

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ – БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА

На X редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одржаној **10.9.2024.** године, на основу молбе ментора др Мирослава Ацића, научног саветника Института за нуклеарне науке Винча – Института од националног значаја за Републику Србију и проф. др Надежде Недељковић, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Емилије Б. Главонић** (број индекса Б3010/2017), истраживача сарадника Института за нуклеарне науке Винча – Института од националног значаја за Републику Србију под насловом: „**Молекулски механизми учења и памћења страха и њихова модулација кетамином код адолесцентних мишева**“, у саставу:

1. др Милош Митић, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне науке Винча, Универзитет у Београду, Институт од националног значаја за Републику Србију
2. др Сања Ивковић, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне науке Винча, Универзитет у Београду, Институт од националног значаја за Републику Србију
3. др Милорад Драгић, научни сарадник, Универзитет у Београду – Биолошки факултет

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Емилије Б. Главонић** је оригинално научно истраживање на тему молекулских механизма и полно-узрасних разлика у процесу гашења страха, као и његове модулације код адолесцентних животиња под утицајем кетаминa.

Докторска дисертација урађена је у Лабораторији за молекуларну биологију и ендокринологију, Института за нуклеарне науке Винча – Института од националног значаја за Републику Србију, а као резултат објављена су два истраживачка рада, 1xM21 и 1xM22 категорије, као и један ревијски рад M22 категорије у којима је докторандкиња први аутор. Текст докторске дисертације написан је на 117 страна и организован у уобичајена поглавља: *Увод* (пагиниране стране 1-28), *Циљеви истраживања* (пагиниране стране 29-30), *Материјал и методе* (пагиниране стране 31-43), *Резултати* (пагиниране стране 44-60), *Дискусија* (пагиниране стране 61-69), *Закључак* (пагиниране стране 70-71) и *Литература* (пагиниране стране 72-98). Дисертација садржи *насловну страну* на српском и енглеском језику, *податке о менторима и члановима комисије, захвалницу, сажетак* на српском и енглеском језику са кључним речима, *списак скраћеница, садржај, биографију*

аутора и три изјаве (пагиниране стране 101-104). Дисертација садржи укупно 34 слике и пет табела, при чему у слике спада и шест илустрација које су оригинално дело кандидаткиње.

Анализа докторске дисертације

Предмет докторске дисертације кандидаткиње је испитивање полно-узрасних разлика у процесу гашења страха код мишева, као и молекулских механизма који леже у основи ових разлика. Додатно, кандидаткиња испитује како поновљена фармаколошка интервенција кетамином може да модулише овај процес у групи адолесцентних мужјака, код којих је процес гашења страха измењен у односу на адултне јединке. Поглавље **Увод** садржи неколико целина које у детаље описују: а) животињске моделе и фазе класичног условљавања и гашења страха, б) мождане структуре које су укључене у различите фазе ових типова учења, са посебним освртом на сличности и разлике у организацији и цитоархитектури ових структура код глодара, као најчешће коришћеног модел организма у неуробиологији, и човека, в) молекулске механизме и главне молекулске „играче“ који леже у основи процеса гашења реакције страха, з) полно-специфичне и узрасно-специфичне разлике у процесу гашења страха са посебним освртом на значај ових фактора у настајању различитих анксиозних поремећаја и поремећаја повезаних са страхом, д) кандидаткиња завршава поглавље прегледом литературе о фармаколошким и бихевиоралним приступима у лечењу анксиозних поремећаја и поремећаја повезаних са страхом и уводи кетамин, истичући његове потенцијале за модулацију процеса гашења страха, уз детаљан приказ механизма деловања кетамина.

