

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Teodora F. Vidonja Uzelac

**EFEKAT IBOGAINA NA SISTEM
ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U
PERIFERNIM TKIVIMA I
KONTRAKTILNOST TERMINALNOG
ILEUMA KOD MUŽJAKA PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Teodora F. Vidonja Uzelac

**EFFECT OF IBOGAININE ON
ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEM IN
PERIPHERAL TISSUES AND TERMINAL
ILEUM CONTRACTILITY IN MALE RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Podaci o mentorima i članovima komisije

Mentor: dr sci. Duško Blagojević, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Komentor: dr sci. Milica Bajčetić, profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

Članovi komisije:

1. dr sci. Tatjana Simić, akad. prof., Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
2. dr sci. Janko Samardžić, docent, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
3. dr sci. Dragana Protić, docent, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet
4. dr sci. Zorana Oreščanin Dušić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
5. dr sci. Danijela Kojić, prof., Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički
fakultet

Datum odbrane _____

ZAHVALNICA

Moja izrazita zahvalnost namenjena je naučnom savetniku dr Dušku Blagojević, koji je u kritičnom vremenskom trenutku pristao da se nađe u ulozi mentora, predložio temu i pružio mi podršku u svim fazama izvođenja eksperimenata i pisanja ovog rada. Zahvaljujući njegovoj podršci i podsticaju doktorska disertacija ima ovaj obim i kvalitet.

Komentoru prof.dr Milici Bajčetić zahvaljujem na pruženoj prilici, podršci u prvim naučnim koracima i prepoznavanju mog afiniteta ka eksperimentalnom i laboratorijskom radu.

Zahvaljujem se akad. prof.dr Tatjani Simić, na konstruktivnim sugestijama u toku pisanja i pomoći da doktorska disertacija dobije ovaj oblik.

Doc.dr Janku Samardžić, doc.dr Dragani Protić i prof.dr Danijeli Kojić se zahvaljujem na izdvojenom vremenu, podršci i savetima tokom pisanja ovog rada.

Višem naučnom saradniku dr Zorani Oreščanin Dušić i naučnom savetniku dr Aleksandri Nikolić Kokić sam posebno zahvalna jer je njihovo znanje i eksperimentalno iskustvo bilo od neprocenjive pomoći za izradu ove teze i moj naučni razvoj. Veoma sam zahvalna za pokazano strpljenje i razumevanje, jer su me primile i prihvatile kao svoju i omogućile mi da se osećam dobrodošlo.

Prof.dr Mihajlu Spasić se zahvaljujem na otvorenosti i pomoći u razumevanju različitih bihemijskih i životnih mehanizama.

Zahvaljujem se istraživaču saradniku Nikoli Tatalović na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, hladnoj glavi, naučnim i svim ostalim razgovorima tokom godina zajedničkog rada.

Zahvaljujem se kolegi naučnom saradniku dr Marku Miler sa Odeljenja za citologiju (IBISS), na velikodušnoj praktičnoj pomoći tokom izvođenja dela eksperimentalnog rada, a potom i tumačenja dobijenih rezultata.

Veliku zahvalnost dugujem prof.dr Milici Mijović, sa Instituta za patologiju (Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini), na dragocenoj pomoći i strpljenju u toku tumačenja dela rezultata, čiji je kvalitet bio ključan kako za samu tezu tako i radove koji su iz nje proistekli. Nadam se i radujem budućoj saradnji.

Višem naučnom saradniku dr Đurđici Ignjatović, sa Odeljenja za biohemiju (IBISS) sam neizmerno zahvalna na pomoći prilikom čuvanja dela uzoraka koji su osnov ove disertacije.

Zahvaljujem se lab. teh. Verici Bogdanović na iskrenoj pomoći i zato što je pokazala da je za uspešnu saradnju potrebno, a često i dovoljno malo dobre volje.

Svaki dan sam beskrajno zahvalna mojim roditeljima, suprugu i deci na sigurnosti koju mi pružaju i njihovoj ljubavi koja je izvor moje snage.

Teodora Vidonja Uzelac

Efekat ibogaina na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima i kontraktilnost terminalnog ileuma kod mužjaka pacova

Rezime

Ibogain, primenjen u jediničnoj oralnoj dozi (1-25 mg/kg telesne mase (t.m)) se koristi kao agens u sprečavanju različitih oblika zavisnosti kod ljudi. Njegovi efekti traju i do 72 h. *Ex vivo* rezultati pokazuju da ibogain izaziva potrošnju energije u ćelijama i njenu restituciju, što je praćeno povećanjem stvaranja reaktivnih vrsta kiseonika i aktivnosti antioksidativne odbrane. Stoga je cilj ovog rada bio da istraži efekte jedinične oralne doze ibogaina (1 ili 20 mg/kg t.m.) na antioksidativnu odbranu u različitim tkivima pacova. Posle 6 i 24 h nakon ingestije ibogaina, histološka ispitivanja su pokazala pojačanu glikogenolitičku aktivnost hepatocita, koja je bila najviša posle 24 h kod životinja koje su primile 20 mg/kg ibogaina. Nije bilo promena u aktivnosti antioksidativnih enzima u jetri ni u eritrocitima u tim periodima što ukazuje na izostanak sistemskog efekta na nivou oksidativnog pritiska. U jetri se povećala aktivnost ksantin oksidaze kod pacova koji su primili ibogain u dozi od 20 mg/kg u poređenju sa kontrolama što ukazuje na brži obrt adenozina. Nivo TBARS u jetri je povišen kod grupe tretirane sa 1 mg/kg posle 24 h u poređenju sa kontrolama što sugerise postojanje umerenog oksidativnog stresa. U srcu je utvrđeno da ibogain nakon 6 h smanjuje količinu proteinskih -SH grupa što ukazuje na unutar-proteinsku oksidaciju, koja zajedno sa narušenom energetsom homeostazom može dovesti do promena u srčanom radu i nastanka diskretnih oštećenja. Ibogain inhibira *ex vivo* kontraktilnost ileuma u nivou doza ispod mM, pri čemu je efekat kod električne stimulacije, u odnosu na toničnu, značajno veći. Rezultati pretretmana na ileumu *ex vivo* ukazuju da ibogain svoje dejstvo ostvaruje delimično preko K_{ATP} kanala. Ibogain izaziva u ileumu *ex vivo* povećanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (KAT), ali se ti efekti gube dodavanjem glibenklamida. Ibogain menja i redoks

ravnotežu u testisima, a nađeno povećanje aktivnosti SOD ukazuje na delikatnost očuvanja balansa koncentracija superoksida i vodonik peroksida koja se smatra krucijalnom u procesu kapacitacije spermatozoida. Rezultati pokazuju da ibogain u primenjenim dozama utiče na redoks status posmatranih tkiva i menja aktivnost antioksidativne odbrane, ali je odgovor visoko tkivno, dozno i vremenski specifičan, bez jasne zajedničke karakteristike.

Ključne reči: antioksidativni enzimi, ibogain, glikogen, ileum, kalijumovi kanali, glibenklamid

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Medicinska farmakologija

Effect of ibogaine on antioxidative defense system in peripheral tissues and terminal ileum contractility in male rats

Abstract

Ibogaine, administered as a single oral dose (1-25 mg/kg body weight, (b.w.)), has been used as an addiction-interrupting agent. Its effects persist for up to 72 h. *Ex vivo* results showed that ibogaine induced cellular energy consumption and restitution, followed by increased reactive oxygen species production and antioxidant activity. Therefore, the aim of this work was to explore the effect of a single oral dose of ibogaine (1 or 20 mg/kg b.w.) on antioxidative defenses in different rat tissues. Six and 24 h after ibogaine administration, histological examination showed glycogenolytic activity in hepatocytes, which was highest after 24 h in animals that received 20 mg/kg ibogaine. There were no changes in the activities of antioxidant enzymes in the liver and erythrocytes after ibogaine treatment, regardless of the dose. These results suggest there were no systemic ibogaine effects regarding antioxidant defense. Hepatic xanthine oxidase activity was elevated in rats that received 20 mg/kg compared to the controls, suggesting faster adenosine turnover. TBARS concentration was elevated in the group treated with 1 mg/kg after 24 h compared to the controls, suggesting mild oxidative stress. It was shown that ibogaine in heart after 6 h diminished the amount of protein -SH groups suggesting intra-protein oxidation, which along disturbed energetic homeostasis could lead to discrete cellular oxidative damages and possible heart failure. Ibogaine inhibited *ex vivo* ileum contractile activity with doses below mM. The effect was stronger in electrically stimulated contractions than tonic. Pretreatment with different potassium channel related agents showed that ibogaine obtained its inhibitory activity partially through K_{ATP} channels. Ibogaine induced the elevation of superoxide dismutase (SOD), catalase activity

ex vivo, but this effect was diminished by addition of glibenclamide. Ibogaine changed redox homeostasis in testicles as well, and elevated SOD activity suggested the importance of the preservation of delicate balance of superoxide and hydrogen peroxide concentrations that is crucial in sperm capacitation. Our results showed that ibogaine in doses applied *in vivo per os* influenced redox state and changed antioxidant activity, but response is highly tissue-, dose- and time- specific, without clear common characteristic.

Key words: antioxidant enzymes, ibogaine, glycogen, ileum, potassium channels, glibenclamide

Scientific field: Medicine

Major in: Medical Pharmacology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ibogain	1
1.2. Enzimi antioksidativne zaštite	4
1.2.1. Superoksid dismutaza (SOD)	6
1.2.2. Katalaza (KAT)	7
1.2.3. Glutation peroksidaza (GSH-Px)	8
1.2.4. Glutation reduktaza (GR)	9
1.2.5. Glutation S transferaza (GST)	10
1.3. Ileum	11
1.4. Mehanizam kontrakcije glatkih mišića	12
1.5. Jonski kanali	13
1.5.1. Voltažno zavisni jonski kanali	13
1.5.2. Kalcijum-zavisni kalijumovi kanali (K_{Ca})	14
1.5.3. Kalijumovi ATP zavisni kanali (K_{ATP})	14
1.6. Značaj ispitivanja efekata ibogaina na aktivnost antioksidativnih enzima	15
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJAL I METODE	17
3.1. Dizajn <i>in vivo</i> eksperimenta	17
3.2. Izolovanje tkiva	18
3.3. Priprema plazme i eritrocita	18
3.4. Priprema tkiva za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima	18
3.5. Priprema tkiva za merenje koncentracije TBARS i -SH grupa	19
3.6. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima	19
3.7. Određivanje koncentracije hemoglobina u krvi	20
3.8. Uklanjanje hemoglobina iz hemolizata krvi	21
3.9. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane	21
3.9.1. Ukupna superoksid dismutaza (SOD)	21
3.9.2. Mangan superoksid dismutaza (SOD2)	23
3.9.3. Katalaza (KAT)	23

3.9.4. Glutation peroksidaza (GSH-Px)	25
3.9.5. Glutation reduktaza (GR)	27
3.9.6. Glutation S transferaza (GST)	28
3.10. Ksantin oksidaza (XOD)	28
3.11. Određivanje koncentracije TBARS	29
3.12. Određivanje koncentracije slobodnih -SH grupa	30
3.13. Priprema tkiva za histološku analizu	31
3.14. Bojenje preparata	31
3.14.1. Jetra	32
3.14.2. Bubrezi	32
3.14.3. Srce	33
3.15. Merenje koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi	33
3.16. Analiza urina, merenje koncentracije glukoze u krvi	34
3.17. Dizajn <i>ex vivo</i> eksperimenta	34
3.18. Obrada farmakoloških podataka	36
3.19. Statistička obrada rezultata	37
4. REZULTATI	39
4.1. Efekat ibogaina na aktivnost antioksidativnih enzima, XOD, koncentraciju TBARS, -SH grupa i histološka analiza	39
4.1.1. Metabolička tkiva	39
4.1.1.1. Jetra	39
4.1.1.2. Bubrezi	46
4.1.2. Kontraktilna tkiva	51
4.1.2.1. Srce	51
4.1.2.2. Ileum	56
4.1.3. Ostala tkiva	59
4.1.3.1. Slezina	59
4.1.3.2. Testisi	62
4.1.3.3. Pluća	65
4.1.3.4. Eritrociti	68
4.2. Koncentracija ibogaina i noribogaina u plazmi	69
4.3. Koncentracija glukoze u krvi, količina konzumirane hrane i vode i	

parametri urina _____	69
4.4. Efekat ibogaina na izolovani ileum _____	70
4.4.1. Izolovani ileum, tonične kontrakcije _____	70
4.4.2. Izolovani ileum, električne stimulacije (ES) _____	74
4.4.3. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u izolovanom ileumu _____	77
5. DISKUSIJA _____	79
6. ZAKLJUČCI _____	96
7. LITERATURA _____	97

