS One.* 11, e0157240.

- Manser, W.W., Khan, M.A, Hasan, K.Z., 1989. Trace element studies on Karachi population. Part IV: blood copper, zinc, magnesium and lead levels in psychiatric patients with depression, mental retardation and seizure disorders. *J. Pak. Med. Assoc.* 39, 269–274.
- Marino, T.A., Cao, W., Lee, J., Courtney, R., 1996. Localization of proliferating cell nuclear antigen in the developing and mature rat heart cell. *Anat. Rec.* 245, 677-684.
- Marques, B.C.A.A., Klein, M.R.S.T., da Cunha, M.R., de Souza Mattos, S., de Paula Nogueira, L., de Paula, T., Corrêa, F.M., Oigman, W., Neves, M.F., 2020. Effects of Oral Magnesium Supplementation on Vascular Function: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.* 27, 19-28.
- Martin-Iverson, M.T., Todd, K.G., Altar, C.A., 1994. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors: Interactions with amphetamine. *J. Neurosci.* 14, 1262–1270.
- Maserejian, N.N., Hall, S.A., McKinlay, J.B., 2012. Low dietary or supplemental zinc is associated with depression symptoms among women, but not men, in a population-based epidemiological survey. *J. Affect. Disord.* 136, 781–788.
- Matrone, G., Tucker, C.S., Denvir, M.A., 2017. Cardiomyocyte proliferation in zebrafish and mammals: lessons for human disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 1367-1378.
- Matsusaka, T., Hasebe, N., Jin, Y.T., Kawabe, J., Kikuchi, K., 2002. Magnesium reduces myocardial infarct size via enhancement of adenosine mechanism in rabbits. *Cardiovasc. Res.* 54, 568-575.
- Mazur, A., Maier, J.A., Rock, E., Gueux, E., Nowacki, W., Rayssiguier, Y., 2007. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Arch. Biochem. Biophys.* 458, 48-56.
- McCarty, R., Horwatt, K., Konarska, M., 1988. Chronic stress and sympathetic-adrenal medullary responsiveness. *Soc. Sci. Med.* 26, 333-341.
- McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., Turecki, G., Meaney, M.J., 2009. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat. Neurosci.* 12, 342–348.
- Meckert, P.C., Rivello, H.G., Vigliano, C., González, P., Favaloro, R., Laguens, R., 2005. Endomitosis and polyploidization of myocardial cells in the periphery of human acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 67, 116-123.
- Meerlo, P., Sgoifo, A., De Boer, S.F., Koolhaas, J.M., 1999. Long-lasting consequences of a social conflict in rats: behavior during the interaction predicts subsequent changes in daily rhythms of heart rate, temperature, and activity. *Behav. Neurosci.* 113, 1283–1290.
- Meis, S., Endres, T., Lessmann, V., 2012. Postsynaptic BDNF signalling regulates long-term potentiation at thalamo-amygdala afferents. *J. Physiol.* 590, 193–208.

- Micheli, L., Ceccarelli, M., D'Andrea, G., Tirone, F., 2018. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res. Bull.* 143, 181-193.
- Micheli, L., Ceccarelli, M., Gioia, R., D'Andrea, G., Farioli-Vecchioli, S., Costanzi, M., Sarulli, D., Cestari, V., Tirone, F., 2017. Terminal differentiation of adult hippocampal progenitor cells is a step functionally dissociable from proliferation and is controlled by Tis21, Id3 and NeuroD2. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 186.
- Milaneschi, Y., Simmons, W.K., van Rossum, E.F.C., Penninx, B.W., 2019. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. *Mol. Psychiatry.* 24, 18-33.
- Mineur, Y.S., Belzung, C., Crusio, W.E., 2007. Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience* 150, 251–259.
- Młyniec, K., Davies, C.L., de Agüero Sánchez, I.G., Pytka, K., Budziszewska, B., Nowak, G., 2014. Essential elements in depression and anxiety. Part I. *Pharmacol. Rep.* 66, 534-544.
- Młyniec, K., Gawęł, M., Doboszewska, U., Starowicz, G., Pytka, K., Davies, C.L., Budziszewska, B., 2015. Essential elements in depression and anxiety. Part II. *Pharmacol. Rep.* 67, 187-194.
- Młyniec, K., Nowak, G., 2012. Zinc deficiency induces behavioral alterations in the tail suspension test in mice. Effect of antidepressants. *Pharmacol. Rep.* 64, 249-255.
- Mojtahedzadeh, M., Chelkeba, L., Ranjvar-Shahrivar, M., Najafi, A., Moini, M., Najmeddin, F., Sadeghi, K., Barkhordari, K., Gheymati, A., Ahmadi, A., 2016. Randomized trial of the effect of magnesium sulfate continuous infusion on IL-6 and CRP serum levels following abdominal aortic aneurysm surgery. *Iran. J. Pharm. Res.* 15, 951-956.
- Moller Jensen, B., Klaaborg, K.E., Alstrup, P., Arendrup, H., Klitgaard, N.A., Pedersen, K.E., 1991. Magnesium content of the human heart. *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 25, 155-158.
- Mollova, M., Bersell, K., Walsh, S., Savla, J., Das, L.T., Park, S.Y., Silberstein, L.E., Dos Remedios, C.G., Graham, D., Colan, S., Kühn, B., 2013. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 1446–1451.
- Morgan, C.J., Curran, H.V.; Independent Scientific Committee on Drugs., 2012. Ketamine use: a review. *Addiction* 107, 27–38.
- Morgan, C.J., Muetzelfeldt, L., Curran, H.V., 2010. Consequences of chronic ketamine self-administration upon neurocognitive function and psychological wellbeing: a 1-year longitudinal study. *Addiction* 105, 121–133.
- Moslehi, N., Vafa, M., Rahimi-Foroushani, A., Golestan, B., 2012. Effects of oral magnesium supplementation on inflammatory markers in middle-aged overweight women. *J. Res. Med. Sci.* 17, 607-614.
- Mountjoy, K.G., Jenny Wu, C.S., Dumont, L.M., Wild, J.M., 2003. Melanocortin-4 receptor messenger ribonucleic acid expression in rat cardiorespiratory, musculoskeletal, and integumentary systems. *Endocrinology* 144, 5488-5496.