У поглављу **Циљеви**, дефинисан је општи циљ докторске дисертације, као и низ специфичних циљева који трагају за одговорима да ли постоје полно-развојне промене у процесу гашења страха, као и који би неуробиолошки „супстрат“ био одговоран за њих. Стога, кандидаткиња посебно истиче испитивање различитих медијатора синаптичке пластичности, уз фокус на глутаматске рецепторе и њихову нисходну сигнализацију. Додатно, један од циљева обухвата и испитивање ефеката кетамина на гашење страха специфично код адолесцентних мужјака, уз анализу утицаја кетамина на одабране компоненте глутаматске сигнализације, фактор раста пореклом из мозга и mTOR сигнализацију. Задати циљеви су структурирани тако да пруже јасан увид у молекулске механизме како полно-развојних разлика у процесу гашења страха, тако и ефеката кетамина на овај процес код адолесцентних мужјака. Такође, постављени циљеви подразумевају и анализу ефикасности кетамина у примењеном животињском моделу, пружајући смернице за његову потенцијалну примену у форми адјувантне терапије класичном когнитивно-бихевиоралном приступу у лечењу анксиозних поремећаја и поремећаја повезаних са страхом.

Поглавље **Материјал и методе** садржи 7 потпоглавља која описују гајење експерименталних животиња, експериментални дизајн, примењене тестове понашања за процену општег локомоторног статуса животиња и за процену усвајања и гашења страха,

имуноблот методу за анализу релативне промене у протеинској експресији одабраних протеина, RT-qPCR методу за анализу генске експресије, имунохистохемијску методу за анализу локализације протеина и статистичку обраду резултата. За потребе ове докторске дисертације коришћени су мишеви C57BL/6J соја, а истраживања су спроведена кроз два експеримента. У првом експерименту, животиње су биле подељене у четири основне групе: адолесцентни мужјаци и женке старости 29 дана и адултни мужјаци и женке старости 70 дана. Одвојене кохорте животиња у оквиру сваке експерименталне групе су анализирани у три временске тачке, тако да је укупан број група износио 12. У овом делу истраживања, животиње су подвргнуте експерименталној парадигми сигналног условљавања страха, где се животиње, у унапред одређеној понављајућој секвенци, излажу упареном условном (звук фреквенције 5 kHz и јачине 70 dB у трајању од 30 секунди) и безусловном стимулусу (електрошок јачине 0,7 mA примењен у последњој секунди трајања условног стимулуса). Након процеса условљавања страха, део животиња је лишен живота уз изолацију ткива хипокампуса за молекулске анализе, док се преостале животиње тестирају на реакцију гашења страха током времена излагањем само условном стимулусу. Ове групе животиња су лишене живота након четири и седам дана гашења страха, након чега су њихови хипокампуси изоловани за даље анализе протеинске и генске експресије. За потребе процене протеинске експресије изолована је груба, непречишћена мембранска фракција која доминантно садржи мембране нервних и глијских ћелија. На овако изолованој фракцији рађена је имуноблот метода. За потребе анализа генске експресије изоловане су укупне информационе РНК које су процесом реверзне транскрипције превеле у ДНК, а потом применом одговарајућих прајмера за гене од интереса, процењена је релативна промена у њиховој експресији. Фокус другог експеримента је била група адолесцентних мужјака, на којој је испитиван ефекат поновљеног третмана кетамином у дози од 10 мг/кг. Експеримент је бројао две експерименталне групе: адолесцентне мужјаке старе 29 дана третиране кетамином, односно физиолошким раствором као носачем. Животиње су по истом принципу као у првом делу биле подвргнуте парадигми сигналног условљавања страха, а потом су сат времена пре сваке сесије гашења страха, која подразумева излагање само условном стимулусу, били третирани интраперитонеалном инјекцијом кетамина. По завршетку четвртог дана, животиње су лишене живота и ткива хипокампуса и пречеоне коре су изолована за даље анализе на исти начин као и у првом експерименту. У овом делу истраживања, молекулске анализе су обухватиле имуноблот методу протеинске експресије, RT-qPCR анализу генске експресије и имунохистохемијску анализу експресије c-Fos маркера неуронске активности.