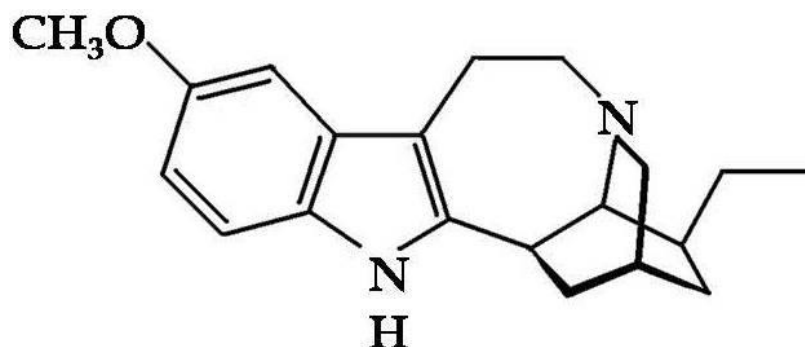
1. UVOD

1.1. Ibogain

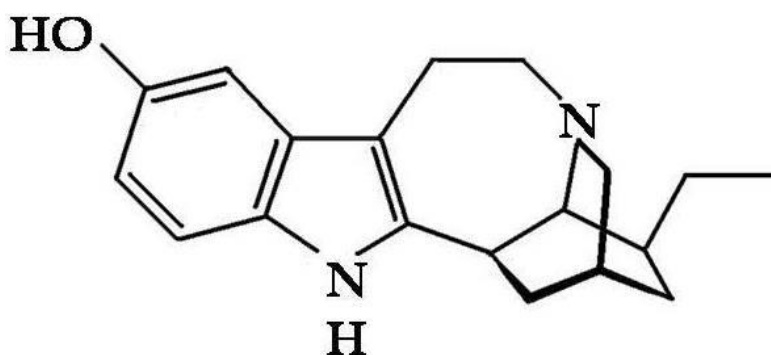
Ibogain je alkaloid (slika 1A), izolovan iz kore korena žbunaste biljke *Tabernanthe iboga* koja raste u zapadnom delu centralne Afrike (Alper, 2001; Popik i sar., 1995). U afričkim plemenskim zajednicama koristi se za održavanje budnosti tokom noćnog lova i straži, prevazilaženja osećaja umora, gladi i žeđi kao i u religijske svrhe (Alper, 2001; Popik i sar., 1995). U zemljama zapadne Evrope i Amerike, gde je razvijena „ibogainska medicinska subkultura“ (Alper i sar., 2008), ibogain se koristi za olakšavanje simptoma apstinencionog sindroma (Popik i sar., 1995). Najčešće se primenjuje u vidu jedne doze 1-25 mg/kg telesne mase (t.m.) *per os* (Popik i sar., 1995; Alper i sar., 2008; Sheppard 1994). Američka uprava za hranu i lekove (*eng.* U.S. Food and Drug Administration, FDA) je 1995. odobrila Fazu I kliničke studije za ispitivanje farmakokinetike i bezbednosti ibogaina na muškim volonterima, a korišćene su doze 1-4 mg/kg (Mash i sar., 1998; Alper i sar., 2008). U Kliničkom vodiču za detoksifikaciju, pomognutu ibogainom (Clinical Guidelines for Ibogaine-Assisted Detoxification, 2016) koji je 2016. objavila Global Ibogaine Therapy Alliance (GITA), savetuje se upotreba inicijalne doze ibogaina od 1-5 mg/kg, 2-3 h pre primene veće terapijske doze kao i da ukupna primenjena dnevna doza ne prelazi 24 mg/kg. Glue i saradnici (Glue i sar., 2015) navode da je doza od 20 mg/kg bezbedna (ispitivanje je urađeno na zdravim muškim volonterima).

Kao neželjena dejstva navode se mučnina, povraćanje, tremor i kao najozbiljniji, produžen QT interval koji može dovesti do srčanih aritmija i smrti (Hoelen i sar., 2009; Pleskovic i sar., 2012; Paling i sar., 2012; Meisner i sar., 2016). Potvrđeno je na kardiomiocitima zamorca da ibogain u nižim μM koncentracijama blokira hERG (I_{Kr}) (kanali koji imaju ulogu u fazi repolarizacije) kanale (Koenig i sar., 2013), ali ne produžava trajanje akcionog potencijala.

A)



B)



Slika 1. Struktura A) ibogaina i B) noribogaina

Nakon *per os* primene ibogain se metaboliše u jetri pomoću enzima citohrom P-450(2D6) i prelazi u noribogain (slika 1B) (Obach i sar., 1998; Baumann i sar., 2001), svoj aktivni metabolit koji se eliminiše iz organizma znatno sporije od ibogaina (Glue i sar., 2016). Ibogain (20 mg/kg, *per os*, kod ljudi) svoju maksimalnu koncentraciju postiže nakon 1 h (C_{\max} = 1,1 ng/ml, $t_{1/2}$ =2,5 h), a nakon 4 h od primene ibogain se više ne detektuje u plazmi. Maksimalna koncentracija noribogaina se detektuje u plazmi nakon 4 h (C_{\max} = 18,7 ng/ml, $t_{1/2}$ = 13 h) (Glue i sar; 2015). Eliminacija ibogaina se odvija kroz creva i bubrege (Alper, 2001).

Ibogain se vezuje za: **receptore** - agonista je 5-hidroksitriptaminskih 2A receptora (5-HT_{2A}) (Helsley i sar; 2001), opioidnih kapa (Deccher i sar; 1992),

sigma 2 (Mach i sar., 1995) i mi receptora (Alper, 2001); antagonista N-metil-D-aspartat (NMDA) (Chen i sar., 1996), nikotinskih (Schneider i sar., 1996) i muskarinskih (M₁ i M₂) receptora (Alper, 2001); **transportere transmitera** – antagonista je dopaminergičkih i 5-HT transportera (Alper, 2001); **enzime koji učestvuju u metabolizmu transmitera** – inhibira mono-amino-oksidadu (MAO) (Alper, 2001).

U *in vitro* eksperimentima urađenim na kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (što je prihvaćeni model sistem za proučavanje puteva bazalnog metabolizma kod viših eukariota, uključujući i sisare (Ma, 2001)) koji nema receptore za koje bi se ibogain vezivao, pokazano je da ibogain ima efekte na energetski metabolizam, posredovan ATP-om. Kvasac je inkubiran sa ibogainom (koncentracije 1 mg/l, u medijumu) i pokazano je da dolazi do izlaska ATP iz ćelije, povećanja produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (*eng.* reactive oxygen species, ROS) (Paškulin i sar., 2010) i proizvodnje CO₂ (Paškulin i sar., 2012).

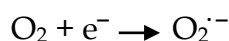
U *in vivo* istraživanjima pacovi su tretirani ibogainom (20 mg/kg t.m., i.p.) i nakon 24 i 72 h analizirani su proteini u mozgu. Pokazano je povećanje količine enzima glikolitičkog (gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenaze, aldolaze A, piruvat kinaze) i TCA ciklusa, što ukazuje na aktivaciju Krebsovog ciklusa (Paškulin i sar., 2006). Na kvascu je potvrđeno povećanje ovih enzima, a uz to je pokazano i povećanje količine bakar-cink superoksid dismutaze (SOD1) 5 h nakon izlaganja ibogainu, koncentracije 1 mg/l (Paškulin i sar., 2010). U istom eksperimentu je pokazano da ibogain dovodi do povećanja ROS unutar ćelija kvasca, nakon 1 h od izlaganja, zatim sledi izraziti pad u narednih sat vremena, da bi nakon 5 h ROS bile na kontrolnom nivou. Na humanim eritrocitima je potvrđeno povećanje aktivnosti SOD1 i glutation reduktaze (GR), a pokazano je i otpuštanje ATP-a u ekstraćelijski prostor (Nikolić-Kokić i sar., 2015). Sam ibogain nema antioksidativna svojstva, što je utvrđeno 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (*eng.* 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) testom (Paškulin i sar., 2012), ali je postuliran kao pro-antioksidant.

Smatra se da ibogain prazni ćelijske depoe ATP-a, što pokreće proces oksidativne fosforilacije, a u tom procesu nastaje ROS, CO₂ i ATP kao finalni proizvod. Povećanje ROS, konkretno superoksida (O₂^{·-}) aktivira enzim SOD i aktivira ostale enzime sistema antioksidativne zaštite.

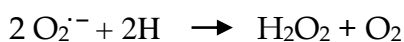
Do sada je pokazano da ibogain na koncentracijski-zavisani način inhibira holinergičke kontrakcije na terminalnom ileumu zamorca (Munday i sar., 2000). Takođe je pokazano inhibitorno delovanje ibogaina na kontraktilnu aktivnost spontano aktivnog i Ca²⁺ stimulisaniog uterusa (Oreščanin-Dušić i sar., 2018), pri čemu se aktivnost enzima oksidativnog stresa menja u odnosu na primenjenu koncentraciju ibogaina, dok ne dolazi do promene u količini enzima. Pri nižim koncentracijama dolazi do smanjenja aktivnosti SOD1 i povećanja glutation peroksidaze (GSH-Px), dok pri višim koncentracijama, koje dovode do potpune inhibicije kontraktilnosti uterusa, smanjuje se aktivnost SOD1, višestruko povećava aktivnost katalaze (KAT), a dolazi do pada aktivnosti GSH-Px.

1.2. Enzimi antioksidativne zaštite

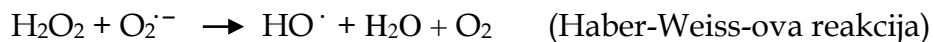
U ćelijama aerobnih organizama, u procesu oksidativne fosforilacije koja se odvija na unutrašnjoj membrani mitohondrija nastaje ATP, u matriksu mitohondrija se oslobađa CO₂ (u toku Krebsovog ciklusa), a krajnji akceptor elektrona je kiseonik koji se redukuje do vode. Za potpunu redukciju kiseonika potrebno je 4 e⁻, dok u slučaju redukcije manjim brojem nastaju reaktivne vrste kiseonika (*eng.* reactive oxygen species, ROS) (Taverne i sar., 2018). Kad se molekularni kiseonik redukuje jednim e⁻ nastaje superoksid anjon radikal (O₂^{·-}), koji može ostati u matriksu mitohondrija ili izaći u citoplazmu (St Pierre i sar., 2002; Kudin i sar., 2005).



Povećana koncentracija O₂^{·-} aktivira SOD koja ga prevodi u vodonik peroksid (H₂O₂):



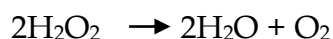
Također, H₂O₂ može nastati direktno, redukcijom kiseonika sa 2 e⁻ ili redukcijom O₂^{·-} jednim e⁻. Po svojoj strukturi nije radikal, jer nema nesparene e⁻, ali je jako oksidaciono sredstvo. U reakciji sa O₂^{·-} nastaje hidroksil radikal HO[·]:



U reakciji sa jonima metala (Fe²⁺, Cu⁺) također nastaje OH[·] kao i hidroksil anjon (OH⁻):



Prisustvo H₂O₂ u ćelijama aktivira enzime koji dovode do njegovog uklanjanja iz ćelije. Enzimi KAT i GSH-Px dalje prevode H₂O₂ u H₂O (kiseonika redukovano sa 4 e⁻).



Prvo se aktivira GSH-Px, a pri višim koncentracijama H₂O₂ aktivira se KAT. GSH-Px kao supstrat koristi redukovani glutation (GSH) koji se prevodi u oksidovani GS-SG. H₂O₂ učestvuje u ćelijskoj proliferaciji kao signalni molekul. Enzim glutation reduktaza (GR) redukuje GS-SG do GSH i time ga vraća u reakciju. Povećana koncentracija ROS u ćeliji dovodi do narušavanja oksidativne ravnoteže, oksidativnog stresa (Taverne i sar., 2018). Međutim, uloga reaktivnih vrsta nije ograničena samo na oštećenja ćelijskih struktura (proteina, lipida, DNK) već ima značajnu ulogu u ćelijskim signalnim putevima (Fridovich, 1978).

Tokom evolucije aerobni organizmi su razvili efikasan sistem antioksidativne zaštite (*eng.* antioxidative system, AOS) protiv ROS-a (Saltman, 1989; Sies, 1986). Enzimsku komponentu AOS-a čine SOD, KAT GSH-Px, GR, glutation-S-transferaza (GST).