- Mubagwa, K., Gwanyanya, A., Zakharov, S., Macianskiene, R., 2007. Regulation of cation channels in cardiac and smooth muscle cells by intracellular magnesium. *Arch. Biochem. Biophys.* 458, 73–89.
- Murasato, Y., Harada, Y., Ikeda, M., Nakashima, Y., Hayashida, Y., 1999. Effect of magnesium deficiency on autonomic circulatory regulation in conscious rats. *Hypertension* 34, 247–252.
- Murck, H., 2002. Magnesium and affective disorders. *Nutr. Neurosci.* 5, 375–389.
- Muroyama, A., Inaka, M., Matsushima, H., Sugino, H., Marunaka, Y., Mitsumoto, Y., 2009. Enhanced susceptibility to MPTP neurotoxicity in magnesium-deficient C57BL/6N mice. *Neurosci. Res.* 63, 72–75.
- Murray, F., Smith, D.W., Hutson, P.H., 2008. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 115–127.
- Murrough, J.W., Iosifescu, D.V., Chang, L.C., Al Jurdi, R.K., Green, C.E., Perez, A.M., Iqbal, S., Pillemer, S., Foulkes, A., Shah, A., Charney, D.S., Mathew, S.J., 2013. Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. *Am. J. Psychiatry* 170, 1134–1142.
- Nadler, J.L., Rude, R.K., 1995. Disorders of magnesium metabolism. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 24, 623–641.
- Nakada, Y., Canseco, D.C., Thet, S., Abdisalaam, S., Asaithamby, A., Santos, C.X., Shah, A.M., Zhang, H., Faber, J.E., Kinter, M.T., Szweda, L.I., Xing, C., Hu, Z., Deberardinis, R.J., Schiattarella, G., Hill, J.A., Oz, O., Lu, Z., Zhang, C.C., Kimura, W., Sadek, H.A., 2017. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature* 541, 222–227.
- Narang, R.L., Gupta, K.R., Narang, A.P., Singh, R., 1991. Levels of copper and zinc in depression. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 35, 272–274.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., 2002. Neurobiology of depression. *Neuron* 34, 13–25.
- Nibuya, M., Morinobu, S., Duman, R.S., 1995. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci.* 15, 7539–7547.
- Nibuya, M., Takahashi, M., Russel, D.S., Duman, R.S., 1999. Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 267, 81–84.
- Nikkheslat, N., Zunszain, P.A., Horowitz, M.A., Barbosa, I.G., Parker, J.A., Myint, A.M., Schwarz, M.J., Tylee, A.T., Carvalho, L.A., Pariante, C.M., 2015. Insufficient glucocorticoid signaling and elevated inflammation in coronary heart disease patients with comorbid depression. *Brain Behav. Immun.* 48, 8–18.
- Nosyreva, E., Szabla, K., Autry, A.E., Ryazanov, A.G., Monteggia, L.M., Kavalali, E.T., 2013. Acute suppression of spontaneous neurotransmission drives synaptic potentiation. *J. Neurosci.* 33, 6990–7002.

- Novoselova, T.V., Chan, L.F., Clark, A.J.L., 2018. Pathophysiology of melanocortin receptors and their accessory proteins. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 32, 93–106.
- Novoselova, T.V., King, P.J., Guasti, L., Metherell, L.A., Clark, A.J.L., Chan, L.F., 2019. ACTH signalling and adrenal development: lessons from mouse models. *Endocr. Connect.* 8, R122-R130.
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A., 2015. Glucocorticoid signaling in the heart: A cardiomyocyte perspective. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 153, 27-34.
- Oldehinkel, A.J., van den Berg, M.D., Flentge, F., Bouhuys, A.L., ter Horst, G.J., Ormel, J., 2001. Urinary free cortisol excretion in elderly persons with minor and major depression. *Psychiatry Res.* 104, 39–47.
- Omori, Y., Mano, T., Ohtani, T., Sakata, Y., Takeda, Y., Tamaki, S., Tsukamoto, Y., Miwa, T., Yamamoto, K., Komuro, I., 2014. Glucocorticoids induce cardiac fibrosis via mineralocorticoid receptor in oxidative stress: contribution of elongation factor eleven-nineteen lysine-rich leukemia (ELL). *Yonago Acta Med.* 57, 109-116.
- Oosterhof, C.A., El Mansari, M., Merali, Z., Blier, P., 2016. Altered monoamine system activities after prenatal and adult stress: A role for stress resilience? *Brain Res.* 1642, 409-418.
- Otte, C., Neylan, T.C., Pipkin, S.S., Browner, W.S., Whooley, M.A., 2005. Depressive symptoms and 24-hour urinary norepinephrine excretion levels in patients with coronary disease: Findings from the heart and soul study. *Am. J. Psychiatry* 162, 2139–2145.
- Pace, T.W., Hu, F., Miller, A.H., 2007. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav. Immun.* 21, 9–19.
- Page, M.E., Abercrombie, E.D., 1999. Discrete local application of corticotropin-releasing factor increases locus coeruleus discharge and extracellular norepinephrine in rat hippocampus. *Synapse* 33, 304–313.
- Pandit, S.K., Westendorp, B., de Bruin, A., 2013. Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* 23, 556-566.
- Peng, S., Li, W., Lv, L., Zhang, Z., Zhan, X., 2018. BDNF as a biomarker in diagnosis and evaluation of treatment for schizophrenia and depression. *Discov. Med.* 26, 127-136.
- Perera, T.D., Dwork, A.J., Keegan, K.A., Thirumangalakudi, L., Lipira, C.M., Joyce, N., Lange, C., Higley, J.D., Rosoklija, G., Hen, R., Sackeim, H.A., Coplan, J.D., 2011. Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. *PLoS One* 6, e17600.
- Petrik, D., Lagace, D.C., Eisch, A.J., 2012. The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology* 62, 21–34.
- Peuler, J.D., Scotti, M.A., Phelps, L.E., McNeal, N., Grippo, A.J., 2012. Chronic social isolation in the prairie vole induces endothelial dysfunction: implications for depression and cardiovascular disease. *Physiol. Behav.* 106, 476-484.

