

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 03. 04. 2022. godine, odlukom broj 19/XXIII-4/3-ЂЂ imenovana je Komisija za ocenu završne doktorske disertacije pod naslovom:

“PRESINAPTIČKA FUNKCIJA GLUTAMATERGIČKE SINAPSE U MODELU DVOSTRUKOG STRESA”

kandidata dr Đorđa Đorovića, zaposlenog na Institutu za anatomiju „Niko Miljanić“ Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Mentor ove teze je Prof. dr Laslo Puškaš, a komentor Prof. dr Per Svenningsson.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Valentina Blagojević, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Miroslav Savić, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Miloš Mališ, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
4. Doc. dr Tanja Kalezić, docent Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
5. Doc. dr Jovana Čukuranović Kokoris, docent Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu

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

## IZVEŠTAJ

### A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Đorđa Đorovića je napisana na 85 strana i podeljena na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi, material i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 41 grafikon i 1 tabela. Doktorska disertacija sadrži sažetak na engleskom i srpskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji.

U prvom delu **uvoda** diskutovan je dijateza stres model. Ovaj model sugerise da mentalni poremećaji proizilaze iz interakcije genetskih ili bioloških podložnosti (dijateza) i stresa. Stresori mogu da pokrenu ili pogoršaju ove podložnosti, što dovodi do pojave mentalnog poremećaja. Takođe diskutovan je koncept alostatičkog opterećenja, koji opisuje fiziološke posledice hronične izloženosti stresorima. Visoko alostatičko opterećenje povezano je sa povećanim rizikom od razvoja brojnih poremećaja. Jedan od glavnih nedostataka animalnih modela post-traumatskog stresnog poremećaja (PTSP) jeste što pored izlaganja traumi ne obuhvataju i izlaganje faktorima rizika. Zbog toga je u istraživanju primenjen model

dvostrukog stresa, koji je uspostavljen kombinovanjem dva postojeća animalna modela, maternalne deprivacije (MD) (kao široko korišćenog modela ranog stresa) i pojedinačnog produženog stresa (PPS) (kao modela post-traumatskog stresnog poremećaja (PTSP-a), u ključnim razvojnim periodima pacova (neonatalnom periodu i ranom adultnom periodu), što rekapitulira patogenezu PTSP-a. U nastavku uvoda diskutovana je struktura i regulacija  $Ca^{2+}$ /kaldomodulin-zavisne protein kinaze (CaMKII), kao jednog od glavnih regulatora glutamatergičke sinapse, kao i uloga CaMKII i glutamatergičke neurotransmisije, kao mete antidepressiva. Naime široko je prihvaćeno da uticaj na glutamatergičku neurotransmisiju i CaMKII predstavlja važan aspekt dejstva antidepressiva. Dati su primeri studija koje pokazuju da hronično lečenje antidepressivima ima uticaja na egzocitozu glutamata u hipokampusu preko modifikacije nivoa autofosforilisane CaMKII. U finalnom delu uvoda diskutovana je neroatomska osnova PTSP-a. Razmatrana je uloga regiona mozga, kao što su amigdala, hipokampus i prefrontalni korteks u PTSP-u.

**Ciljevi** istraživanja su jasno definisani:

1. Uspostaviti model dvostrukog stresa i izvršiti njegovu bihevioralnu karakterizaciju u odnosu na MD i PPS
2. Ispitati uticaj dvostrukog stresa i pojedinačnih stresora (MD i PPS) na telesnu masu i nivo kortikosterona u serumu pacova.
3. Ispitati uticaj dvostrukog stresa i pojedinačnih stresora (MD i PPS) na funkciju presinaptičkog kompartmana, određivanjem egzocitoze glutamate i koncentracije glutamate u sinaptozomima hipokampusa, kao i određivanjem ekspresije CaMKII u sinaptozomima izolovanim iz hipokampusa i prefrontalnog korteksa i amigdale mozga pacova.
4. Ispitati uticaj dvostrukog stresa i pojedinačnih stresora (MD i PPS) na koncentraciju noradrenalina, adrenalina, serotonina, dopamina i njihovih metabolite u hipokampusu, prefrontalnom korteksu i amigdali.
5. Ispitati moguće postsinaptičke efekte dvostrukog stresa i pojedinačnih stresora (MD i PPS) određivanjem mRNK moždanog neurotrofičkog faktora (BDNF) u hipokampusu i prefrontalnom korteksu