1.2.1. Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza je enzim koji katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikal u kiseonik (O₂) i vodonik peroksid (H₂O₂) (McCord i Fridovich, 1969).

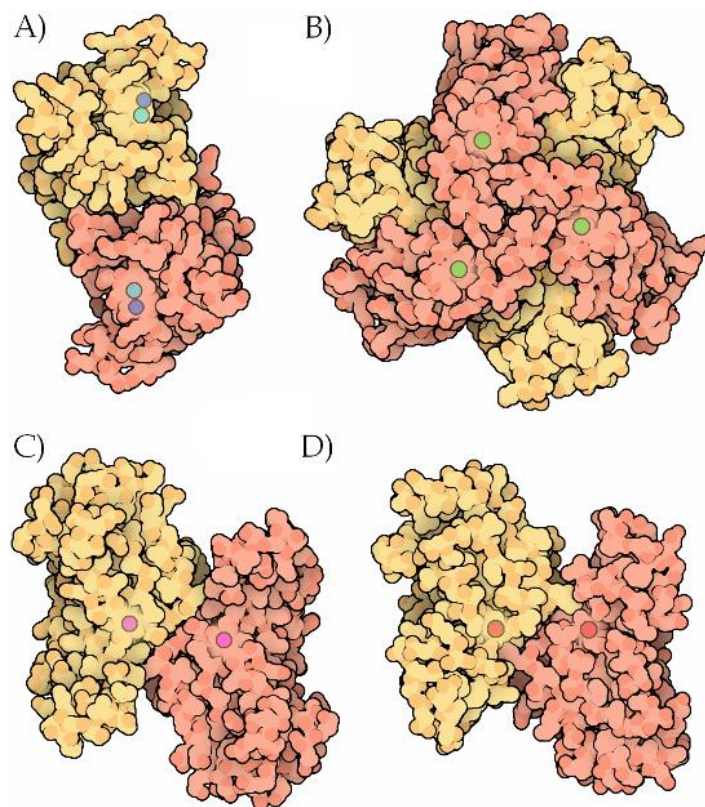


Na osnovu jona metala koji se nalazi u aktivnom centru enzima razlikuju se CuZnSOD, MnSOD, FeSOD i NiSOD (slika 2). Ove klase SOD međusobno se razlikuju i na osnovu tercijarne strukture, međutim mehanizam delovanja je sličan jer se prilikom reakcije metalni jon u aktivnom mestu prvo redukuje a potom reoksiduje. CuZnSOD (SOD1) se nalzi u citosolu, između spoljašnje i unutrašnje membrane mitohondrija i endoplazmatičnom retikulumu. Grade ga dve identične subjedinice i svaka u svom aktivnom mestu ima jon bakra (Cu²⁺) i jon cinka (Zn²⁺). Reakcija se odvija u dva koraka i učestvuju dva O₂^{·-}. U prvom koraku Cu²⁺ se redukuje do Cu⁺ pri tome se jedan O₂^{·-} oksiduje do molekulskog kiseonika (O₂). U drugom koraku Cu⁺ se oksiduje do Cu²⁺ a drugi O₂^{·-} uz utrošak 2 vodonikova jona, redukuje do vodonik peroksida. MnSOD (SOD2) (slika 2C) i FeSOD (slika 2D) su slične građe, sa po jednim jonom metala (Mn³⁺/Fe³⁺) u aktivnom mestu svake subjedinice.

MnSOD se nalazi u mitohondrijama eukariota u vidu tetramera i bakterija u formi dimera. FeSOD je nađena u bakterijama, primitivnim eukariotima i plastidima biljaka (Perry i sar., 2010).

NiSOD (slika 2B) je heksamerni protein kod koga se u aktivnom mestu nalazi jon Ni, a karakterističan je za prokariotske organizme (Youn i sar., 1996).

Pored SOD1 koja je citosolna i SOD2 koja je mitohondrijalna, postoji i ekstracelularna SOD (SOD3) (Tibel i sar., 1987) u likvoru, limfi, krvnoj plazmi i tečnosti zglobova. To je tetramerni protein koji pruža zaštitu od O₂^{·-} koji je nastao ekstraćelijski (Warner i sar., 2004).



Slika 2. Superoksid dismutaza A – CuZnSOD, B – NiSOD, C- MnSOD, D- FeSOD

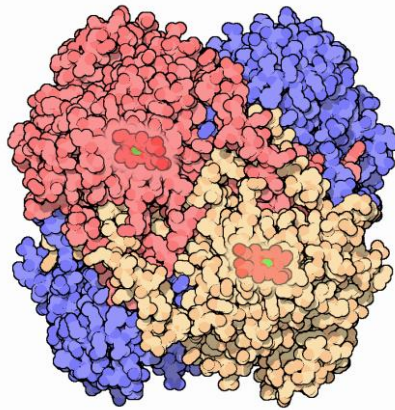
(preuzeti i adaptirano sa <https://pdb101.rcsb.org/motm/94>)

1.2.2. Katalaza (KAT)

Katalaza (slika 3) je tetramerni enzim koji u aktivnom centru ima Fe-III protoporfirin i NADPH. Reakcija razlaganja vodonik peroksid na vodu i kiseonik se odvija u dva koraka.



U prvom koraku jedan molekul H_2O_2 se redukuje do vode, pri čemu se Fe(III) oksiduje do Fe(IV). U drugom koraku još jedan molekul H_2O_2 ulazi u reakciju, nastaje još jedan molekul vode, ali i kiseonik, a Fe(IV) se redukuje ponovo do Fe(III).



Slika 3. Katalaza

(preuzeto sa <https://pdb101.rcsb.org/motm/57>)

Najviše enzima ima u peroksizomima gde je i najveća aktivnost. Takođe je ima u endoplazmatičnom retikulumu, mitohondrijama, a u eritrocitima se nalazi u citosolu. Kako je za katalitičku aktivnost katalaze potrebno prisustvo dva molekula H_2O_2 , njena efikasnost je izraženiji pri višim koncentracijama supstrata (Saltman, 1989).

1.2.3. Glutation peroksidaza (GSH-Px)

Glutation peroksidaza (GSH-Px) nalazi se u citosolu, peroksizomima, mitohondrijama (intermembranski prostor) u gotovo svim ćelijama. Katalizuje redukciju vodonik peroksida (H_2O_2) do vode. Kao kofaktor koristi glutation (GSH).

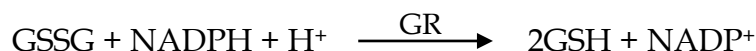


GSH-Px ima veći afinitet za vodonik peroksid od katalaze, tako da ima važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama vodonik peroksida. Do sada je izolovano više različitih izoformi koje se razlikuju po distribuciji u organizmu i/ili afinitetu za supstrat. GSH-Px 1 je najzastupljenija i nalazi se u citoplazmi skoro svih sisarskih ćelija. GSH-Px 2 se nalazi u

gastrointestinalnom traktu i ekstracelularno, dok je izofoma GSH-Px 3 zastupljen u plazmi. GSH-Px 4 je za razliku od ostalih monomerni protein (ostali su homotetrameri) i redukuje fosfolipidne hidroperokside (Thomas i sar., 1990). Svaka subjedinica u svom aktivnom centru sadrži selen u obliku selencisteina. Izolovano je 5 izoformi koje imaju različitu distribuciju u organizmu: citosol, gastrointestinalna, ekstracelularna u plazmi i bubrezima i još 2 koji nisu selen zavisne.

1.2.4. Glutation reduktaza (GR)

Glutation reduktaza se nalazi u citosolu i mitohondrijama eukariotskih ćelija. Katalizuje konverziju oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovanog glutation (GSH), a kao redukujući ekvivalent koristi NADPH (Heffner i Repine, 1989).



GR je homodimerni flavoprotein (u reakciji koristi vezani FAD), obe subjedinice (svaka ima 4 domena) učestvuju u formiranju aktivnog mesta. U aktivnom centru ima redoks aktivan disulfid (od njega zavisi aktivnost enzima). Svaka subjedinica sadrži prostetičku grupu flavin adenin dinukleotid (FAD).

Katalitički ciklus GR

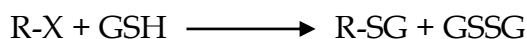
I faza: NADPH redukuje FAD, pri čemu se redukujući ekvivalent prenosi na redoks aktivan disulfid

II faza: redukuje se GSSG u aktivnom centru enzima

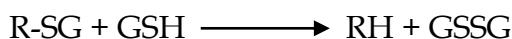
GR ima značajnu ulogu u regulaciji redoks homeostaze u ćeliji. Inaktivira se redukcijom sopstvenog elektron donora, NADPH. Ova autoinaktivacija od strane NADPH i reaktivacija GSSG-om ima važnu regulatornu ulogu. Aktivnost GR odražava fiziološke potrebe ćelije.

1.2.5. Glutation S transferaza (GST)

Glutation transferaze (GST) su velika superfamilija proteina sa brojnim katalitičkim i nekatalitičkim funkcijama. Postoje kod svih eukariota i bakterija, a samo kod ljudi detektovano je najmanje 18 različitih GST (Atkinson i Babbitt, 2009). U citoplazmi i mitohondrijama nalaze se kao solubilni enzimi, dok treću klasu čine mikrozomalne GST koje pripadaju klasi membranskih proteina (*eng.* membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism, MAPEG). Citosolne GST sisara se razlikuju prema afinitetu za različite supstrate, te su i podeljene u više grupa, označene kao: alfa, mu, kapa, sigma, teta, pi, zeta, omega. Glavna uloga im je detoksifikacija različitih ksenobiotika, lekova i hemoterapeutika (Pljesa-Ercegovac i sar., 2018), kao i inaktivacija endogenih nezasićenih aldehida, vodonik peroksida, epoksida i hinona (Bolt, 1994, Hayes i sar., 2005). Pored toga GST sigma uključene su u sintezu prostaglandina, dok GST alfa ima ulogu u sintezi polnih hormona (progesterona i testosterona). GST mu i pi imaju ulogu u regulaciji signalnih puteva unutar ćelije (put mitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze) (Atkinson i Babbitt, 2009). GST učestvuju i u degradaciji tirozina (Hayes i sar., 2005). Ekspresija i aktivnost pojedinih članova GST izofamilija (profil izoenzima GST) je i visoko tkivno specifična (Hayes i sar., 2005, Simić i sar., 2001). Reakcija GST sa supstratom ima dve faze. U prvoj enzim GST katalizuje nukleofilni napad redukovanog glutationa (GSH) na nepolarni supstrat (R-X). Nastaje konjugat (R-SG) koji je nestabilan, a glutation prelazi u oksidovanu formu (GSSG).

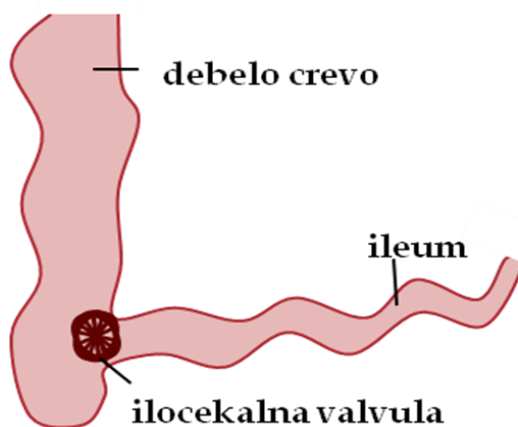


U drugoj fazi nastali konjugat reaguje sa još jednim molekulom glutationa (GSH) i nastaje stabilan netoksičan produkt (RH).