- Pfohl, B., Sherman, B., Schlechte, J., Winokur, G., 1985. Differences in plasma ACTH and cortisol between depressed patients and normal controls. *Biol. Psychiatry* 20, 1055-1072.
- Piccinni, A., Marazziti, D., Catena, M., Domenici, L., Del Debbio, A., Bianchi, C., Mannari, C., Martini, C., Da Pozzo, E., Schiavi, E., Mariotti, A., Roncaglia, I., Palla, A., Consoli, G., Giovannini, L., Massimetti, G., Dell'Osso, L., 2008. Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. *J. Affect. Disord.* 105, 279–283.
- Pochwat, B., Szewczyk, B., Sowa-Kucma, M., Siwek, A., Doboszewska, U., Piekoszewski, W., Gruca, P., Papp, M., Nowak, G., 2014. Antidepressant-like activity of magnesium in the chronic mild stress model in rats: alterations in the NMDA receptor subunits. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 393–405.
- Poleszak, E., 2007a. Modulation of antidepressant-like activity of magnesium by serotonergic system. *J. Neural. Transm. (Vienna)* 114, 1129-1134.
- Poleszak, E., 2008. Benzodiazepine/GABAA receptors are involved in magnesium-induced anxiolytic-like behavior in mice. *Pharmacol. Rep.* 60, 483-489.
- Poleszak, E., Szewczyk, B., Kedzierska, E., Wlaź, P., Pilc, A., Nowak, G., 2004. Antidepressant- and anxiolytic-like activity of magnesium in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 7–12.
- Poleszak, E., Szewczyk, B., Wlaź, A., Fidecka, S., Wlaź, P., Pilc, A., Nowak, G., 2008c. D-serine, a selective glycine/N-methyl-D-aspartate receptor agonist, antagonizes the antidepressant-like effects of magnesium and zinc in mice. *Pharmacol. Rep.* 60, 996-1000.
- Poleszak, E., Wlaź, P., Kedzierska, E., Nieoczym, D., Wróbel, A., Fidecka, S., Pilc, A., Nowak, G., 2007b. NMDA/glutamate mechanism of antidepressant-like action of magnesium in forced swim test in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 158–164.
- Poleszak, E., Wlaź, P., Szewczyk, B., Kedzierska, E., Wyska, E., Librowski, T., Szymura-Oleksiak, J., Fidecka, S., Pilc, A., Nowak, G., 2005b. Enhancement of antidepressant-like activity by joint administration of imipramine and magnesium in the forced swim test: behavioral and pharmacokinetic studies in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 524–529.
- Poleszak, E., Wlaź, P., Wróbel, A., Fidecka, S., Nowak, G., 2008b. NMDA/glutamate mechanism of magnesium induced anxiolytic-like behavior in mice. *Pharmacol. Rep.* 60, 655-663.
- Poleszak, E., Wlaź, P., Kedzierska, E., Radziwon-Zaleska, M., Pilc, A., Fidecka, S., Nowak, G., 2005. Effects of acute and chronic treatment with magnesium in the forced swim test in rats. *Pharmacol. Rep.* 57, 654–658.
- Polonchuk, L., Chabria, M., Badi, L., Hoflack, J.C., Figtree, G., Davies, M.J., Gentile, C., 2017. Cardiac spheroids as promising *in vitro* models to study the human heart microenvironment. *Sci. Rep.* 7, 7005.
- Popović, D., Damjanović, S., Djordjević, T., Martić, D., Ignjatović, S., Milinković, N., Banović, M., Lasica, R., Petrović, M., Guazzi, M., Arena, R., 2017. Stress hormones at rest and following exercise testing predict coronary artery disease severity and outcome. *Stress* 20, 523-531.

- Popović, D., Plećaš-Solarović, B., Pešić, V., Petrović, M., Vujisić-Tesić, B., Popović, B., Ignjatović, S., Ristić, A., Damjanović, S.S., 2014. How does stress possibly affect cardiac remodeling? *Peptides* 57, 20-30.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 379-391.
- Prohaska, J.R., Smith, T.L., 1982. Effect of dietary or genetic copper deficiency on brain catecholamines, trace metals and enzymes in mice and rats. *J. Nutr.* 112, 1706-1717.
- Rafii, S., Butler, J.M., Ding, B.S., 2016. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature* 529, 316–325.
- Rajizadeh, A., Mozaffari-Khosravi, H., Yassini-Ardakani, M., Dehghani, A., 2017. Effect of magnesium supplementation on depression status in depressed patients with magnesium deficiency: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* 35, 56–60.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., Wei, J., Dilley, G., Pittman, S.D., Meltzer, H.Y., Overholser, J.C., Roth, B.L., Stockmeier, C.A., 1999. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol. Psychiatry* 45, 1085–1098.
- Rasmusson, A., Shi, L., Duman, R.S., 2002. Down-regulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacol.* 27, 133–142.
- Razmjou, S., Litteljohn, D., Rudyk, C., Syed, S., Clarke, M., Pentz, R., Dwyer, Z., Hayley, S., 2016. The interactive effects of ketamine and magnesium upon depressive-like pathology. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 12, 2049–2056.
- Reddy, S.T., Soman, S.S., Yee, J., 2018. Magnesium balance and measurement. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 25, 224-229.
- Reed, J.C., 2008. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111, 3322-3330.
- Remy, P., Doder, M., Lees, A., Turjanski, N., Brooks, D., 2005. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain* 128, 1314-1322.
- Ren, R., Oakley, R.H., Cruz-Topete, D., Cidlowski, J.A., 2012. Dual Role for Glucocorticoids in Cardiomyocyte Hypertrophy and Apoptosis. *Endocrinology* 153, 5346-5360.
- Réus, G.Z., Abelaira, H.M., Tuon, T., Titus, S.E., Ignácio, Z.M., Rodrigues, A.L., Quevedo, J., 2016. Glutamatergic NMDA receptor as therapeutic target for depression. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 103, 169-202.
- Rice, F., Jones, I., Thapar, A., 2007. The impact of gestational stress and prenatal growth on emotional problems in offspring: a review. *Acta Psychiatr. Scand.* 115, 171–183.
- Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Elenbroek, B.A., Riva, M.A., 2002. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol. Psychiatry.* 7, 609–616.