U poglavlju **materijal i metode** detaljno je opisana metodologija istraživanja. U eksperimentima su korišćeni pacovi muškog pola soja Wistar dobijeni iz matične kolonije Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Životinje su čuvane u standardnim uslovima sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Formirane 4 grupe životinja: kontrolna grupa, MD grupa - izloženi MD PD9, PPS grupa - izloženi PPS-u u PD60, MD+PPS grupa - izložena MD tokom devetog postnatalnog dana (PN9) i PPS-u u PD60. MD je sprovedena tako što su ženke u 10:00 izdvojene iz legla a mladunci ostavljeni u matičnom kavezu 24h, nakon čega su majke vraćene u kavez. PPS-u se sastoji iz izlaganja pacova sa tri vezana stresora koji uključuju imobilizaciju 2h, prinudno plivanje 20 min i izlaganje dietil etru do gubitka svesti. Nakon PPS-a životinje su ostavljene u svojim kavezima 7 dana bez uznemiravanja, a zatim su žrtvovane ili podvrgnute bihevioralnom testiranju. Za ispitivanje ponašanje životinja korišćeni su uzdignuti plus lavirint, test spontane lokomotorne aktivnosti, test socijalne interakcije i test preferencije saharoze. Sinaptozomi su izolovani iz hipokampusa, prefrontalnog korteksa i amigdale. Egzocitoza neurotransmitera određivana je korišćenjem protokola preuzimanja/ekstinkcije FM2-10 boje, a ekspresija proteina analizirana je Western blotom. Koncentracija glutamata i nivo kortikosterona mereni su korišćenjem komercijalnih kitova, a neurotransmiteri i njihovi metaboliti su analizirani tečnom hromatografijom visokih performansi. BDNF mRNA određivana je radioaktivnom in

situ hibridizacijom. Statistička analiza sprovedena je korišćenjem programa GraphPrism 9. Za procenu značajnosti korišćena je dvofaktorska ANOVA praćena LSD (Least Significant Difference) testom.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati kroz 33 slike.

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

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

**Bibliografija** sadrži listu od 148 referenci.

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

Korišćenjem programa iThenticate u Univerzitetnoj biblioteci Svetozar Marković, Beograd, sprovedena je provera originalnosti doktorske disertacije kandidata dr Đorđa Đorovića, pod naslovom: „Presynaptic function of glutamatergic synapses in a “two-hit“ stress model“, mentori prof. dr Laslo Puškaš i prof. dr Per Svenningsson (Per Svenningsson) i dobijena je vrednost za Similarity index od 31%.

Doktorska teza je napisana na engleskom jeziku zato što je delom urađena u sklopu saradnje sa Laboratorijom za translacionu neurofarmakologiju na Karolinska institutu, Švedska, čiji je rukovodilac prof. dr Per Svenningsson, član Nobelovog komiteta, koji je i komentor kandidata.

Navedeni indeks sličnosti posledica je, u najvećoj meri, činjenice da je disertacija napisana na engleskom jeziku, i prvi izvor sa kojim ustanovljen pojedinačni indeks sličnosti od 4% je rad iz doktorata kandidata (referenca: Đorović Đ, Lazarević V, Arandelović J, Stevanović V, Paslawski W, Zhang X, Velimirović M, Petronijević N, Puškaš L, Savić MM, Svenningsson P. Maternal deprivation causes CaMKII downregulation and modulates glutamate, norepinephrine and serotonin in limbic brain areas in a rat model of single prolonged stress. *J Affect Disord.* 2024;349:286-296). Ovaj rad, koji je uslov za odbranu doktorata i čiji je prvi autor kandidat, objavljen je na sajtu časopisa (*Journal of Affective Disorders*) u formi *open access* sa pravom korišćenja u doktorskoj disertaciji.