1.3. Ileum

Ileum je deo gastrointestinalnog trakta (GIT) i pripada zadnjem delu tankog creva, a od debelog creva je odvojen ilocekalnom valvulom (slika 4). Na



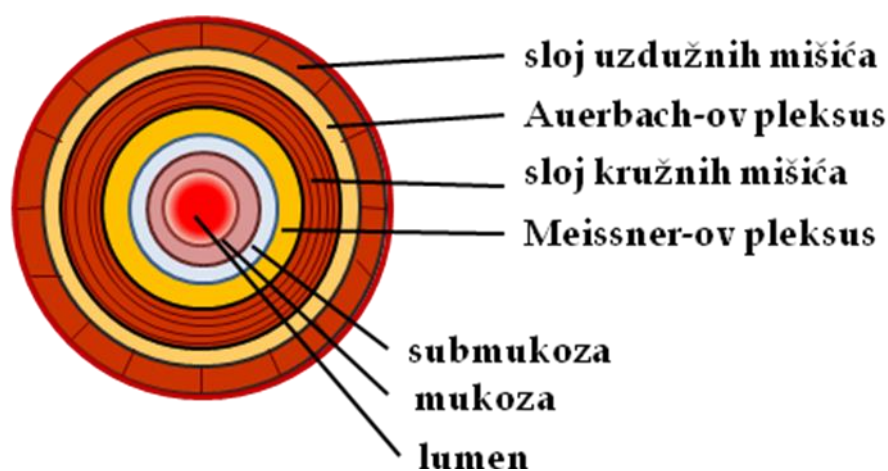
Slika 4. Šematski prikaz prelaza ileuma u debelo crevo

površini ileuma koja je okrenuta ka lumenu creva nalaz se sloj epitelnih ćelija. Ispod su redom mukoza, submukoza, submukozni (Meissner-ov) pleksus, potom sloj kružnih mišića, mijenterični (Auerbah-ov) pleksus i sloj longitudinalnih mišića (slika 5). Kontrakcije mišićnih slojeva dovode do mešanja hrane i njenog pomeranja ka krajnjim delovima GIT-a, što je označeno kao peristaltika creva (Johnson, 2012). Submukozni pleksus kontroliše sekreciju i apsorpciju, dok je mijenterični pleksus odgovoran za kontrolu motiliteta creva. Submukozni i mijenterični pleksus su međusobno povezani i čine enterični nervni sistem (Monro i sar., 2004). Kroz ovo tkivo električni signal se brzo prenosi jer su ćelije povezane pukotinastim vezama.

Postoje pejsmejkerski regioni u kojima kontrakcije nastaju spontano i u pravilnom ritmu. Kontrakcije glatkih mišića mogu biti izazvane nervnom stimulacijom, nervnim impulsom, istežanjem (opterećenjem), strujom pukotinastih veza, humoralnim agensima (Sherwood, 2010). Membrana glatkog mišića sadrži specifične mikrodomene koji se nazivaju lipidni raftovi, bogati

holesterolom i sfingolipidima. Na površini sarkoleme nalaze se različiti receptori: muskarinski, adrenergički, serotoniniski, receptori za prostacakline, endotelin, G proteine, kinaze i jonski kanali (Johnson, 2012). Kaveole su često u blizini sarkoplazmatičnog retikuluma ili mitohondrija što ukazuje na njihovu metaboličku ulogu (Bergdahl i Sward, 2004).

Proces stvaranja ROS se dešava i u izolovanom ileumu koji koristi ATP dobijen putem oksidativne fosforilacije za svoje kontrahovanje (Mitrović i sar., 2000).



Slika 5. Šematski prikaz građe zida creva

1.4. Mehanizam kontrakcije glatkih mišića

Stimulacija glatke mišićne ćelije dovodi do aktiviranja L tipa kalcijumovih kanala (naponom kontrolisani kalcijumovi kanali, *eng.* long, L) i razgradnje inozitol-bifosfata (PIP_2) na inozitol-3-fosfat (IP_3) i diacilglicerol (DAG). Kalcijum ulazi u ćeliju, IP_3 se vezuje za receptore na sarkoplazmatičnom retikulumu (SR) što dovodi do oslobađanja intraćelijskog Ca^{2+} . Za kalmodulin se vezuju 4 jona Ca^{2+} , a nastali kompleks aktivira kinazu lakog lanca miozina (*eng.* myosin light chain kinase, MLCK). MLCK fosforiliše laki lanac miozina (*eng.* myosin light chain, MLC), dolazi do konformacione promene, što aktivira ATP-aznu funkciju miozina. Miozin se vezuje za aktin i uz utrošak energije povlači se duž aktinskog filameta (Johnson, 2012). U ćelijama glatkih mišića

kada se otvore K_v kanali i dođe do izlaska K^+ iz ćelija dolazi do hiperpolarizacije. Posledica hiperpolarizacije membrane je zatvaranje Ca_v kanala što vodi smanjenju ulaska Ca^{2+} u ćeliju i dolazi do relaksacije.

1.5. Jonski kanali

Jonski kanali su transmembranski proteini koji omogućavaju prolazak jona kroz membranu putem pore i imaju važnu ulogu u svim ekscitabilnim ćelijama. Postoje voltažno zavisni jonski kanali (npr. Na_v , K_v , Ca_v), ligand zavisni jonski kanali (npr. nikotinski receptori, $GABA_A$ receptori, 5-HT₃ receptori) kao i oni koji se aktiviraju nekim sekundarnim glasnikom unutar ćelije (npr. K_{Ca}). Jonski kanali se klasifikuju i prema vrsti jona koji provede, pa tako postoje kalijumovi (K^+) kanali, natrijumovi (Na^+) kanali, hloridni (Cl^-) kanali, kalcijumovi (Ca^{2+}) kanali, protonski kao i neselektivni katjonski kanali.

1.5.1. Voltažno zavisni jonski kanali

Voltažno zavisni jonski kanali se otvaraju i zatvaraju u zavisnosti od membranskog potencijala, a imaju ulogu u nastanku i propagaciji akcionog potencijala (AP) u svim ekscitabilnim ćelijama. Voltažno zavisni natrijumovi kanali (Na_v) imaju ulogu u prvoj fazi nastanka AP. Sa otvaranjem Na_v dolazi do naglog ulaska jona Na^+ u ćeliju i nastaje faza depolarizacije (Catterall, 1995). Samu poru kanala formira α subjedinica koja je i dovoljna za njegovo funkcionisanje, dok β subjedinica ima pomoćnu ulogu. Voltažno zavisni kalijumovi kanali (K_v) imaju ključnu ulogu u drugoj fazi AP jer usled njihovog otvaranja joni K^+ izlaze iz ćelije i dolazi do repolarizacije. K^+ kanali su homo/heterotetrameri, a α subjedinica učestvuje u formiranju pore.

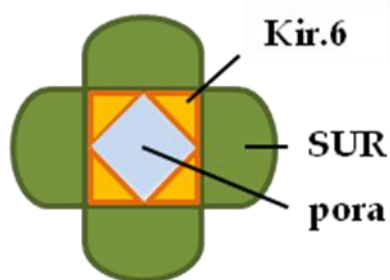
Voltažno zavisni kalcijumovi kanali (Ca_v) imaju ulogu u različitim ćelijama gde, u odgovor na promenu membranskog potencijala, dovode do intracelularnog povećanja koncentracijw Ca^{2+} . Poru kanala gradi α_1 subjedinica, a ima i ulogu voltažnog senzora kanala (Caterall, 1995).

1.5.2. Kalcijum-zavisni kalijumovi kanali (K_{Ca})

Kada unutar ćelije dođe do povećanja koncentracije Ca^{2+} posledično dolazi do aktiviranja sekundarnih glasnika, izlaska Ca^{2+} iz unutarćelijskih depoa (npr. sarkoplazmatičnog retikuluma u glatkim mišićnim ćelijama), kao i do otvaranja kalcijum zavisnih jonskih kanala (K_{Ca}) (Ghatta i sar., 2006). Na osnovu provodljivosti K_{Ca} su podeljeni u tri grupe 1) kalijumovi kanali velike propustljivosti (*eng.* large conductance Ca^{2+} - activated potassium channels, BK_{Ca}), 2) kalijumovi kanali srednje propustljivosti (*eng.* intermediate conductance Ca^{2+} - activated potassium channels, IK_{Ca}) i 3) kalijumovi kanali niske propustljivosti (*eng.* small conductance Ca^{2+} - activate potassium channels, SK_{Ca}). BK_{Ca} kanali pored toga što se aktiviraju Ca^{2+} mogu biti aktivirani i voltažom i ova dva načina aktivacije su međusobno nezavisni. Ovi kanali imaju ulogu u relaksaciji glatkih mišićnih ćelija, jer nakon otvaranja kanala usled povećane koncentracije Ca^{2+} u ćeliji, dolazi do izlaska K^+ iz ćelije, hiperpolarizacije membrane i zatvaranja Ca_v .

1.5.3. Kalijumovi ATP zavisni kanali (K_{ATP})

Kalijumovi ATP zavisni kanali (K_{ATP}) pripadaju grupi ulazno ispravljajčkih kanala (*eng.* inward-rectifier potassium channels, K_{ir}). Po strukturi K_{ATP} kanal je oktamer (slika 6), gde poru gradi $K_{ir.6}$ (1 i 2) subjedinica, dok regulatorna uloga pripada sulfonilurea subjedinici (*eng.* sulphonylurea receptor subunit, SUR) (1 i 2). ATP se direktno vezuje za K_{ir} subjedinicu i na taj način sprečava prolazak K^+ kroz membranu, dok je SUR subjedinica target za različite farmakološke agense. K_{ATP} kanali se nalaze u membrani kako glatkih mišićnih ćelija, tako i u membrani poprečno-prugastih i srčanih mišićnih ćelija, epitelnih ćelija, neurona i β ćelija pankreasa (Ashcroft FM i Gribble FM, 1998).



Slika 6. Šematski prikaz građe K_{ATP} kanala

1.6. Značaj ispitivanja efekata ibogaina na aktivnost antioksidativnih enzima

Ibogain je farmakološki agens višestrukog nivoa delovanja. Naučna istraživanja su išla u različitim pravcima, dok ga je alternativna terapijska praksa odredila kao agens protiv različitih oblika zavisnost kod ljudi. Iako sumirani, podaci o praktičnim aspektima, dozama i efektima jasno ukazuju na individualnu varijabilnost i oprez pri upotrebi, posebno jer su zapaženi slučajevi poremećaja u radu srca koji su imali za posledicu smrtni ishod. U naučnom smislu, mehanizam njegovog delovanja je definisan kroz afinitet za različite receptore i uticaj na metabolizam, a delimično je opisana i poznata i farmakokinetika. Ono što je relativno skoro počelo da se pojavljuje u literaturi kao njegov mehanizam delovanja je uticaj na energetski metabolizam i promenu redoks ravnoteže unutar ćelija. Stoga je cilj ove disertacije bio da se prouče efekti ibogaina na nivo antioksidativne odbrane, s obzirom da je on postuliran kao pro-antioksidant, kao agens koji posredno podiže nivo antioksidativne odbrane u ćelijama.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Pokazati efekte ibogaina na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima, nakon *in vivo* tretmana i u terminalnom ileumu nakon *ex vivo* tretmana.

Ispitivano je da li i kakvog uticaja ima ibogain na aktivnost antioksidativnih enzima (SOD1, SOD2, KAT, GSH-Px, GR, GST). Kao dodatni pokazatelj oksidativnog oštećenja merena je aktivnost ksantin oksidaze (XOD), kao i koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS), ukupnih i neproteinskih -SH grupa u metaboličkim organima (jetra, bubrezi), kontraktilnim organima (srce, ileum) kao i eritrocitima, plućima, slezini i testisima. Izabrali smo doze od 1 mg/kg kao najmanju koja je korišćena kod ljudi u terapiji i 20 mg/kg kao dozu koja je još u sigurnim okvirima za ljude, a kod pacova je pokazano povećanje količine enzima vezanih za glikolizu i Krebsov ciklus. Promene su praćene u dve vremenske tačke 6 h (srednja vrednost njegovog poluživota i vremena kad je primećena povećana količina enzima u kvascu) i 24 h nakon aplikacije.

2. Utvrditi koji receptori, kalijumovi kanali i molekularni mehanizmi su uključeni u dejstva ibogaina na modelu izolovanog terminalnog ileuma pacova.

3. MATERIJAL I METODE

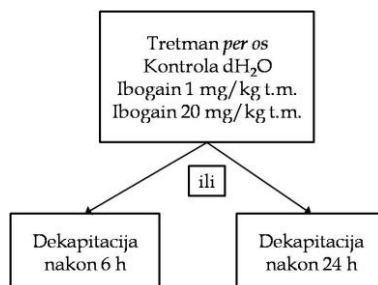
Ibogain hidrohlorid (PubChem CID: 197059), čistoće 98,93%, donacija Verskog udruženja Sakrament Prehoda, Maribor, Slovenija, korišćen je u *in vivo* ekperimentu, dok je za *ex vivo* eksperiment upotrebljen ibogain hidrohlorid čistoće 99,9% (Remøgen, Phytostan Enterprises Inc., Kanada), ljubazni poklon prof dr med Mare Bresjanac.

Sve sprovedene procedure su u saglasnosti sa EEC direktivom (*eng.* EEC Directive on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes) i odobrene od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, rešenje broj: za *in vivo* eksperiment 02-03/16 i *in vitro* eksperiment 04-12/15.