Поглавље **Резултати** организовано је у две логичке целине које приказују резултате првог експеримента где се испитавала полно-узрасна разлика у гашењу страха и другог експеримента, где је испитиван утицај кетамина на овај процес у групи адолесцентних мужјака. Сви резултати су приказани у виду слика – графикона које прате детаљна објашњења. У првој групи резултата који проистичу из првог експеримента, кандидаткиња

приказује полно-узрастне разлике у процесима усвајања и гашења страха. Као први резултат, приказује се успешност усвајања страха у оквиру одабране експерименталне парадигме (сигнално условљавање страха), кроз мерење времена „замрзавања“ од страха, као главне понашајне реакције на непријатан (безусловни) стимулус. Овде се јасно уочава да адолесценти и адулти и мушког и женског пола једнако ефикасно усвајају страх, што указује на валидност одабране парадигме за даље праћење процеса гашења страха, док нивои измереног времена „замрзавања“ указују на њену ефикасност и потврђују литературне податке. Потом је мерено гашење страха кроз серије излагања животиња условном стимулусу, где је примећена полно-узрастна разлика у понашању. Женке обе узрастне категорије показале су физиолошку реакцију гашења страха, што је било уочено и код адултних мужјака. Са друге стране, код адолесцентних мужјака је уочена смањена ефикасност у погледу гашења реакције страха, где је ова група имала значајно више ниво „замрзавања“ од страха у поређењу са адултним јединкама истог пола. Специфично, забележено је да адолесценти имају измењену консолидацију меморије гашења страха. Потом је уследило испитивање протеинске експресије одабраних параметара глутаматске сигнализације и нисходних путева. Установљено је да постоје значајне промене субјединица глутаматских рецептора осетљивих на *N*-метил-*D*-аспартат, GluA1 субјединице рецептора α -амино-3-хидрокси-5-метил изоксазолпропионске киселине, као и нисходних киназа у хипокампусу, посебно Erk, mTOR и p70S6K киназа, те да је активација ових протеина од кључног значаја за успешно гашење реакција страха код адолесцентних мужјака које се уочава седмог дана у односу на четврти. Поред наведених параметара испитана је генска и протеинска експресија неуротрофног фактора пореклом из мозга који је један од кључних протеина за процесе синаптичке пластичности. Разлике у нивоима експресије одређених егзона указују да они могу имати утицај на иницијално уочен феномен измењене реакције гашења страха код адолесцентних мужјака.

Како су резултати првог експеримента јасно указали на снижену ефикасност гашења страха код адолесцентних животиња мушког пола, кандидаткиња за други експеримент бира специфично адолесцентне мужјаке. Иако ове животиње представљају физиолошки здраве јединке, њихова одложена реакција гашења страха их чини погодним модел системом за испитивање ефикасности фармаколошких третмана попут кетамина, који је коришћен у овој докторској дисертацији. Резултати другог експеримента фокусирали су се на ефекте поновљеног давања кетамина у субанестетским дозама, сат времена пре процене гашења страха. С обзиром на чињеницу да је кетамин анестетик, кандидаткиња је прво испитала његов ефекат на покретљивост и истраживачку активност животиња. Установљено је да у одабраној дози кетамин не утиче на ове процесе, што је омогућило даље приступање анализи гашења страха. Добијени резултати понашања јасно указују да субанестетска доза кетамина побољшава реакцију гашења страха код адолесцентних мужјака у односу на контролне животиње третиране истом запремином физиолошког раствора. Резултати првог експеримента су указали на укљученост испитаних протеина и сигналних путева у хипокампусу у успешно гашење страха код

адолесцентних мужјака. Сходно томе, у другом експерименту су спроведене сличне молекулске анализе. Анализа протеинске експресије у хипокампусу и пречеоној кори показала је да су ефекти које кетамин остварује на нивоу понашања посредовани Akt-mTOR-GluA1 сигналним путем, при чему је под дејством кетамина уочена и повишена експресија GluN2A субјединице глутаматских рецептора осетљивих на *N*-метил-*D*-аспартат. Са друге стране, анализа генске експресије указује на пораст специфично егзона IV фактора раста пореклом из мозга у оба испитивана ткива након примене кетамина, указујући на његов допринос ефектима третмана у моделу сигналног гашења страха. На крају, кандидаткиња је испитала и активацију неурона у хипокампусу и пречеоној кори мишева и то у њена два подрегиона, инфраламбичкој и прелимбичкој кори, применом имунохистохемијског бојења на c-FOS протеин. Резултати показују да након третмана кетаминем долази до активације читавог хипокампуса, док је у случају пречеоне коре уочен феномен латерализације, односно уочена је повећана активација неурона у левој хемисфери, и то специфично у региону инфраламбичке коре.