([https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016503272400096X?dgcid=rss\\_sd\\_all](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016503272400096X?dgcid=rss_sd_all) ) Rad se takođe nalazi u akademskom repozitorijumu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (<https://farfar.pharmacy.bg.ac.rs/handle/123456789/5503>). Isti rad detektovan je kao treći izvor preklapanja sa pojedinačnom sličnošću od 1%. U najvećoj meri ovo preklapanje se odnosi na sličnosti sa publikovanim rezultatima doktoranda na engleskom jeziku koji su deo rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji koja je takođe na engleskom jeziku, tako da je taj deo preklapanja neizbežan. Deo sličnosti sa navedenom publikacijom doktoranda se odnosi na reči i idiome u poglavlju Materijal i metode i posledica je navođenja naziva uređaja i reagensa koji su korišćeni u eksperimentima, nazive standardnih rastvora korišćenih za određivanje koncentracije neurotransmitera, nazive korišćenih antitela, vreme i brzinu centrifugiranja, broj ispiranja, trajanje inkubacije i sl. kao i naziv aparature za bihejvioralne eksperimente, specifikaciju njihovih delova i dimenzija, naziv softvera koji je korišćen za bihejvioralnu analizu, dužinu stresiranja kao i aparature koja se koristi za stresiranje, trajanje stresiranja kao i opis statističkih metoda koje su korišćene.

Drugi izvor sa pojedinačnom sličnošću od 2% je teza na francuskom jeziku koja sadrži i publikaciju na engleskom jeziku, pri čemu je jedino preklapanje u rečenici „*Error bars represent the standard error of the mean*“ koja je prisutna u legendi svih grafika u tezi. U disertaciji postoji 35 grafika i ova rečenica se

ponavlja ispod svakog grafikona, te zbog toga preklapanje sa ovim izvorom iznosi 2%. U pitanju je standardni idiom koji se koristi za opisivanje datog parametra i u pitanju je slučajno preklapanje.

Svi preostali izvori imaju indeks sličnosti od 1% ili manje od 1%. Preklapanja se odnose na reči kao što su *University of Belgrade, Faculty of Medicine, Doctoral dissertation, PhD, Professor, scientific field, scientific subfield, Neuroscience*. Nazivi poglavlja: *Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Literature*. Takođe radi se o podudarnosti brojnih ključnih reči koje se koriste u oblasti u kojoj su sprovedena istraživanja (*maternal deprivation, single prolonged stress, posttraumatic stress disorder, trauma, diathesis-stress model, early life stress, nazivi enzima: calcium/calmodulin dependent protein kinase II, depolarization evoked neurotransmitter release, readily releasable pool of vesicles, SNARE complexes, synaptic vesicles, hippocampus, amygdala, prefrontal cortex*), ličnih imena, kratkih citata, reči korišćenih u opisu metodologije, uobičajenih fraza koje se koriste u opisu rezultata istraživanja (*number of entries in closed arms, number of entries in open arms, percentage of entries, statistically significant difference, post hoc analysis, significant increase, significant decrease, compared to, trend effect, distance traveled, showed that, control group*) što je u skladu da članom 9 Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu.

Shodno tome, izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije kandidata dr Đorđa Đorovića te se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

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

Dvostruko stresirani pacovi ispoljili su karakterističan bihevioralni fenotip. Uzdignutim plus lavirintom (EPM) ispitivani su parametri anksioznog ponašanja i pokazano je da kod dvostruko stresiranih i MD pacova postoji povećanje procenta vremena provedenog u otvorenim kracima i procenta ulaska u otvorene krake, što ukazuje na dezinhibiciju. Spontana lokomotorna aktivnost bila je smanjena kod MD+PPS grupe u poređenju sa kontrolnom i PPS grupom. Ovaj parametar predstavlja jedinstvenu bihevioralnu karakteristiku dvostruko stresiranih pacova u odnosu na pacove podvrgnute pojedinačnim stresorima i odraz je smanjene eksploracije novog prostora, koja ukazuje na izmenjenu emocionalnu i motivacionu komponentu ponašanja. Smanjena socijalna interakcija detektovana je kod pacova iz MD+PPS i PPS grupe, koja je najviše bila izražena kada su u pitanju parametri igre, koju karakteriše izražena hedonijska komponenta, što ukazuje na prisustvo apatije kod ovih pacova. Preferencija saharoze nije bila značajno izmenjena pod dejstvom stresa ali je uočen trend efekat interakcije ranog i kasnog stresa i post-hoc test pokazao je značajno smanjenje preferencije saharoze u MD+ PPS grupi u poređenju sa ostalim grupama. Telesna masa bila je konzistentno snižena u svim analiziranim vremenskim tačkama kod pacova podvrgnutih maternoj deprivaciji. PPS nije ostvario značajan efekat na telesnu masu pacova. Oslobođanje neurotransmitera bilo je smanjeno u hipokampusu pacova iz MD+PPS i PPS grupe u poređenju sa kontrolnom grupom. Koncentracija glutamata bila je smanjena u hipokampalnim sinaptozomima pacova iz MD+ PPS grupe, što ukazuje na smanjenu koncentraciju glutamata u sinaptičkim vezikulama. Nivoi autofosforilisane CaMKII bili su smanjeni u sinaptozomima hipokampusa i prefrontalnog korteksa pacova iz MD+PPS grupe, dok je kod pacova iz PPS grupe uočeno smanjenje autofosforilisane CaMKII samo u sinaptozomima prefrontalnog korteksa. Povećana koncentracija noradrenalina, serotonina i njihovih metabolita uočena je u prefrontalnom korteksu pacova iz MD+PPS grupe. Nivoi BDNF mRNK bili su smanjeni u dentatnom girusu dorsalnog hipokampusa i medijalnom prefrontalnom korteksu kod MD i MD+PPS pacova, što ukazuje na značaj postsinaptičkih efekata kod dvostruko stresiranih pacova, u poređenju sa pacovima izloženim PPS-u.