- Rojas, P.S., Fritsch, R., Rojas, R.A., Jara, P., Fiedler, J.L., 2011. Serum brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoid receptor levels in lymphocytes as markers of antidepressant response in major depressive patients: a pilot study. *Psychiatry. Res.* 189, 239–245.
- Romero, M.L., Butler, L.K., 2007. Endocrinology of stress. *Int. J. Comp. Psychol.* 20, 89-95.
- Rubin, R.T., Phillips, J.J., Sadow, T.F., McCracken, J.T., 1995. Adrenal gland volume in major depression. Increase during the depressive episode and decrease with successful treatment. *Arch. Gen. Psychiatry.* 52, 213–218.
- Rude, R.K., 1993. Magnesium metabolism and deficiency. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 22, 377-395.
- Ruscio, M.G., Sweeny, T., Hazelton, J., Suppatkul, P., Carter, C.S., 2007. Social environment regulates corticotropin releasing factor, corticosterone and vasopressin in juvenile prairie voles. *Horm. Behav.* 51, 54–61.
- Russo-Neustadt, A.A., Beard, R.C., Huang, Y.M., Cotman, C.W., 2000. Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neuroscience* 101, 305–312.
- Ryszewska-Pokraśniewicz, B., Mach, A., Skalski, M., Januszko, P., Wawrzyniak, Z.M., Poleszak, E., Nowak, G., Pilc, A., Radziwoń-Zaleska, M., 2018. Effects of magnesium supplementation on unipolar depression: a placebo-controlled study and review of the importance of dosing and magnesium status in the therapeutic response. *Nutrients* 10, 1014.
- Ryzen, E., 1989. Magnesium homeostasis in critically ill patients. *Magnesium* 8, 201–212.
- Saaltink, D.J., Vreugdenhil, E., 2014. Stress, glucocorticoid receptors, and adult neurogenesis: a balance between excitation and inhibition? *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2499-2515.
- Saarelainen, T., Hendolin, P., Lucas, G., Koponen, E., Sairanen, M., MacDonald, E., Agerman, K., Haapasalo, A., Nawa, H., Aloyz, R., Ernfors, P., Castren, E., 2003. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J. Neurosci.* 23, 349–357.
- Sachar, E.J., Asnis, G., Nathan, R.S., Halbreich, U., Tabrizi, M.A., Halpern, F.S., 1980. Dextroamphetamine and cortisol in depression morning plasma cortisol levels suppressed. *Arch. Gen. Psychiatry* 37, 755-757.
- Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castren, M., Casren, E., 2005. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci* 25, 1089–1094.
- Salic, A., Mitchison, T.J., 2008. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2415-2420.
- Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zerouh, M., Schmack, B., Farag, M., Popov, A.F., Dohmen, P.M., Choi, Y.H., Wahlers, T., Weymann, A., 2016. Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 22, 75-79.

- Samuels, B.A., Hen, R., 2011. Neurogenesis and affective disorders. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1152–1159.
- Sanacora, G., Frye, M.A., McDonald, W., Mathew, S.J., Turner, M.S., Schatzberg, A.F., Summergrad, P., Nemeroff, C.B; American Psychiatric Association (APA) Council of Research Task Force on Novel Biomarkers and Treatments. 2017. A consensus statement on the use of ketamine in the treatment of mood disorders. *JAMA Psychiatry* 74, 399–405.
- Santana, P., Akana, S.F., Hanson, E.S., Strack, A.M., Sebastian, R.J., Dallman, M.F., 1995. Aldosterone and dexamethasone both stimulate energy acquisition whereas only the glucocorticoid alters energy storage. *Endocrinol.* 136, 2214-2222.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805– 809.
- Sapolsky, R.M., 1990. Stress in the wild. *Sci. Am.* 262, 116–123.
- Saris, N.E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J.A., Lewenstam, A., 2000. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin. Chim. Acta* 294, 1–26.
- Sartori, S.B., Whittle, N., Hetzenauer, A., Singewald, N., 2012. Magnesium deficiency induces anxiety and HPA axis dysregulation: modulation by therapeutic drug treatment. *Neuropharmacology* 62, 304-312.
- Savio, M., Stivala, L.A., Bianchi, L., Vannini, V., Prosperi, E., 1998. Involvement of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in DNA repair induced by alkylating agents and oxidative damage in human fibroblasts. *Carcinogenesis* 19, 591–596.
- Scaccianoce, S., Del Bianco, P., Paolone, G., Caprioli, D., Modafferi, M.E.A, Nencini, P., Badiani, A., 2006. Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. *Behav. Brain Res.* 168, 323-325.
- Scantlebury, M.H., Chun, K.C., Ma, S.C., Rho, J.M., Kim, D.Y., 2017. Adrenocorticotrophic hormone protects learning and memory function in epileptic *Kcna1*-null mice. *Neurosci. Lett* 645, 14-18.
- Scharfman, H.E., 1997. Hyperexcitability in combined entorhinal/hippocampal slices of adult rat after exposure to brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurophysiol.* 78, 1082-1095.
- Schimatschek, H.F., Rempis, R., 2001. Prevalence of hypomagnesemia in an unselected German population of 16,000 individuals. *Magnes. Res.* 14, 283–290.
- Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138, 32.
- Senyo, S.E., Steinhäuser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T-D., Guerquin-Kern, J-L., Lechene, C.P., Lee, R.T., 2013. Mammalian heart renewal by preexisting cardiomyocytes. *Nature* 493, 433–436.
- Serita, T., Miyahara, M., Tanimizu, T., Takahashi, S., Oishi, S., Nagayoshi, T., Tsuji, R., Inoue, H., Uehara, M., Kida, S., 2019. Dietary magnesium deficiency impairs hippocampus-dependent

memories without changes in the spine density and morphology of hippocampal neurons in mice. *Brain Res. Bull.* 144, 149-157.

Severino, P., Netti, L., Mariani, M.V., Maraone, A., D'Amato, A., Scarpati, R., Infusino, F., Pucci, M., Lavalle, C., Maestrini, V., Mancone, M., Fedele, F., 2019. Prevention of cardiovascular disease: screening for magnesium deficiency. *Cardiol. Res. Pract.* 2019, 4874921.

Sgoifo, A., Koolhaas, J.M., Musso, E., De Boer, S.F., 1999. Different sympathovagal modulation of heart rate during social and nonsocial stress episodes in wild-type rats. *Physiol. Behav* 67, 733–738.

Shah, R.R., 2005. Drugs, QT interval prolongation and ICH E14: the need to get it right. *Drug Saf.* 28, 115.

Shepard, R.D., Langlois, L.D., Browne, C.A., Berenji, A., Lucki, I., Nugent, F.S., 2018. Ketamine Reverses Lateral Habenula Neuronal Dysfunction and Behavioral Immobility in the Forced Swim Test Following Maternal Deprivation in Late Adolescent Rats. *Front. Synaptic Neurosci.* 10, 39.

Shimosawa, T., Takano, K., Ando, K., Fujita, T., 2004. Magnesium inhibits norepinephrine release by blocking N-type calcium channels at peripheral sympathetic nerve endings. *Hypertension* 44, 897-902.

Shirayama, Y., Chen, A.C., Nakagawa, S., Russell, D.S., Duman, R.S., 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci.* 22, 3251–3261.

Short, B., Fong, J., Galvez, V., Shelker, W., Loo, C.K., 2018. Side-effects associated with ketamine use in depression: a systematic review. *Lancet Psychiatry* 5, 65–78.

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.

Siuciak, J.A., Boylan, C., Fritsche, M., Altar, C.A., Lindsay, R.M., 1996. BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Res.* 710, 11–20.

Slominski, A., 2007. A nervous breakdown in the skin: stress and the epidermal barrier. *J. Clin. Invest.* 117, 3166–3169.

Slutsky, I., Abumaria, N., Wu, L.J., Huang, C., Zhang, L., Li, B., Zhao, X., Govindarajan, A., Zhao, M.G., Zhuo, M., Tonegawa, S., Liu, G., 2010. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron* 65, 165–177.