Свеукупно, резултати приказани у докторској дисертацији одговарају и прате постављене циљеве.

Поглавље **Дискусија** организовано је у укупно пет целина које критички тумаче добијене резултате у погледу постојеће литературе. Кандидаткиња дискусију започиње истицањем значаја адолесцентног периода у погледу психолошког развоја, нарочито са аспекта осетљивости овог развојног периода на различите трауме. У уводном делу, објашњен је и шири значај бихевиоралних резултата добијених у овој докторској дисертацији, укључујући и њихов потенцијалан транслацијски значај. Друго поглавље се осврће на потенцијалне механизме уочених полно-узрасних разлика у процесу гашења страха. Овом приликом, посебан осврт дат је на укљученост хипокампуса у сигнално условљавање и гашење страха. Имајући у виду да је хипокампус у литератури означен као главна структура за контекстуално условљавање и гашење страха, док за сигналне парагидме нема много података о његовом специфичном доприносу, истичу се и новине које ова дисертација доноси у пољу страхом-мотивисаног учења. У овом делу дискусије, испитани сигнални пут NMDA-Erk-mTOR-GluA1 се ставља у контекст процеса који зависе од хипокампуса, попут консолидације меморије, и пружа се темељно образложење на који начин би активација овог сигналног пута могла допринети успешном гашењу реакције страха код адолесцентних јединки. Треће поглавље дискутује уочене ефекте кетамина на процес гашења страха код адолесцентних мужјака, стављајући их у контекст механизма деловања кетамина у постојећим парадигмама условљавања и гашења страха код експерименталних животиња. У четвртм делу, акценат се ставља на Akt-mTOR-GluA1 сигнални пут и како кетамин утиче на активацију овог пута, који поспешује гашење страха код адолесцентних мужјака. Коначно, у последњем делу, уочени молекулски механизми деловања кетамина стављају се у контекст регионалне активације структура од значаја за испитиване процесе, те се посебно дискутује активација хипокампуса и пречеоне коре. Веома интересантна налаз да се активира једна хемисфера у оквиру пречеоне коре

поткрепљена је и другим студијама, и стављена је у контекст анатомских веза пречеоне коре и бадемастих једара, као и пречеоне коре и вентралног хипокампуса.

У поглављу **Закључци** јасно су и концизно изведени закључци који су конципирани тако да дају одговоре на постављене циљеве и сумирани су у пет тачака:

- 1) Адолесцентни мишеви мушког пола имају нарушено гашење страха у поређењу са адултним животињама, док код женки нису уочене промене у понашању између испитиваних старосних група. Смањена ефикасност процеса гашења реакција страха код адолесцентних мужјака успешно је превазиђена повећаним бројем сесија учења;
- 2) Успешно гашење реакције страха код адолесцентних мужјака повезано је са активацијом NMDA-Erk-mTOR-GluA1 сигналног пута у хипокампусу, што истиче значај интеракције глутаматске и mTOR сигнализације за одвијање овог процеса у адолесцентној популацији;
- 3) Субанестетска доза кетамина (10 мг/кг) успешно побољшава гашење страха код адолесцентних мужјака, кроз модулацију консолидације меморијских процеса;
- 4) Позитивни ефекти кетамина на гашење страха код адолесцентних мужјака праћени су активацијом Akt-mTOR-GluA1 сигналног пута у хипокампусу, што упућује модулацијски ефекат кетамина на процесе синаптичке пластичности;
- 5) Позитивни ефекти кетамина на гашење страха код адолесцентних мужјака повезани су са активацијом читавог хипокампуса, као и појачаном активацијом леве инфралимбичке коре, што указује да кетамин подстиче активацију можданих структура укључених у регулацију страха.