3.1. Dizajn *in vivo* eksperimenta

Životinje: za *in vivo* tretman mužjaci pacova soja *Wistar*, stari 3 meseca, prosečne telesne mase 308 g, držani su u zasebnim kavezima pod standardnim uslovima: temperatura prostorije 24°C, ciklus dan-noć 12h-12h, bez ograničenog pristupa vodi i hrani (standardna laboratorijska hrana za glodare Veterinarski zavod Subotica AD, Srbija). Ibogain je rastvoren u dH₂O snažnim vorteksovanjem (štok koncentracije 2 mg/ml) i čuvan zaštićen od svetla, do korišćenja. Životinje su jednokratno tretirane ibogainom, *per os* dozom 1 mg/kg t.m. ili 20 mg/kg t.m., dok su kontrolne grupe tretirane dH₂O. Životinje su žrtvovane dekapitacijom 6 ili 24 h nakon tretmana. Hemijska metoda žrtvovanja nije korišćena zbog mogućeg interferiranja sa rezultatima tretmana. Šema eksperimenta: grupa K6 – kontrolna, tretirane dH₂O, dekapitacija nakon 6 h; grupa K24 – kontrolna, tretirane dH₂O, dekapitacija nakon 24 h; grupa M6 – životinje tretirane ibogainom, doza 1 mg/kg t.m., dekapitacija nakon 6 h; grupa M24 – životinje tretirane ibogainom, doza 1 mg/kg t.m., dekapitacija nakon 24 h; grupa V6 – životinje tretirane ibogainom, doza 20 mg/kg t.m., dekapitacija nakon 6 h; grupa V24 – životinje tretirane ibogainom, doza 20 mg/kg t.m.,

dekapitacija nakon 24 h (slika 7). U kontrolnim grupama (K6 i K24) korišćene su po tri životinja, dok u grupama koje su tretirane ibogainom (M6, M24, V6 i V24) korišćeno je po 6 životinja.



Slika 7. Šema eksperimenta *in vivo* tretmana; telesna masa (t.m.)

3.2. Izolovanje tkiva

Nakon dekapitacije skupljana je krv u providne, heparinizovane (500 i.j./ml pune krvi) plastične mikrotube, zapremine 1,5 ml. Jetra je perfundovana hladnim fiziološkim rastvorom i izolovana, a zatim i drugi organi: srce, bubrezi, pluća, ileum, slezina, testisi. Od jetre, srca i bubrega uzet je deo organa za histološku analizu, koji su fiksirani 24 h u 4% rastvoru paraformaldehida u fosfatnom puferu, pH 7,4. Ostatak tkiva je zamrznut u tečnom azotu, a potom premešten i čuvan na -70°C do korišćenja.

3.3. Priprema plazme i eritrocita

Iz pune krvi plazma je centrifugiranjem (3000xg, 10 min) odvojena od eritrocita, a zatim su eritrociti tri puta isprani fiziološkim rastvorom na sobnoj temperaturi. Plazma i eritrociti su čuvani na -20°C do korišćenja.

3.4. Priprema tkiva za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima

Eritrociti su hemolizirani hladnom dH₂O u odnosu 1:6 (0,5 ml eritrocita: 3 ml vode), vorteksovani i ostavljeni na ledu 30 min. U hemolizatu je određena koncentracija hemoglobina (Hb) i aktivnost KAT, GR, GSH-Px. Za određivanje

aktivnosti Cu-Zn SOD neophodno je prvo ukloniti hemoglobin po metodi koju je opisao Tsuchihashi (Tsuchihashi, 1923).

Jetra, bubrezi, srce, ileum, pluća, slezina i testisi: za određivanje aktivnosti SOD 1 i 2, KAT, GR, GSH-Px, GST i XOD tkiva su odmrznuta, izmerena, macerirana i dodat im je saharozni pufer (0,25 M saharoza, 0,05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) u odnosu 1:10 (0,5 g tkiva : 5 ml pufera). Tkiva se homogenizuju 3x10 s (pauza 10 s), zatim sonifikuju 3x15 s (pauza 15 s), na frekvenci 10 kHz. Sonifikati se centrifugiraju na 105000 x g, na 4°C, 90 min. Odvaja se supernatant i čuva na -70°C za dalja merenja.

3.5. Priprema tkiva za merenje koncentracije TBARS i -SH grupa

Za određivanje koncentracije TBARS, ukupnih i slobodnih neproteinskih -SH grupa tkiva su odmrznuta, izmerena, macerirana i dodat im je 0,05 M Tris, 1 mM EDTA pufer pH 7,4 u odnosu 1:5 (0,5 g tkiva : 2,5 ml pufera). Tkiva se homogenizuju 3x10 s (pauza 10 s), zatim sonifikuju 3x15 s (pauza 15 s), na frekvenci 10 kHz. Sonifikati se centrifugiraju na 9000xg (Mini Spin, Eppendorf), 15 min. Odvaja se supernatant i čuva na -20°C do merenja.

3.6. Određivanje koncentracije proteina u uzorcima

Koncentracija proteina u uzorcima tkiva određena je po metodi Lowry-ja (Lowry i sar., 1951), koja je prilagođena za mikrotitar ploču. U alkalnoj sredini peptidne veze i bakarni joni (Cu^{2+}) formiraju kompleks koji uz oksidoredukcionu reakciju fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa (Folin-Ciocalteu-ov reagens) sa aromatičnim aminokiselinama u ispitivanom uzorku daje postojanu plavu boju. Apsorbanca se čita spektrofotometrijski na 670 nm.

Rastvori:

Reagens 1 – 2% Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH

Reagens 2 – 1% rastvor $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

Reagens 3 – 2% rastvor K, Na tartarata

Reagens C – Reagens 1: Reagens 2: Reagens 3=98:1:1

Reagens F – Folin-Ciocalteu-ov reagens razblažen dH₂O 1:10

Za crtanje standardne krive koristi se dekadna razblaženja štoka (1 mg/ml) albumin goveđeg seruma (*eng.* bovine serum albumin, BSA).

Postupak

Za merenje koncentracije proteina pripremane su duple probe za uzorke, blank i standarde. U ependorfe se sipa 20 µl uzorka, 300 µl Reagensa C, snažno se vorteksuje i sačeka 15 min. Zatim se doda 60 µl Reagensa F, snažno se vorteksuje i sačeka 30 min da se boja razvije, u mraku. Nakon toga se naliva 200 µl rastvora u bunariće mikrotitar ploče (Microtest plate, 96-well, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) i vrši očitavanje apsorbacije na 670 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finska).

Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancije za zadate koncentracije BSA crta se standardna kriva sa koje se očitava koncentracija proteina u rastvorima. Kao blank umesto 20 µl uzorka sipa se 20 µl dH₂O. Ukoliko je potrebno uzorak se razblaži da bi očitana apsorbancija bila u opsegu standardne krive.

Koncentracija proteina u uzorku tkiva = očitana koncentracija proteina [mg/ml]
x R = [mg/g]

R – razblaženje uzorka

3.7. Određivanje koncentracije hemoglobina u krvi

Koncentracija hemoglobina u krvi određena je po metodi koju su opisali Drabkin i Austin (Drabkin i Austin, 1935).

Rastvori:

Drabkin-ov reagens – 4 mM K₃Fe(CN)₆ i 20 mM KCN

0,5 M fosfatni pufer pH 7,0 – (u 0,5 M K₂HPO₄ dodaje se 0,5 M KH₂PO₄)

Postupak

Za merenje koncentracije hemoglobina pripremane su duple probe za uzorke i blank. U epruvetu se sipa 5 ml Drabkin-ovog reagensa i 20 μ l hemolizata krvi, vorteksuje i ostavi 15 min u mraku. Kao blank, umest uzorka sipa se dH₂O. Apsorbanca se meri spektrofotometrijski na 545 nm. Koncentracija se izračunava prema formuli:

$$C_{\text{Hb}} = A_{545} \times 36,77 = [\text{g}/100 \text{ ml}]$$

C_{Hb} - koncentracija hemoglobina

A_{545} - apsorbanca očitana na 545 nm

36,77 - ekstinkcioni koeficijent

3.8. Uklanjanje hemoglobina iz hemolizata krvi

Uklanjanje hemoglobina iz hemolizata urađeno je metodom koju je opisao Tsuchihashi (Tsuchihashi, 1923).

Hemolizat je prvo razblažen vodom u odnosu 1:6 (0,5 ml lizata : 3 ml vode), zatim se dodaje 1 ml etanola i 600 μ l hloroforma i centrifugira na 2000x g, 10 min. Etanol i hloroform se dodaju hladni, a hloroform se dodaje u kapima uz neprestano vorteksovanje. Ukoliko dobijeni supernatant nije bistar ponavlja se korak dodavanja hloroforma i centrifugiranje. U supernatantu se određuje aktivnost Cu-ZnSOD.

3.9. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane

3.9.1. Ukupna superoksid dismutaza (SOD)

Za određivanje aktivnosti enzima SOD korišćena je adrenalinska metoda (Misra i Fridovich, 1972). Adrenalin u alkalnoj sredini podleže autooksidaciji pri čemu nastaje adrenohrom (svetlo roze boje) i superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Enzim SOD uklanja $\text{O}_2^{\cdot-}$ i inhibira autooksidaciju adrenalina. Povećanja apsorbanca koje se registruje na 480 nm posledica je akumulacije adrenohroma. Nagib linearnog dela porasta apsorbanca jednak je brzini

autooksidacije adrenalina. Brzina autooksidacije u odsustvu enzima uzima se kao referentna (kontrolna). Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina koju izazove SOD iz uzorka koristi se kao mera katalitičke aktivnosti enzima.

Rastvori:

- Adrenalin, rastvoren u 0,1 N HCl
- Karbonatni pufer 0,05 M Na₂CO₃ i 0,1 mM EDTA, pH 10,2

Postupak

U kivetu se sipa 3 ml karbonatnog pufera i rastvor adrenalina u količini da promena apsorbance (u toku autooksidacije) u minutu bude 0,020-0,022. Reakcija se prati 4-6 minuta, da bi se do kraja ispratio linearni deo krive tj. tačno odredio plato promene apsorbance. Na ovaj način je određen blank. Pri merenju autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD (određivanje aktivnosti SOD) u karbonatni pufer se pre adrenalina dodaje uzorak i to količina koja dovodi do 50% inhibicije od vrednosti dobijene za blank. Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina korišćena je za izračunavanje SOD aktivnosti. Jedna SOD jedinica (eng. unit, U) je definisana kao količina enzima potrebna da smanji stopu autooksidacije adrenalina za 50%, u linearnom delu porasta apsorbance, na pH 10,2. Aktivnost enzima SOD izračunata je prema formuli:

Za lizat eritrocita:

$$\text{aktivnost CuZn SOD} = 2(\Delta K - \Delta A) \times R \times 100 / (C_{Hb} \times V \times \Delta K) = [\text{U/gHb}]$$

Za tkiva:

$$\text{aktivnost ukupne SOD} = 2(\Delta K - \Delta A) \times R / (C_{pr} \times V \times \Delta K) = [\text{U/mg proteina}]$$

[U = μmol adrenalina / min / mg proteina]

ΔK – promena absorbance adrenalina (kontrolna vrednost)

ΔA – promena absorbance uzorka

R – razblaženje uzorka

C_{Hb} – koncentracija hemoglobina u lizatu eritrocita [g/100 ml]

C_{pr} – koncentracija proteina [mg/ml]

V – zapremina uzorka u kojoj je određena aktivnost enzima [ml]

U eritrocitima ne postoji SOD2 te je na ovaj način određena aktivnost ukupne SOD ujedno i aktivnost SOD1. Kod tkiva na ovaj način je određena aktivnost ukupne SOD. Da bi se odredila aktivnost SOD1, potrebno je odrediti aktivnost SOD2 i tu vrednost oduzeti od vrednosti ukupne SOD, prema formuli:

aktivnost SOD1 = aktivnost ukupne SOD - aktivnost SOD2

3.9.2. Mangan superoksid dismutaza (SOD2)

Za određivanje aktivnosti SOD2 u uzorku, potrebno je prvo inhibirati aktivnost SOD1 pomoću 8 mM KCN.

Postupak

KCN se dodaje uzorku u razmeri 1:1 i inkubira se 30 min na sobnoj temperaturi. Dalji postupak merenja je isti kao za ukupnu SOD. Za određivanje aktivnosti SOD2 potrebno je veću količinu uzorka (u kojem je inhibirana SOD1) dodati u reakcionu smešu jer SOD2 čini 5-10% ukupne SOD. Formula po kojoj se izračunava je ista kao za izračunavanje ukupne SOD.