Smith, M.A., Makino, S., Kvetnansky, R., Post, R.M., 1995. Stress and Glucocorticoids Affect the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and neurotrophin-3 mRNAs in the Hippocampus. *J. Neurosci* 15, 1768 –1777.

Soonpaa, M.H., Field, L.J., 1997. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am. J. Physiol.* 272, H220–H226.

Soonpaa, M.H., Rubart, M., Field, L.J., 2013. Challenges measuring cardiomyocyte renewal. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 799-803.

Souders, C.A., Bowers, S.L.K., Baudino, T.A., 2009. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ. Res.* 105, 1164-1176.

Sowa-Kućma, M., Legutko, B., Szewczyk, B., Novak, K., Znojek, P., Poleszak, E., Papp, M., Pilc, A., Nowak, G., 2008. Antidepressant-like activity of zinc: further behavioral and molecular evidence. *Journal of Neural Transmission* 115, 1621–1628.

Sowa-Kućma, M., Szewczyk, B., Sadlik, K., Piekoszewski, W., Trela, F., Opoka, W., Poleszak, E., Pilc, A., Nowak, G., 2013. Zinc, magnesium and NMDA receptor alterations in the hippocampus of suicide victims. *J. Affect. Disord.* 151, 924-931.

Stefanovic, B., Spasojevic, N., Jovanovic, P., Dronjak, S., 2019. Melatonin treatment affects changes in adrenal gene expression of catecholamine biosynthesizing enzymes and norepinephrine transporter in the rat model of chronic stress-induced depression. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 97, 685-690.

Stephoe, A., Kivimäki, M., 2013. Stress and cardiovascular disease: an update on current knowledge. *Annu. Rev. Public Health* 34, 337-354.

Stetler, C., Miller, G.E., 2011. Depression and hypothalamic–pituitary–adrenal activation: a quantitative summary of our decades of research. *Psychosom. Med.* 73, 114–126.

Steward, C.J., Zhou, Y., Keane, G., Cook, M.D., Liu, Y., Cullen, T., 2019. One week of magnesium supplementation lowers IL-6, muscle soreness and increases post-exercise blood glucose in response to downhill running. *Eur. J. Appl. Physiol.* 119, 2617-2627.

Stimson, R.H., Anderson, A.J., Ramage, L.E., Macfarlane, D.P., de Beaux, A.C., Mole, D.J., Andrew, R., Walker, B.R., 2017. Acute physiological effects of glucocorticoids on fuel metabolism in humans are permissive but not direct. *Diabetes Obes. Metab.* 19, 883-891.

Stockmeier, C.A., Mahajan, G.J., Konick, L.C., Overholser, J.C., Jurjus, G.J., Meltzer, H.Y., Uylings, H.B., Friedman, L., Rajkowska, G., 2004. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol. Psychiatry* 56, 640–650.

Styczeń, K., Sowa-Kućma, M., Siwek, M., Dudek, D., Reczyński, W., Misztak, P., Szewczyk, B., Topór-Mądry, R., Opoka, W., Nowak, G., 2016. Study of the serum copper levels in patients with major depressive disorder. *Biol. Trace Elem. Res.* 174, 287-293.

Sugimoto, J., Romani, A.M., Valentin-Torres, A.M., Luciano, A.A., Ramirez Kitchen, C.M., Funderburg, N., Mesiano, S., Bernstein, H.B., 2012. Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. *J. Immunol.* 188, 6338-6346.

Sun, H., Guan, L., Zhu, Z., Li, H., 2013. Reduced levels of NR1 and NR2A with depression-like behavior in different brain regions in prenatally stressed juvenile offspring. *PLoS One* 8, e81775.

Sun, Q., Weinger, J.G., Mao, F., Liu, G., 2016. Regulation of structural and functional synapse density by L-threonate through modulation of intraneuronal magnesium concentration. *Neuropharmacology* 108, 426–439.

Suri, D., Vaidya, V.A., 2013. Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience* 239, 196-213.

- Szewczyk, B., Branski, P., Wieronska, J.M., Palucha, A., Pilc, A., Nowak, G., 2002. Interaction of zinc with antidepressants in the forced swimming test in mice. *Pol. J. Pharmacol.* 54, 681–685.
- 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.
- Tank, W. A., Wong D.L., 2015. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr. Physiol.* 5, 1-15.
- Tassabehji, N.M., Corniola, R.S., Alshingiti, A., Levenson, C.W., 2008. Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. *Physiol. Behav.* 95, 365-369.
- Teixeira, A.L., Barbosa, I.G., Diniz, B.S., Kummer, A., 2010. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function. *Biomark. Med.* 4, 871–887.
- Toda, T., Gage, F.H., 2018. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res.* 373, 693-709.
- Touyz, R.M., 2003. Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Mol. Aspects Med.* 24, 107–136.
- Touyz, R.M., Pu, Q., He, G., Chen, X., Yao, G., Neves, M.F., Viel, E., 2002. Effects of low dietary magnesium intake on development of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: role of reactive oxygen species. *J. Hypertens.* 20, 2221-2232.
- Travers, J.G., Kamal, F.A., Robbins, J., Yutzey, K.E., Blaxall, B.C., 2016. Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens. *Circ. Res.* 118, 1021-1040.
- Ubil, E., Duan, J., Pillai, I.C., Rosa-Garrido, M., Wu, Y., Bargiacchi, F., Lu, Y., Stanbouly, S., Huang, J., Rojas, M., Vondriska, T.M., Stefani, E., Deb, A., 2014. Mesenchymal–endothelial transition contributes to cardiac neovascularization. *Nature* 514, 585-90.
- Vaidya, V., Marek, G.J., Aghajanian, G.A., Duman, R.S., 1997. 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of BDNF mRNA in the hippocampus and the neo-cortex. *J. Neurosci.* 17, 2785–2795.
- Van den Hove, D.L.A., Leibold, N.K., Strackx, E., Martinez-Claros, M., Lesch, K.P., Steinbusch, H.W.M., Schruers, K.R.J., Prickaerts, J., 2014. Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24, 595–607.
- Veith, R.C., Lewis, N., Linares, O.A., Barnes, R.F., Raskind, M.A., Villacres, E.C., Murburg, M.M., Ashleigh, E.A., Castillo, S., Peskind, E.R., Pascualy, M., Halter, J.B., 1994. Sympathetic nervous system activity in major depression: basal and desipramine-induced alterations in plasma norepinephrine kinetics. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 411–422.
- Verschraegen, I., Anckaert, E., Schiettecatte, J., Mees, M., Garrido, A., Hermsen, D., Lentjes, E.G., Liebert, A., Roth, H.J., Stamminger, G., Smits, J., 2007. Multicenter evaluation of a rapid electrochemiluminescent adrenocorticotrophic hormone (ACTH) immunoassay. *Clin. Chim. Acta* 380, 75-80.