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

Kombinacija MD i PPS dovodi do značajnog smanjenja spontane lokomotorne aktivnosti, što odražava smanjenu eksploraciju novog prostora, što je urođeno ponašanje glodara (Denenberg, 1969). Ovo smanjenje aktivnosti može biti povezano sa emocionalnim deficitima koji su uočeni kod PTSP-a (Litz et al., 2000). Prethodna studija istakla je značaj lokomotorne aktivnosti u testu otvorenog polja rano nakon traume u predikciji ispoljavanja ponašanja povezanog sa PTSP-om (Colucci et al., 2020). Test uzdignutog plus lavirinta (EPM) je pokazao povećanje procenta vremena provedenog u otvorenim kracima i broja ulazaka u otvorene krake kod MD i MD+PPS grupe u poređenju sa kontrolnom grupom, što sugerise na anksiolitički efekat ili rizično ponašanje (Burke et al., 2013; Llorente-Berzal et al., 2011). Druge studije pokazale su slične rezultate kod mužjaka pacova podvrgnutih maternalnoj deprivaciji (Burke et al., 2013; Llorente-Berzal et al., 2011) i to može odražavati bihevioralnu dezinhibiciju, koja predstavlja karakteristiku PTSP-a (Sadeh et al., 2018; Sadeh et al., 2015). PPS sam po sebi nije izazvao povećanje anksioznosti u EPM-u, što je u skladu sa DSM-5 kriterijumima PTSP-a, po kojima generalizovana anksioznost ne predstavlja njegov dijagnostički kriterijum. Neke studije pokazale su da PPS povećava anksioznost (Imanaka et al., 2006; Feng et al., 2015), dok druge nisu uspele da reprodukuju ovaj efekat (Harvey et al., 2006; Eagle et al., 2013). Test socijalne interakcije je otkrio da kasniji stres značajno narušava socijalnu interakciju. U MD+PPS i PPS grupi pokazano je smanjenje parametara igre, što ukazuje na stresom izazvanu apatiju (Trezza et al., 2011; Cathomas et al., 2015), budući da je igra visoko prijatna aktivnost za glodare (Trezza et al., 2011; Vanderschuren, 2010). Izbegavanje je dijagnostički kriterijum PTSP-a (Američko psihijatrijsko udruženje, 2013). Hedoničko ponašanje, mereno preferencijom saharoze, nije bilo značajno izmenjeno pod dejstvom stresa, što je u skladu sa literaturom o animalnim modelima PTSP-a (Ritov et al., 2016; Enman et al., 2015). U studiji je ispitivana glutamatergička sinaptička funkcija kod stresiranih životinja, pri čemu je otkriveno smanjenje oslobađanja neurotransmitera izazvano depolarizacijom u hipokampalnim sinaptosomima kod MD+PPS i PPS životinja u poređenju sa kontrolama. Ovo predstavlja novitet u kontekstu animalnih modela PTSP-a. Disfunkcija glutamatergičke neurotransmisije u hipokampusu je ključna karakteristika mentalnih poremećaja povezanih sa stresom, prema postojećoj literaturi (Pitman et al., 2012; Lener et al., 2017). Ovi rezultati u skladu su sa rezultatima studije koja je pronašla promene u molekularnom sastavu presinaptičkog kompartmana u hipokampusu, što bi moglo objasniti efekat PPS-a (Guan et al., 2022). Smanjenje koncentracije glutamata u hipokampalnim sinaptosomima iz MD+PPS grupe moglo bi biti povezano sa disfunkcijom glutamat/glutamin ciklusa, koji je replikovao nalaz u animalnim stres modelima, kao i u postmortem analizama moždanog tkiva pacijenata sa depresijom (Nagy et al., 2015; Banasr et al., 2010). Takvo oštećenje je predloženo kao model patogeneze depresije (Walter et al., 2009), a sličan mehanizam je predložen za PTSP (Krystal et al., 2017). U prefrontalnom korteksu (PFC), značajno povećanje koncentracije noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), 5-hidroksindolesirćetne kiseline (5-HIAA) i epinefrina (EPI) detektovano je kod MD+PPS životinja u poređenju sa kontrolama. Ovo se poklapa sa postojećom literaturom o promenama NA sistema kod PTSP-a (Krystal i Neumeister, 2009). U studiji je ispitivana i ekspresiju presinaptičkih proteina, pri čemu je pronađeno značajno smanjenje autofosforilacije CaMKII u kortikalnim i hipokampalnim sinaptosomima u MD+PPS grupi i kortikalnim sinaptosomima u PPS grupi. Ova disfunkcija u autonomnoj aktivnosti CaMKII u ovim regionima je novi nalaz u kontekstu PTSP-a. Konačno, nalaz smanjene BDNF mRNA u MD+PPS i MD grupama odražava smanjenje BDNF dendritičnog transkripta. Ovo je u skladu sa literaturom o promenama BDNF-a nakon stresa (McEwen et al., 2016; Autry i Monteggia, 2012). Smanjenje BDNF dendritičnog transkripta zajedno sa smanjenim oslobađanjem glutamata u hipokampusu povezano je sa vulnerabilnošću na stres i antidepresivnim dejstvom ketamina (Tornese et al., 2019). Takođe, nedavna studija je pronašla smanjenje nivoa BDNF-a zajedno sa dvosmernim promenama u oslobađanju glutamata nakon hroničnog stresa (Hu et al., 2023).