Поглавље **Литература** садржи 373 библиографске јединице цитиране у тексту.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Glavonic E**, Mitic M, Adzic M. (2022) Hallucinogenic drugs and their potential for treating fear-related disorders: Through the lens of fear extinction. *J Neurosci Res.* 100(4):947-969. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35165930/> doi: 10.1002/jnr.25017. (IF₂₀₂₂)=4.2 **M22**
2. **Glavonic E**, Mitic M, Francija E, Petrovic Z, Adzic M. (2023) Sex-specific role of hippocampal NMDA-Erk-mTOR signaling in fear extinction of adolescent mice. *Brain Res Bull.* 192:156-167. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36410566/> doi: 10.1016/j.brainresbull.2022.11.011. (IF₂₀₂₂=3.8) **M22**
3. **Glavonic E**, Dragic M, Mitic M, Aleksic M, Lukic I, Ivkovic S, Adzic M. (2024) Ketamine's Amelioration of Fear Extinction in Adolescent Male Mice Is Associated with the Activation of

the Hippocampal Akt-mTOR-GluA1 Pathway. *Pharmaceuticals (Basel)*. 17(6):669. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38931336/> doi: 10.3390/ph17060669. (IF₂₀₂₄=4.3) **M21**

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Glavonic E**, Petrovic Z, Francija E, Mitic M, Brkic Z, Milosavljevic M, Adzic M. Fear extinction deficits in adolescent males can be rescued by prolonged extinction training. FENS Regional meeting, 2019, Belgrade, Serbia. **M34**

2. **Glavonic E**, Aleksic M, Francija E, Mitic M, Lukic I, Ivkovic S, Adzic M. Ketamine ameliorates fear extinction learning in adolescent males via hippocampal mTOR signaling. 8th Congress of Serbian Neuroscience Society with International Participation, 2023, Belgrade, Serbia. **M34**

Провера оригиналности докторске дисертације

Докторска дисертација кандидаткиње **Емилије Б. Главонић**, број индекса Б3010/2017 под насловом „**Молекулски механизми учења и памћења страха и њихова модулација кетамином код адолесцентних мишева**“ послата је дана 3.10.2024. године на софтверску проверу обима и садржине подударања текста са другим текстовима који су Универзитетској библиотеци „Светозар Марковић“ доступни за поређење. Извештај о подударности ментор је добио истог дана.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Молекулски механизми учења и памћења страха и њихова модулација кетамином код адолесцентних мишева**“, аутора **Емилије Б. Главонић**, констатујемо да утврђено подударање текста износи 8 %. Овај степен подударности последица је личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидаткиње **Емилије Б. Главонић** под насловом „**Молекулски механизми учења и памћења страха и њихова модулација кетамином код адолесцентних мишева**“ те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Сагледавајући докторску дисертацију докторандкиње **Емилије Б. Главонић**, оригиналне резултате њених истраживања, као и публикације које су директно произашле из њеног експерименталног рада, Комисија закључује да је завршена докторска дисертација испунила предмет и циљеве истраживања дефинисане у предлогу теме, као и да су постигнути резултати донели очекивани научни допринос. Резултати докторске дисертације објављени су у виду два научна рада категорија 1×M21 + 1×M22. Додатно, захваљујући изузетном теоријском познавању теме доктората и високом степену компетентности докторандкиње, као резултат рада на овој докторској дисертацији објављен је и један ревијски рад M22 категорије. На основу увида у резултате и закључке ове докторске дисертације, као и у научне публикације проистекле из њених резултата, Комисија закључује да су се стекли услови за одбрану предметне докторске дисертације. Стога, Комисија једногласно предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета – Универзитет у Београду да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Емилије Б. Главонић** под насловом „Молекулски механизми учења и памћења страха и њихова модулација кетаминном код адолесцентних мишева“ и проследи га Већу области природних наука Универзитета у Београду на усвајање.

У Београду, 4.10.2024. године

КОМИСИЈА:

др Милош Митић, виши научни сарадник,
Институт за нуклеарне науке Винча,
Универзитет у Београду,
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Сања Ивковић, виши научни сарадник,
Институт за нуклеарне науке Винча,
Универзитет у Београду,
Институт од националног значаја за Републику Србију

др Милорад Драгић, научни сарадник,
Универзитет у Београду-Биолошки факултет