- Vinet, J., Cara, S., Blom, J.M.C, Brunello, N., Barden, N, Tascadda, F., 2004. Chronic treatment with desipramine and fluoxetine modulate BDNF, CaMKK α and CaMKK β mRNA levels in the hippocampus of transgenic mice expressing antisense RNA against the glucocorticoid receptor.
- Vormann, J., 2003. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol. Aspects Med.* 24, 27–37.
- Vreeburg, S.A., Hoogendijk, W.J., van Pelt, J., Derijk, R.H., Verhagen, J.C., van Dyck, R., Smit, J.H., Zitman, F.G., Penninx, B.W., 2009. Major depressive disorder and hypothalamic—pituitary—adrenal axis activity: results from a large cohort study. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 617—626.
- Wajs, E., Aluisio, L., Holder, R., Daly, E.J., Lane, R., Lim, P., George, J.E., Morrison, R.L., Sanacora, G., Young, A.H., Kasper, S., Sulaiman, A.H., Li, C.T., Paik, J.W., Manji, H., Hough, D., Grunfeld, J., Jeon, H.J., Wilkinson, S.T., Drevets, W.C., Singh, J.B., 2020. Esketamine Nasal Spray Plus Oral Antidepressant in Patients With Treatment-Resistant Depression: Assessment of Long-Term Safety in a Phase 3, Open-Label Study (SUSTAIN-2). *J. Clin. Psychiatry* 81, 19m12891.
- Walker, A.J., Burnett, S.A., Hasebe, K., McGillivray, J.A., Gray, L.J., McGee, S.L., Walder, K., Berk, M., Tye, S.J., 2013. Chronic adrenocorticotrophic hormone treatment alters tricyclic antidepressant efficacy and prefrontal monoamine tissue levels. *Behav. Brain Res.* 242, 76–83.
- Wang, J., Um, P., Dickerman, B.A., Liu, J., 2018. Zinc, magnesium, selenium and depression: a review of the evidence, potential mechanisms and implications. *Nutrients* 10, 584.
- Wang, L., Wang, W., Zhao, M., Ma, L., Li, M., 2008. Psychological stress induces dysregulation of iron metabolism in rat brain. *Neuroscience* 155, 24-30.
- Wang, S., Sorenson, C.M., Sheibani, N., 2005. Attenuation of retinal vascular development and neovascularization during oxygen-induced ischemic retinopathy in Bcl-2 $^{-/-}$ mice. *Dev. Biol.* 279, 205–219.
- Wang, Y., Li, M., Xu, L., Liu, J., Wang, D., Li, Q., Wang, L., Li, P., Chen, S., Liu, T., 2017. Expression of Bcl-2 and microRNAs in cardiac tissues of patients with dilated cardiomyopathy.
- Wang, Y., Yao, F., Wang, L., Li, Z., Ren, Z., Li, D., Zhang, M., Han, L., Wang, S.Q., Zhou, B., Wang, L., 2020. Single-cell analysis of murine fibroblasts identifies neonatal to adult switching that regulates cardiomyocyte maturation. *Nat. Commun.* 11, 2585.
- Ward, I.L., Weisz, J., 1984. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology* 114, 1635–1644.
- Watanabe, Y., Gould, E., McEwen, B.S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons, *Brain Res.* 588, 341–344.
- Watson, K.V., Moldow, C.F., Ogburn, P.L., Jacob, H.S., 1986. Magnesium sulfate: rationale for its use in preeclampsia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83, 1075-1078.
- Weber, K.T., 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J. Am. Coll. Cardiol.* 13, 1637– 1652.
- Wen, C., Fraser, T., Li, M., Whitworth, J.A., 1998. Hemodynamic profile of corticotropin-induced hypertension in the rat. *J. Hypertens.* 16, 187-194.

- Whitehurst, R.M. Jr., Zhang, M., Bhattacharjee, A., Li, M., 1999. Dexamethasone-induced hypertrophy in rat neonatal cardiac myocytes involves an elevated L-type Ca(2+)current. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1551–1558.
- Whittle, N., Li, L., Chen, W.Q., Yang, J.W., Sartori, S.B., Lubec, G., Singewald, N., 2011. Changes in brain protein expression are linked to magnesium restriction induced depression-like behavior. *Amino Acids* 40, 1231e1248.
- Whittle, N., Lubec, G., Singewald, N., 2009. Zinc deficiency induces enhanced depression-like behaviour and altered limbic activation reversed by antidepressant treatment in mice. *Amino Acids* 36, 147-158.
- Whitworth, J.A., Schyvens, C.G., Zhang, Y., Mangos, G.J., Kelly, J.J., 2001. Glucocorticoid-induced hypertension: from mouse to man. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28, 993-996.
- Williams, B.A., Beatch, G.N., 1997. Magnesium shifts voltage dependence of activation of delayed rectifier I(K) in guinea pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 272, H1292-H1301.
- Willner, P., 2016. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol. Stress* 6, 78-93.
- Willner, P., Scheel-Krüger, J., Belzung, C., 2013. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 2331-2371.
- Wissink, S., Meijer, O., Pearce, D., van der Burg, B., van der Saag, P.T., 2000. Regulation of the rat serotonin-1A receptor gene by corticosteroids. *J. Biol. Chem.* 275, 1321–1326.
- 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, M.L., Kling, M.A., Munson, P.J., Listwak, S., Licinio, J., Prolo, P., Karp, B., McCutcheon, I.E., Geraciotti, T.D. Jr, DeBellis, M.D., Rice, K.C., Goldstein, D.S., Veldhuis, J.D., Chrousos, G.P., Oldfield, E.H., McCann, S.M., Gold, P.W., 2000. Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 325–330.
- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., Lu, B., 2005. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci.* 8, 1069-1077.
- Wooley, C.S., Gould, E., McEwen, B.S., 1990. Exposure to Excess Glucocorticoids Alters Dendritic Morphology of Adult Hippocampal Pyramidal Neurons. *Brain. Res.* 531, 225-231.
- World Health Organization. 2004. The atlas of heart disease and stroke /Mackay, J., Mensah, G., with Mendis, S., and Greenland, K., World Health Organization.
- Wu, X., Rebold, M.R., Korf-Klingebiel, M., Wollert, K.C., 2021. Angiogenesis after acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 117, 1257-1273.
- Xie, W., Meng, X., Zhai, Y., Ye, T., Zhou, P., Nan, F., Sun, G., Sun, X., 2019. Antidepressant-like effects of the Guanxin Danshen formula via mediation of the CaMK II-CREB-BDNF signalling pathway in chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats. *Ann. Transl. Med.* 7, 564.