3.9.3. Katalaza (KAT)

Za određivanje aktivnosti katalaze (KAT) korišćena je metoda koju je opisao Beutler (Beutler, 1982). Spektrofotometrijski se prati brzina degradacije vodonik peroksida (H_2O_2) na 230 nm (dolazi do pada apsorbance usled razgradnje H_2O_2).

Aktivnost katalaze u eritrocitima se izražava kao broj μM redukovanog H_2O_2 u minuti, po g hemoglobina/mg proteina.

Rastvori:

- 30% vodeni rastvor H₂O₂
- 1M TRIS, 5 mM EDTA pufer pH 8,0

Postupak

Od 30% vodenog rastvora H₂O₂ pravi se 10 mM rastvor (apsorbanca takvog rastvora na 230 nm je 0,860). U kivetu se redom sipa 50 µl TRIS, EDTA pufer, uzorak u količini da ΔA/min bude u opsegu 0,03-0,06 i 1 ml 10 mM H₂O₂ rastvora. Vršiti se merenje apsorbance u toku 3 min, svakih 30 s, ukupno 6 merenja. Aktivnost katalaze se izračunava prema formuli:

Za lizate eritrocita:

$$\text{KAT aktivnost} = 100 \times R \times \Delta A / (C_{\text{Hb}} \times V \times 0,071) = [\mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{gHb}]$$

Za tkiva:

$$\text{KAT aktivnost} = \Delta A \times R / (0,071 \times V \times C_{\text{pr}}) = [\mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{mg proteina}]$$

R - razblaženje uzorka

ΔA - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

C_{Hb} - koncentracija hemoglobina u lizatu eritrocita [g/100 ml]

C_{pr} - koncentracija proteina [mg/ml]

V - zapremina uzorka u kojoj je određena aktivnost enzima [ml]

0,071 - ekstinkcioni koeficijent za H₂O₂ na 230 nm [M⁻¹cm⁻¹]

Internacionalna jedinica (U) je jedinica enzimske aktivnosti koja predstavlja onu količinu enzima koja razgradi 1 µmol supstrata po 1 minuti (U = µmol/min).

3.9.4. Glutation peroksidaza (GSH-Px)

Za određivanje aktivnosti glutacione peroksidaze koristi se modifikovana metoda koju su opisali Paglia i Valentine (Paglia i Valentine 1967). Glutaciona peroksidaza (GSH-Px) katalizuje oksidaciju redukovane glutacione (GSH) u oksidovani glutation (GSSG) uz redukciju vodonik peroksida (H_2O_2) do vode. GSH se vraća u reakciju tako što enzim glutation reduktaza (GR) redukuje oksidovani glutation pri tom koristeći NADPH kao donor vodonika

Rastvori:

- 0,5 M fosfatni pufer pH 7,0
- 0,2 mM NADPH u 1% $NaHCO_3$
- 1mM GSH
- 0,03 M t-butil hidroperoksid
- glutation reduktaza (GR), 105 jedinica/mg proteina

Osnovna koncentracija, koja je naznačena na pakovanju, se razblažuje sa dH_2O tako da blank bude $\Delta 0,020$.

- Drabkin-ov reagens (za krv)

Postupak:

Aktivnost se meri na $37^\circ C$, na 340 nm, vreme čitanja za krv 120 s, za tkiva 150 s. Radi se blank i uzorci u kivetu se redom sipa za krv:

-blank bez Drabkin-ovog reagensa dH_2O 1,7 ml, NADPH (0,2 mM) 0,6 ml, fosfatni pufer (pH 7,0) 0,3 ml, GSH (1mM) 0,3 ml, t-butil hidroperoksid 0,1 ml, GR 5 μl . Kad se odredi blank, tj. podesi razblaženje GR, meri se apsorbancu uzoraka

-uzorci: lizat eritrocita * oko 50 μl , Drabkin-ov reagens 50 μl , dH_2O 1,6 ml, NADPH (0,2 mM) 0,6 ml, fosfatni pufer (pH 7,0) 0,3 ml, GSH (1mM) 0,3 ml, t-butil hidroperoksid 0,1 ml, GR 5 μl .

* Količina lizata eritrocita: koristi se lizat eritrocita razblažen na 5g%Hb. To znači da se za svaki uzorak pojedinačno određuje količina koja se uzima na osnovu izračunate količine hemoglobina (Hb).

$$(5/C_{Hb}) \times 50 \mu l = \text{količina lizata } [\mu l]$$

Račun:

$$\begin{aligned} \text{Aktivnost GSH-Px} &= (\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 1000 / (6,22 \times 0,835) \\ &= [\text{nM NADPH} / \text{min} / \text{mg Hb}] \end{aligned}$$

TKIVA : (radi se bez Drabkin-ovog reagensa)

- 1mM NaN₃
- 1mM EDTA

U kivetu se redom sipa dH₂O 1,5 ml, GSH (1 mM) 0,3 ml, NADPH (0,2 mM) 0,6 ml, NaN₃ (1 mM) 0,1 ml, EDTA (1 mM) 0,1 ml, fosfatni pufer 0,5 M (pH 7,0) 0,3 ml, uzorak t-butil hidroperoksid 0,1 ml, GR 5 μ l. Radi se blank i uzorci. Temperatura reakcije je 37°C, vreme čitanja 150 sek, na 340 nm.

Račun:

$$\begin{aligned} \text{Aktivnost GSH-Px} &= (\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 3 \times 1000 / (6,22 \times V \times C_{pr}) \\ &= [\text{nMNADPH} / \text{min} / \text{mg proteina}] \end{aligned}$$

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{bl} - srednja promena apsorbance blanka u minuti

C_{Hb} - koncentracija hemoglobina u lizatu eritrocita [g/100 ml]

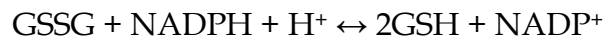
C_{pr} - koncentracija proteina [mg/ml]

V - zapremina uzorka u kojoj je određena aktivnost enzima [ml]

6,22 - molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH

3.9.5. Glutation reduktaza (GR)

Metodu za određivanje aktivnosti GR opisali su Glatzle i saradnici (Glatzle i sar., 1974). GR katalizuje konverziju oksidovanog glutatona (GSSG) u redukovani glutation (GSH), a kao redukujući ekvivalent koristi NADPH. Metoda se zasniva na sposobnosti GR da katalizuje reakciju redukcije GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH do NADP⁺.



Opadanje apsorbance na 340 nm je posledica oksidacije koenzima NADPH do NADP⁺. Nivo GR u uzorku je ograničena, tako da je pad apsorbance direktno proporcionalan aktivnosti GR.

Rastvori:

- 0,5 M fosfatni pufer pH 7,4
- 0,5 mM EDTA
- 0,1 mM NADPH
- 2 mM GSSG

Postupak

U kivetu se redom sipa: fosfatni pufer (0,5 M, pH 7,4) 0,6 ml, GSSG (2 mM) 0,1 ml. Merenje se vrši na 37°C, na 340 nm, 150 s. Radi se blank i uzorci. Potrebno je da vrednost blanka bude što bliža nuli.

Račun:

Lizat eritrocita:

$$(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 10^5 \times 3 / (6,22 \times V \times C_{Hb}) = [\text{nM NADPH} / \text{min} / \text{mg Hb}]$$

Tkiva:

$$(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 10^3 \times 3 / 6,22 \times V \times C_{pr} = [\text{nM NADPH} / \text{min} / \text{mg proteina}]$$

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{bl} – srednja promena apsorbance blanka u minuti

C_{Hb} – koncentracija hemoglobina u lizatu eritrocita [g/100 ml]

C_{pr} – koncentracija proteina [mg/ml]

V – zapremina uzorka u kojoj je određena aktivnost enzima [ml]

6,22 – molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH

3.9.6. Glutation S transferaza (GST)

GST katalizuje konjugaciju redukovanog glutationa za ksenobiotske supstrate u cilju detoksifikacije. Za određivanje aktivnosti korišćena je metoda koju je opisao Habig (Habig i sar., 1974).

Rastvori:

- 0,5 M fosfatni pufer pH 6,5
- 25 mM CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) u 95% etanolu
- 20 mM GSH

Postupak

U kivetu se sipa redom: H₂O 2 ml, CDNB (25 mM) 0,1 ml, fosfatni pufer (0,5 M pH 6,5) 0,6 ml, GSH (20 mM) 0,3 ml, uzorak (oduzeti toliko H₂O). Rade se blank i uzorci. Meri se na temperaturi od 37°C, 150 s, na 340 nm.

Račun:

Tkiva: $(\Delta A_{uz} - \Delta A_{bl}) \times 312,5 / (V \times C_{pr}) = [\text{nM GSH/min/mg proteina}]$

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{bl} – srednja promena apsorbance blanka u minuti

C_{pr} – koncentracija proteina [mg/ml]

V – zapremina uzorka u kojoj je određena aktivnost enzima [ml]

3.10. Ksantin oksidaza (XOD)

Aktivnost ksantin oksidaze je određena na osnovu produkcije mokraćne kiseline u prisustvu ksantina kao supstrata (Terada i sar., 1990).

Rastvori:

- 0,1 M fosfatni pufer pH 7,4
- 0,25 mM EDTA u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,4

- 0,2 mM ksantin u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,4

Postupak

U kivetu se sipa redom: EDTA 0,4 ml, uzorak 0,1 ml, ksantin 0,5 ml, ksantin oksidaza 4,17 μ l. Pratiti promenu apsorbancije na 292 nm, 15 min, na 37°C.

Račun:

$$(\Delta A / \text{min} \times 1000) / (1,22 \times 10^4 \times C_{\text{pr}}) = [\text{nmol mokračne kis} / \text{min} / \text{mg proteina}]$$

3.11. Određivanje koncentracije TBARS

Koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (*eng.* thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) određena je prema protokolu prilagođenom za mikrotitar ploče (Rehncorna i sar, 1980).

Rastvori:

- 40% trihlorsirćetna kiselina (*eng.* trichloroacetic acid, TCA)
- 0,6% tiobarbiturinska kiselina TBA (*eng.* thiobarbituric acid, TBA)
- 0,3% NaOH

Postupak

Sipati 600 μ L uzorka, 200 μ L 40% TCA, vorteksovati i centrifugirati 15 min na 9000xg. U 300 μ L supernatanta dodati 300 μ L 0,6% TBA (rastvorene u 0,3% NaOH), vorteksovati i inkubirati 10 min na 95-100°C. Reakciju prekinuti stavljanjem u led. Očitati apsorbancu na $\lambda=532$ nm.

Jedinice: [MDA μ mol/g tkiva]

Količina malondialdehida (MDA) u uzorcima se određuje preko standardne krive. Pravi se 10 mM štok MDA u 1% H₂SO₄, zatim se napravi serija razblaženja. MDA acetal mora da hidrolizuje 2 h na sobnoj temperaturi u 1% H₂SO₄ kako bi se oslobodio MDA iz kompleksa MDA acetal.

3.12. Određivanje koncentracije slobodnih -SH grupa

Ukupne i slobodne neproteinske -SH grupe urađene su po protokolu prilagođenom za titar ploče (Ellman, 1959).

Rastvori, za neproteinske -SH grupe:

- 0,1 M kalijumfosfatni pufer pH 7,3
- 3 mM 2,2'-Dinitro-5,5'-ditiobenzoeva kiselina (DTNB), u 0,1 M fosfatnom (K_2H/KH_2PO_4) puferu pH=7,3
- 10% sulfosalicilna kiselina

Postupak:

350 μ l sonifikata + 116,5 μ l 10% sulfosalicilne kiseline, centrifugirati 15 min na 9000xg. U supernatantu (sn) se meri koncentracija -SH grupa.

U mikrotitar ploču se naliva, u duplikatu: 104 μ l pufera, 104 μ l uzorka (sn), 41,7 μ l DTNB. Naliva se i blank u duplikatu 104 μ l pufera, 104 μ l pufera (umesto uzorka), 41,7 μ L DTNB. Posle 10-15 min, na svetlu, na sobnoj temperaturi (kad se razvije žuta boja) očitava se apsorbance na $\lambda=412$ nm.

Za merenje koncentracije ukupnih -SH grupa: homogenizovano i sonifikovano tkivo se centrifugira bez dodavanja 10% sulfosalicilne kiseline. Dalje se prati protokol na isti način.