## E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Đorović, Đ., Lazarević, V., Arandelović, J., Stevanović, V., Paslawski, W., Zhang, X., Velimirović, M., Petronijević, N., Puškaš, L., Savić, M. M., & Svenningsson, P. (2024). Maternal deprivation causes CaMKII downregulation and modulates glutamate, norepinephrine and serotonin in limbic brain areas in a rat model of single prolonged stress. *Journal of affective disorders*, 349, 286–296.
2. Đorović Đ. Neurobiologija posttraumatskog stresnog poremećaja. *MedPodml* 2025, Vol. 76 Br.2

## F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Presinaptička funkcija glutamatergičke sinapse u modelu dvostrukog stresa“ dr Đorđa Đorovića, predstavlja originalni naučni doprinos koji rasvetljava bihevioralne i molekularne efekte dvostukog stresa, pri čemu je analizirana interakcija dva stresora (MD u neonatalnom i PPS u ranom adultnom periodu) u kontekstu funkcije i sastava glutamatergičke sinapse, fokusirajući se na presinaptičku funkciju, promena u koncentraciji monoamina, kao i ekspresije BDNF-a, čime su ispitani potencijalni postsinaptički efekti stresa u različitim regionima mozga pacova. Rezultati ove disertacije predstavljaju novitet u istraživačkom smislu, s obzirom da neki od ovih efekata nisu prethodno ispitivani na animalnim modelima PTSP-a, a uočene promene potencijalno predstavljaju patogenetski mehanizam kako rani stres povećava rizik za nastanak PTSP-a. Takođe autofosforilacija CaMKII predstavlja terapijsku metu, tako da ova teza prezentuje prve dokaze koji ukazuju na potencijalni značaj ispitivanja ovog terapijskog pristupa u kontekstu PTSP-a.

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

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

U Beogradu, 14. 5. 2024.

**Članovi Komisije za odbranu doktorske disertacije:**

Prof. dr Valentina Blagojević

---

Prof. dr Miroslav Savić

---

Prof. dr Miloš Mališ

---

Doc. dr Tanja Kalezić

---

Doc. dr Jovana Čukuranović Kokoris

---

**Mentor:**

Prof. dr Laslo Puškaš

---

**Komentor:**

Prof dr Per Svenningsson

---