- Xinxing, W., Wei, L., Lei, W., Rui, Z., Baoying, J., Lingjia, Q., 2014. A neuroendocrine mechanism of co-morbidity of depression-like behavior and myocardial injury in rats. *PLoS One*. 9, e88427.
- 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.
- Yamanaka, R., Shindo, Y., Oka, K., 2019. Magnesium is a key player in neuronal maturation and neuropathology. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3439.
- Yang, Y., Harmon, C.M., 2017. Molecular signatures of human melanocortin receptors for ligand binding and signaling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863, 2436-2447.
- Yang, Z.W., Gebrewold, A., Nowakowski, M., Altura, B.T., Altura, B.M., 2000. Mg(2+)-induced endothelium-dependent relaxation of blood vessels and blood pressure lowering: role of NO. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R628-R639.
- Ye, Y., Wang, G., Wang, H., Wang, X., 2011. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. *Neurosci. Lett.* 503, 15–19.
- Yehuda, R., Southwick, S.M., Nussbaum, G., Wahby, V., Giller, E.L. Jr, Mason, J.W., 1990. Low urinary cortisol excretion in patients with posttraumatic stress disorder. *J. Nerv. Ment. Dis.* 178, 366-369.
- Zaitoun, I.S., Johnson, R.P., Jamali, N., Almomani, R., Wang, S., Sheibani, N., Sorenson, C.M., 2015. Endothelium expression of Bcl-2 is essential for normal and pathological ocular vascularization. *PLoS One*. 10, e0139994.
- Zarate, C.A. Jr., Brutsche, N.E., Ibrahim, L., Franco-Chaves, J., Diazgranados, N., Cravchik, A., Selter, J., Marquardt, C.A., Liberty, V., Luckenbaugh, D.A., 2012. Replication of ketamine's antidepressant efficacy in bipolar depression: a randomized controlled add-on trial. *Biol. Psychiatry* 71, 939–946.
- Zarate, C.A. Jr., Singh, J.B., Carlson, P.J., Brutsche, N.E., Ameli, R., Luckenbaugh, D.A., Charney, D.S., Manji, H.K., 2006. A randomized trial of an N-methyl-d-aspartate antagonist in treatment resistant major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 856–864.
- Zhang, Y., Gray, T.S., D'Souza, D.N., Carrasco, G.A., Damjanoska, K.J., Dudas, B., Garcia, F., Zainelli, G.M., Sullivan Hanley, N.R., Battaglia, G., Muma, N.A., Van de Kar, L.D., 2004. Desensitization of 5-HT_{1A} receptors by 5-HT_{2A} receptors in neuroendocrine neurons *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 59–66.
- Zhao S, Zhang L, Xu Z, Chen W., 2013. Neurotoxic effects of iron overload under high glucose concentration. *Neural. Regen. Res.* 8, 3423-3433.
- 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.

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.

Zhu, M.Y., Wang, W.P., Huang, J., Feng, Y.Z., Regunathan, S., Bissette, G., 2008. Repeated immobilization stress alters rat hippocampal and prefrontal cortical morphology in parallel with endogenous agmatine and arginine decarboxylase levels. *Neurochem. Int.* 53, 346-354.

Zogović, D., Pešić, V., Dmitrašinić, 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. *J. Med. Biochem.* 33, 291–298.

Zuena, A.R., Mairesse, J., Casolini, P., Cinque, C., Giovanni Sebastiano Alema, G.S., Morley-Fletcher, S., Chiodi, V., Spagnoli, L.G., Gradini, R., Catalani, A., Nicoletti, F., Maccar, S., 2008. Prenatal Restraint Stress Generates Two Distinct Behavioral and Neurochemical Profiles in Male and Female Rats. *PloS One* 3, e2170.

8. PRILOZI

Lista skraćenica i oznaka

2D – dvodimenzionalni

3D – trodimenzionalni

ACTH – adrenokortikotropni hormon (eng. *adrenocorticotropic hormone*)

AMPA – α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina

ANOVA – analiza varijanse (statistički test)

AP-1 – protein aktivator 1 (eng. *activator protein 1*)

ATP – adenzin trifosfat

AVP – arginin-vazopresin (eng. *arginine vasopressin*)

Bcl-2 – eng. *B-cell lymphoma 2*

BDNF – brain-derived neurotrophic factor; neurotrofični faktor poreklom iz mozga

BMI – indeks telesne mase (eng. *body mass index*)

BNP – moždani natriuretski peptid (eng. *brain natriuretic peptide*)

BSA – albumin goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*)

cAMP – ciklični adenzin monofosfat (eng. *cyclic adenosine monophosphate*)

CA1 – Amonov rog (*Cornu Ammonis 1*)

CA2+CA3 - Amonov rog (*Cornu Ammonis 2 + Cornu Ammonis 3*)

CCL-2 – hemokin (C-C) ligand 2 (eng. *chemokine (C-C) ligand 2*)

CDK1 – ciklin-zavisna kinaza 1 (eng. *cyclin-dependent kinase 1*)

CDK4 – ciklin-zavisna kinaza 4 (eng. *cyclin-dependent kinase 4*)

CDKs – ciklin-zavisne kinaze (eng. *cyclin-dependent kinases*)

cDNK – komplementarna DNK

CNS – centralni nervni sistem

CREB – transkripcijski faktor CREB (eng. *cAMP response element-binding protein*)

CRF – kortikotropin-oslobađajući faktor/hormon (eng. *corticotropin releasing factor*)

CTGF – faktor rasta vezivnog tkiva (eng. *connective tissue growth factor*)

Cu – bakar

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DG – dentatni girus

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EC – entorinalni korteks (eng. *entorhinal cortex*)

EGF – Epidermalni faktor rasta

ELISA – (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELISA – enzimski imunosorbent test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ERK – ekstracelularnim signalima regulisane kinaze (eng. *extracellular signal-regulated kinases*)

Fe – gvožđe

FST – test forsiranog plivanja (eng. *forced swim test*)

GABA – γ -amino buterna kiselina (eng. *gamma-aminobutyric acid*)

GAP-43 – protein povezan sa rastom-43 (eng. Growth Associated Protein 43)

GR – glukokortikoidni receptori

GWAS – studije asocijacije celokupnog genoma (eng. *genome-wide association studies*)

H₂O₂ – vodonik peroksid

HClO₄ – perhlorna kiselina

HDL – lipoproteini visoke gustine (eng. *high-density lipoprotein*)

HESI – elektrosprej zagrejan jonizacijom (eng. *heated electrospray ionization*)