Račun: koncentracija -SH grupa = $(A_{uz} - A_{bl}) * R / 14150$; Jedinice: [mol/SH/L]

A_{uz} - apsorbance uzorka

A_{bl} - apsorbance blanka

R - razblaženje uzorka

14150 $M^{-1}cm^{-1}$ - ekstinkcioni koeficijent za DTNB

3.13. Priprema tkiva za histološku analizu

Uzorci tkiva su fiksirani u 4% paraformaldehidu (rastvorenom u fosfatnom puferu pH 7,4). Posle 24 h tkiva su dehidratirana serijom rastućih koncentracija etanola (30-100%), prosvetljena u ksilolu i kalupljena u paraplustu (Histowax, Histowax Product AB, Švedska). Parafinski blokovi sa tkivima su isečeni na rotacionom mikrotomu (Leica Microsystems GmbH, Nemačka), debljina preseka 5 µm.

3.14. Bojenje preparata

Za histološku analizu pripremljena su tkiva jetre, bubrega i srca. Urađeno je hematoksilin eozin bojenje (HE) zbog opšeg morfološkog pregleda. Hematoksilin boji jedra u plavo, a eozin daje rozu boju proteinima plazme, kolagenu i eritrocitima. Kod jetre i srca urađeno je i periodic acid schiff (PAS) bojenje kojim se glikogenske granule boje u purpurnu magenta boju.

U cilju bojenja (HE i PAS) preseka i pravljenja trajnih preparata, deparafinizacija je urađena u ksilolu (2x5 min) i rehidratacija u seriji opadajućih koncentracija etanola (100%, 96%, 70%). Nakon ispiranja u dH₂O kod HE bojenja prvo je bojeno hematoksilinom (ICN Biomedicals Inc., OH, SAD) 30 s, zatim ispirano u običnoj vodi sa česme, a potom bojeno eozinom (Merck, Nemačka) 150 s. Za PAS bojenje, oksidacija je urađena perjodnom kiselinom 10 min, isprano je običnom vodom, zatim se na pločice stavljao Šifov reagens 15 min, ispirano je običnom vodom, a potom su jedra bojena hematoksilinom 30 s. Dalji postupak je isti za oba tipa bojenja. Nakon ispiranja u vodi i dehidratacije u etanolu (96% i 100%), kao i prosvetljavanja u ksilolu (2x5 min), pokrovna stakla su montirana DPX medijumom za montiranje (Sigma-Aldrich, Španija).

Mikrografije su slikane na aparatu Canon PowerShot S70. Preparati su pregledani na mikroskopu Leica DM LS2.

3.14.1. Jetra

HE histomorfološki pregled podrazumeva uočavanje patoloških promena kao što su: dilatacije centralne vene ili portalnih vena, edem hepatocita, nekroze, infiltracije limfocita u portne prostore, hiperplazija Kupferovih ćelija i dr.

Da bi se uporedilo prisustvo glikogena u hepatocitima životinja svih eksperimentalnih grupa posmatrano je 5 vidnih polja svakog preparata na uveličanju 400x. U svakom vidnom polju prebrojane su ćelije pozitivne i negativne na glikogen. Prisustvo glikogena je izraženo kao broj ćelija pozitivnih na glikogen, na 100 ćelija.

Kako količina glikogena prisutna u hepatocitima može da varira, klasifikovali smo sam intezitet obojenosti za svaku ćeliju u jednu od tri grupe obeležene sa: (+) za slabo obojeno - količina glikogena je < od 33,3%, u odnosu na maksimalnu vrednost; (++) za srednje obojeno - količina glikogena je između 33,3% i 66,6% u odnosu na maksimalnu vrednost i (+++) za jako obojeno - količina glikogena je > 66,6% u odnosu na maksimalnu vrednost. Skala ima opseg od 0% do 100% sa granicama na 1/3 i 2/3 skale, pri čemu 0% predstavlja ćelije negativne na glikogen, a 100% predstavlja ćelije sa maksimalnom količinom glikogena detektovanom u hepatocitima životinja iz svih grupa. Mikrografije su pregledala tri histopatologa, u cilju osiguravanja objektivnosti i predstavljena je srednja vrednost njihovih rezultata.

3.14.2. Bubrezi

Presek je urađen tako da su obuhvaćeni korteks i medula bubrega, a posmatrani su:

- (i) oblik lumena proksimalnih savijenih kanalića (tubula) koje se nalaze uz glomerule. Zavisno od veličine epitelnih ćelija koje okružuju lumen tubula, oblik samih tubula može biti okrugao/ovalan (to se smatra normalnim oblikom) ili nepravilan odnosno zvezdast kada su epitelne ćelije povećanog volumena.

- (ii) oblik i vidljivost jedara. Jedra su označena kao a) normalna – okruglasta dobro vidljiva, b) okruglasta i fokalno slabo vidljiva ili fokalno odsutna.

Promene su prema intezitetu i broju zahvaćenih tubula svrstane u:

blage promene – oblik lumena tubula je pravilan (ovalan ili okrugao) kod najmanje 75% svih pregledanih tubula, a kod ostalih je zvezdast. Jedra su normala kod najmanje 50% svih pregledanih tubula, a kod ostalih su fokalno slabo vidljiva;

umerene promene – oblik lumena tubula je nepravilan (zvezdast) kod najmanje 75% svih pregledanih tubula, a kod ostalih je pravilan (ovalan ili okrugao). Jedra su okruglasta i fokalno slabo vidljiva kod najmanje 50% svih pregledanih tubula, a kod ostalih su fokalno odsutna.

3.14.3. Srce

Na preparatima obojenim HE posmatrana je građa miocita. Histomorfološki pregled podrazumeva uočavanje patoloških promena kao što su manja vidljivost jedara, infiltracija ćelija iz krvnih sudova, infiltracija neutrofila, nekroza miocita, gubitak prugavosti i dr. PAS bojenje je korišćeno za pokazivanje prisustva glikogena u miocitima.

3.15. Merenje koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi

Za određivanje koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi korišćena je metoda tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (*eng.* liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) (Koželj, 2015). Priprema uzorka podrazumeva precipitaciju proteina sa dvostrukim volumenom acetonitrila (C_2H_3N). Standardi za kalibraciju plazme su napravljeni dodavanjem odgovarajuće količine rastvora radnog standarda i prazepama (što je interni standard) u plazmu u kojoj nema lekova. Svi uzorci i standardi su čuvani zaštićeni od svetla, jer su ibogain i noribogain fotosenzitivni. Ibogain, noribogain i prazepam su razdvojeni gradijentskom

elucijom na koloni Zorbax XDB-CN (75 mm x 4,6 mm, veličina partikula 3,5 µm). LC-MS/MS čine Agilent 1100 HPLC sistem i maseni spektrometar Quattro micro™ API (Waters) čiji elektrosprej radi u režimu pozitivne jonizacije. Korišćen je softver MassLynx 4.1. Dve Monitoring selektovane reakcije (*eng.* selected reaction monitoring, SRM) promene su bile dobijene za ibogain (311→174, 122), noribogain (297→160, 122) i za interni standard (325→105, 271). Kalibraciona kriva za obe komponente u plazmi je bila linearna u opsegu 0,1 to 100 ng/ml, sa korelacionim koeficijentom, najmanje 0,996, a prag detekcije 0,2 ng/ml.

3.16. Analiza urina, merenje koncentracije glukoze u krvi

Pre dekapitacije pacovi su stresirani na čistoj podlozi sa koje je uzet urin sterilnim špricom. Analiza urina urađena je pomoću traka za urin Uriscan urine strips, YD Diagnostics, Yongin, Republika Korea), i očitani su parametri: koncentracija bilirubina, urobilinogena, ketona, proteina, glukoze i askorbinske kiseline, prisustvo nitrita, broj leukocita i eritrocita i određeno je specifična gustina i pH vrednost urina. Koncentracija glukoze u krvi je merena odmah nakon žrtvovanja iz pune krvi pomoću traka Blood Glucose Test Strip TOUCH-IN® Micro, ApexBio (Tajvan). Na kraju eksperimenta izmerena je količina konzumirane vode i hrane, izraženo u g (za hranu) ili ml (za vodu)/h/kg t.m. Ukupna količina konzumirane vode je izračunata kao zbir količine vode koju je životinja slobodno popila i količina koju je popila u toku *per os* tretmana.

3.17. Dizajn *ex vivo* eksperimenta

Za *ex vivo* eksperimente su korišćeni mužjaci pacova soja *Wistar* stari 2,5 meseca, prosečne telesne mase 260 g. Životinje su gajene u standardnim uslovima: temperatura prostorije 24°C, ciklus dan/noć 12 h/12 h, bez ograničenog pristupa vodi i hrani, do 24 h pre eksperimenta kada im je ukinut pristup hrani. Životinje su žrtvovane dekapitacijom, a potom je izolovan

preterminalni deo ileuma 1-2 cm proksimalno od ilocekalne valvule i stavljan u Tyrode-ov rastvor (mM: NaCl - 136,9; KCl - 2,68; CaCl₂ - 1,8; NaHCO₃ - 11,9; MgCl₂ - 1,05; NaH₂PO₄ - 0,42; glukoza - 5,55) . Hemijska metoda žrtvovanja nije korišćena zbog mogućeg interferiranja sa rezultatima tretmana. Isecan je terminalni deo ileuma dužine 1 cm, očišćen od okolnog tkiva, ispran fiziološkim rastvorom i postavljan u vodeno kupatilo za izolovane organe (zapremina kupatila 10 ml). Jednim krajem terminalni ileum je pričvršćen za dno vodenog kupatila, a drugim za transdjuser. U slučaju električnih stimulacija (ES) preparat je fiksiran između dve paralelne elektrode. Terminalni ileum je inkubiran u Tyrode-ovom rastvoru na 37 °C, aerisanom 95% O₂ i 5% CO₂ pri konstantnom opterećenju od 1 g. Nakon uspostavljanja stabilne bazne linije praćen je efekat kumulativnih doza ibogaina 3-478 μM i odgovarajućih pretretmana na KCl izazvane tonične kontrakcije. Doza ibogaina korišćena u eksperimentima sa ES je bila 3-158 μM. Praćen je efekat ibogaina na kalijumovim kanalima. Tonične kontrakcije izazivane su KCl-om (60 mM), a holinergičke električnim stimulusima po 5 stimulacija u paketu na svakih 60 s po jedna. Korišćeni su parametri: 16 Hz, trajanje pulsa (*eng.* puls period, PP) PP=62,5 ms, širina stimulatornog impulsa, (*eng.* puls width, PW) PW=3 ms, pauza između vozova (*eng.* train delay, TD) TD=60 s, broj pulseva koji formira voz, (*eng.* train numbers, TN) TN 160, U=60V. U odvojenim serijama eksperimenata, kao pretretmani korišćeni su blokatori kalijumovih kanala: glibenklamid - GL (blokator K_{ATP} kanala), tetraetil amonijum - TEA (blokator kalijumovih kanala velike propustljivosti koji se aktiviraju kalcijumom, *eng.* large-conductance Ca²⁺-activated potassium channels, BK_{Ca}), 4-aminopiridin - 4-AP (blokator voltažno-zavisnih K⁺ kanala, K_v). Optimalna koncentracija blokatora (IC₅₀), kao i optimalno vreme inkubacije određeno je u odvojenim eksperimentima. Tako je za tonične kontrakcije koncentracija blokatora bila: GL 4 μM, TEA 0,5 mM, 4-AP 5 mM, dok je kod kontrakcija izazvanih električnom stimulacijom korišćena koncentracija TEA 0,25 mM, a koncentracije GL i 4-AP su bile iste. Količina supstanci, koje su dodavane u vodeno kupatilo

preračunate se u odnosu na zapreminu vodenog kupatila. Dizajn eksperimenta: grupa 1 - tonične kontrakcije izazvane KCl; grupa 2 - tonične kontrakcije izazvane KCl + ibogain (rastuće, kumulativne doze), ispiranje; grupa 3/4/5 - tonične kontrakcije izazvane KCl + pretretman (GL/TEA/4-AP) + ibogain (rastuće, kumulativne doze), ispiranje; grupa 6 - ES; 7 - ES + ibogain (rastuće, kumulativne doze), ES nakon svake dodate doze ibogaina, ispiranje, ES; grupa 8/9/10 - ES + pretretman (GL/TEA/4-AP) + ES + ibogain (rastuće, kumulativne doze), ES nakon svake dodate doze ibogaina, ispiranje + ES. Ispiranje se radi na kraju eksperimenta da bi se proverila reverzibilnost tretmana i očuvanost preparata. Kontraktilnost terminalnog ileuma analizirana je na osnovu amplitude (za tonične i električne kontrakcije), i površine ispod krive za tonične kontrakcije (*eng.* area under curve, AUC). Registracija i analize kontrakcija terminalnog ileuma urađena je pomoću programa Experimentria; S.P.E.L. Advace Isosys software (Mađarska).