HESI – jonizacija sa zagrejanim elektrosprejom (eng. *heated electrospray ionization*)

HIF-1 – hipoksijom-indukovani faktor 1 (eng. *hypoxia-inducible factor 1*)

HNO₃ – nitratna kiselina

HPA osovina – hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (eng. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*)

HPLC-ECD – HPLC sistem sa elektrohemijskim detektorom (eng. *HPLC with electrochemical detector*)

HRP – peroksidaza rena (eng. *horseradish peroxidase*)

i.p. – intraperitonealno

IBS – ishemijske bolesti srca

ICAM-1 – intercelularni adhezioni molekul-1 (eng. *intercellular adhesion molecule-1*)

IFN- α – interferon- α

IL-10 – interleukin-10 (eng. *interleukin-10*)

IL-12 – interleukin-12 (eng. *interleukin-12*)

IL-13 – interleukin-13 (eng. *interleukin-13*)

IL-18 – interleukin-18 (eng. *interleukin-18*)

IL-1 β – interleukin 1 β

IL-6 – interleukin 6

IM – infarkt miokarda

I κ B α – eng. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*

JNK – c-Jun N-terminalna kinaza (eng. *c-Jun N-terminal kinase*)

KMnO₄ – kalijum permanganat

KVB – kardiovaskularne bolesti

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

LC – jedro u ponsu (*locus ceruleus*)

LDL – lipoproteini niske gustine (eng. *low-density lipoproteins*)

LPP – lateralni perforantni put (eng. *lateral perforant pathway*)

LPS – lipopolisaharid (eng. *lipopolysaccharide*)

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

LTP – dugotrajna potencijacija (eng. *long-term potentiation*)

MAOI – inhibitor monoamino oksidaze (eng. *monoamine oxidase inhibitor*)

MAP kinaze – mitogenom aktivirane protein kinaze (eng. *mitogen-activated protein, MAP*)

MC2R – melanokortinski receptor tip 2 (eng. *melanocortin 2 receptor*)

Mg – magnezijum

MM – eng. *Maintenance Medium*

MPP – medijalni perforantni put (eng. *medial perforant pathway*)

MR – mineralokortikoidni receptori

mTOR – ciljni molekul za rapamicin kod sisara (eng. *mammalian target of rapamycin*)

Na⁺/K⁺-ATPaza – natrijum – kalijum pumpa

NDRI – inhibitor preuzimanja noradrenalina i dopamina (eng. *norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor*)

NERI – inhibitor preuzimanja noradrenalina (eng. *norepinephrine reuptake inhibitor*)

NF-κB – nuklearni faktor κB (eng. *nuclear factor κB*)

NMDA – N-metil-D-aspartat

NO – azot monoksid

OFT – test otvorenog polja (eng. *open field test*)

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

PCNA – nuklearni antigen proliferišućih ćelija (eng. *proliferating cell nuclear antigen*)

PM – eng. *Plating Medium*

PVN – paraventrikularno jedro (eng. *paraventricular nucleus*)

RNK – ribonukleinska kiselina

RP-HPLC – reverzno-fazna tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. *reversed phase high performance liquid chromatography*)

RT-PCR – lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (eng. *real-time polymerase chain reaction*)

s.c. – supkutano

S211 – serin 211 (mesto fosforilacije u nizu aminokiselina u peptidnom lancu)

S226 – serin 226 (mesto fosforilacije u nizu aminokiselina u peptidnom lancu)

SAS – simpato-adrenalni sistem (eng. *sympatho-adrenal system*)

SEM – standardna greška (eng. *standard error of the mean*)

SGZ – subgranularni sloj (eng. *subgranular zone*)

SNRIs – inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina i noradrenalina (eng. *serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors*)

SPE – eng. *solid phase extraction column*

SSRIs – selektivni inhibitori preuzimanja serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitors*)

TCAs – triciklični antidepresivi (eng. *tricyclic antidepressants*)

TeCAs – tetraciklični antidepresivi (eng. *tetracyclic antidepressants*)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

TNF- α – faktor nekroze tumora α

TRD – depresija rezistentna na terapiju (eng. *treatment resistant depression*)

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

TRPM6 i TRPM7 – transportni proteini uključeni u apsorpciju magnezijuma (eng. *transient receptor potential channel melastatin member 6 and 7*)

ULA – eng. *ultralow attachment*

VCAM-1 – vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1 (eng. *vascular cell adhesion molecule-1*)

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)

WE – eng. *William's E Medium*

WES – eng. *William's E Medium with supplements*

Zn – cink

9. BIOGRAFIJA

Jelena Petrović je rođena u Kraljevu 04.12.1988. godine. U Beogradu je završila osnovnu školu „Đura Daničić” i Prvu beogradsku gimnaziju kao nosilac diplome „Vuk Stefanović Karadžić”. Integrisane akademske studije na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,06 i time stekla zvanje magistra farmacije. Tokom studija, bila je stipendista najpre Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a potom Fondacije Dragoljub Marinković. Doktorske akademske studije, modul Farmakologija, upisala je školske 2013/2014. godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na Katedri za Fiziologiju zaposlena je od 2013. godine, gde učestvuje u pripremi i izvođenju praktične nastave iz obaveznih predmeta Farmaceutska fiziologija 1 i Farmaceutska fiziologija 2 i izbornog predmeta Odabrana poglavlja fiziologije.

U okviru projekta koji je realizovan preko Erasmus+ mobilnosti, boravila je u laboratoriji profesora Magnusa Ingelmana-Sandberga, na Katedri za Fiziologiju i Farmakologiju Karolinska Instituta. Od oktobra 2018. godine angažovana je kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, pod nazivom „Biomarkeri oštećenja i disfunkcije organa”.

Do sada je objavila sedam radova u međunarodnim časopisima, jedan rad u domaćem naučnom časopisu (M53) i ima šest saopštenja sa međunarodnih skupova, štampanih u izvodu.

10. IZJAVE

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Петровић

Број индекса 24/13

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај магнезијума на понашање, неуроендокрине и промене на миокарду узроковане хиперактивношћу осовине хипоталамус-хипофиза-надбубрег код пацова

- 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 Јелена Петровић

Број индекса 24/13

Студијски програм Докторске академске студије модул Фармакологија

Наслов рада Утицај магнезијума на понашање, неуроендокрине и промене на миокарду узроковане хиперактивношћу осовине хипоталамус-хипофиза-надбубрег код пацова

Ментор Проф. др Весна Пешић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Утицај магнезијума на понашање, неуроендокрине и промене на миокарду узроковане хиперактивношћу осовине хипоталамус-хипофиза-надбубрег код пацова

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.