Nakon statističke obrade dobijenih podataka izabrane su grupe: I) kontrolna (K), II) ileumi tretirani kumulativnim dozama ibogaina (IB) i III) ileumi pretretirani glibenklamidom i tretirani kumulativnim dozama ibogaina (GL/IB) u kojima je urađena analiza aktivnosti antioksidativnih enzima (ukupna SOD, KAT, GSH-Px, GR). Kao kontrolne grupe korišćeni su ileumi koji su samo stimulirani KCl/ES. Sa tim vrednostima aktivnosti enzima poređene su vrednosti aktivnosti enzima u tretiranim grupama.

3.18. Obrada farmakoloških podataka

Amplituda kontrakcije merena je u odnosu na baznu liniju. Efekat tretmana je poređen u odnosu na kontrolni nivo (bez tretmana) u okviru istog zapisa. Kod toničnih kontrakcija, kontrakcija izazvana KCl smatrana je maksimalnom (100% kontrakcije). Kod električne stimulacije, kontrakcije izazvane ES na početku eksperimenta smatraju se maksimalnim. U seriji eksperimenata sa pretretmanima maksimalna koncentracija je ona nakon dodavanja pretretmana (izabrane su koncentracije pretretmana koje same po

sebi ne dovode do promene amplitude kontrakcije). Efekat ibogaina se prati u odnosu na amplitudu kontrakcije postignutu 20 min nakon dodavanja pretretmana.

3.19. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka je urađena po protokolu koji je opisao Hinkle (Hinkle i sar., 2002), pomoću programa Statistica 9.1.

Za analizu aktivnosti antioksidativnih enzima, GST, XOD, TBARS, koncentracija ukupnih i neproteinskih slobodnih -SH grupa, prisustva glikogena u hepatocitima, koncentraciju glukoze u krvi, količine konzumirane vode i hrane u *in vivo* tretmanu korišćana je one-way ANOVA ($p < 0,05$) i Tukey HSD post hoc test ($p < 0,05$). U statističkoj obradi rezultata pokazano je da nema razlika između kontrolnih grupa K6 i K24, te su one spojene i predstavljene kao jedna grupa K. Na taj način povećan je i uzorak i smanjena varijabilnost unutar kontrolne grupe. U statističkoj šemi proveravanja značajnosti razlika, često se događa da analiza varijanse (ANOVA) pokaže značajnost, ali blizu granične (nešto ispod limita od 0,05). Tada je stvar eksperimentalnog dizajna koji post hoc test primeniti. U situaciji višestrukog poređenja, da bi se korigovala razlika u varijabilnosti unutar grupa, uvek je sugerisan Tukey HSD t-test. Osim toga, rad sa eksperimentalnim biološkim, živim, jedinkama nosi visoku stopu individualne promenljivosti i u tom smislu ovde je opet izabran i korišćen višestruki Tukey HSD-test, da bi se korigovala razlika u varijabilnosti unutar grupa. Tukey HSD test je veoma snažan statistički test i izabran je jer smanjuje grešku graničnog tumačenja značajnosti i prikazivanje možda i malih promena kao statistički značajnih u uslovima poređenja srednjih vrednosti, što je u graničnim slučajevima moguće.

Za izračunavanje statistička značajnost distribucije inteziteta PAS bojenja korišćen je Kolmogorov-Smirnov hi-kvadrat test, $p < 0,05$. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM.

Za *ex vivo* eksperiment: rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SEM u odnosu na maksimalno kontrahovani ileum sa 60 mM KCl/ES. Rezultati su uzimani kao procenat u odnosu na kontrolu, a prikazani kao srednja vrednost \pm SEM a koncentracija je prikazana na logaritamskoj skali. Statistička obrada je rađena na logaritmovanim podacima (uzet je \ln). Statistička značajnost efekata doze i pretretmana je proveravana dvofaktorijskom analizom varijanse (ANOVA) sa dozom i pretretmanom kao faktorima. Krive su fitovane na sigmoidalni način korišćenjem Bolcmanovog fita i poređene F-testom. Iz krivih su izračunavane EC_{50} vrednosti i poređene t-testom. Za poređenje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u izolovanim ileumima korišćena je One-way ANOVA ($p < 0,05$); za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD-test ($p < 0,05$).

4. REZULTATI

4.1. Efekat ibogaina na aktivnost antioksidativnih enzima, XOD, koncentraciju TBARS, -SH grupa i histološka analiza

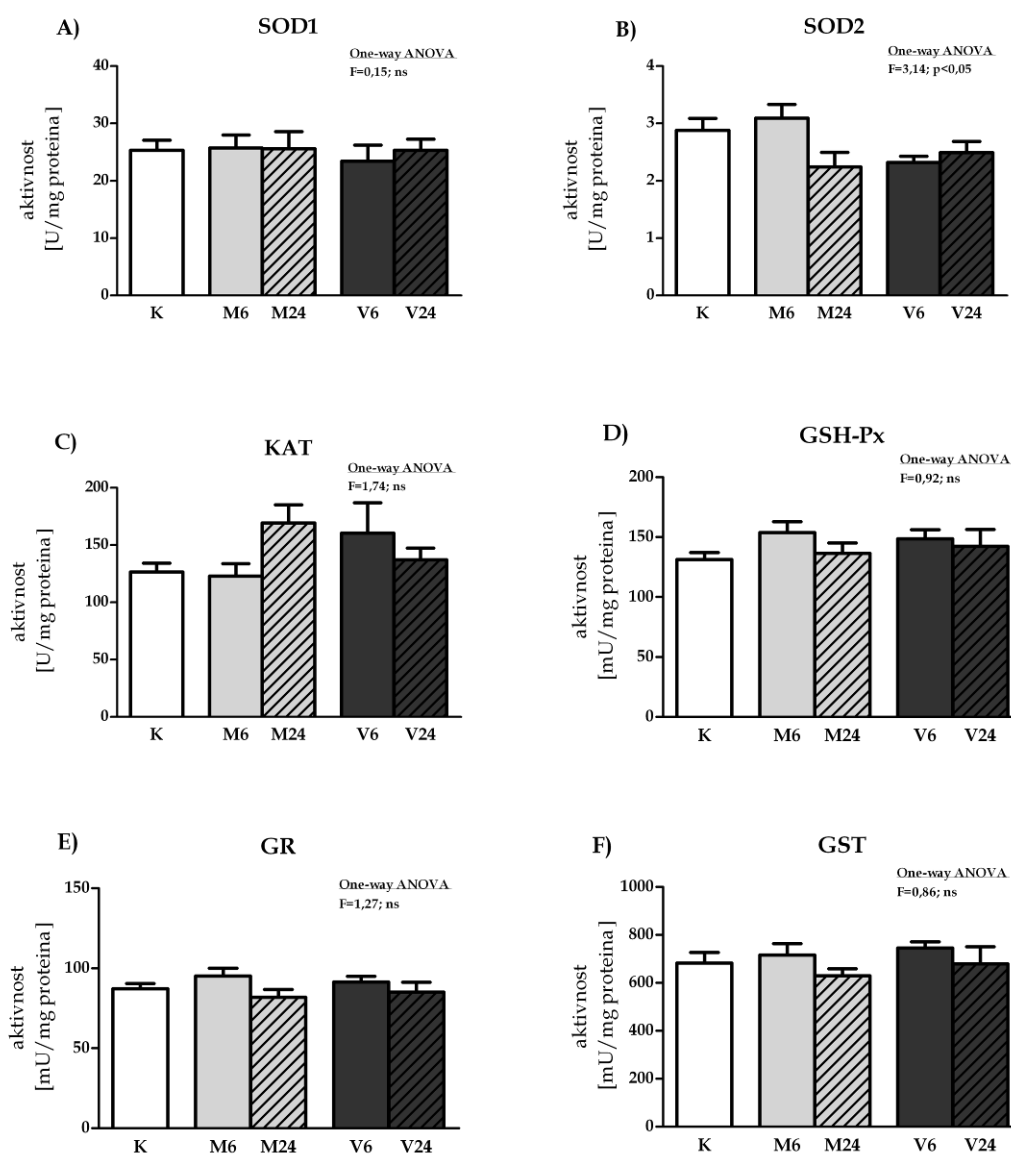
4.1.1. Metabolička tkiva

4.1.1.1. Jetra

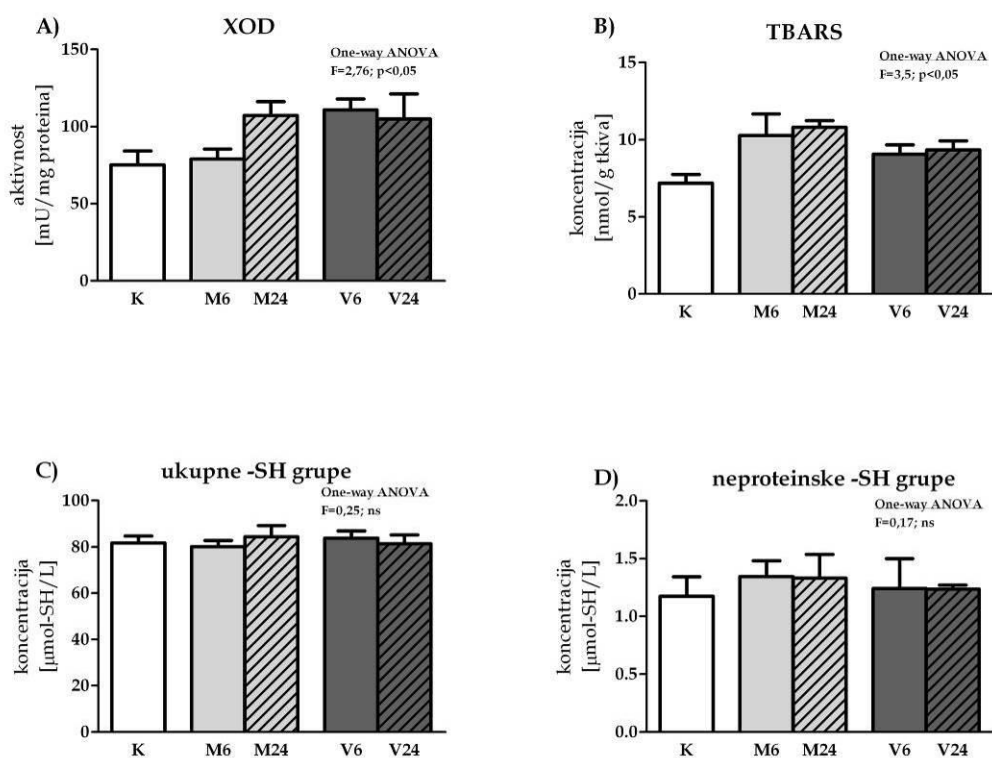
Nema razlike u aktivnosti antioksidativnih enzima (slika 8) između kontrole i tretiranih grupa. Iako je jednofaktorska analiza varijanse pokazala umerenu statističku značajnost za efekat ibogaina na aktivnost SOD2 (ANOVA, $p < 0,05$) Tukey post hoc HSD test nije tu značajnost između pojedinačnih grupa potvrdio. Slično je i sa postojanjem trenda promene aktivnosti XOD (slika 9A) u smislu da je kod tretiranih grupa izmerena veća aktivnost nego kod kontrolnih (ANOVA, $p < 0,05$), ali opet post hoc Tukey HSD test nije pokazao značajnost. Od neenzimskih parametara, u jetri nema promena u koncentraciji ni ukupnih (slika 9C), ni neproteinskih -SH grupa (slika 9D), ali je koncentracija TBARS značajno povećana u grupi životinja praćenih 6 h nakon tretmana dozom od 1 mg/kg t.m. (slika 9B).

Histološka analiza jetre (HE bojenje) je pokazala normalnu morfologiju, bez prisustva histopatoloških promena u kontrolnoj i tretiranim grupama (slika 10). Analiza PAS preparata pokazuje različiti broj ćelija pozitivnih na glikogen (slika 11) i različiti intenzitet obojenosti glikogena u tretiranim grupama, u odnosu na kontrolnu. Broj ćelija pozitivnih na glikogen, na 100 ćelija je smanjen u tretiranim grupama u odnosu na kontrolnu (slika 12) (ANOVA, $p < 0,001$). U grupi tretiranoj dozom ibogaina 1 mg/kg t.m. dolazi do smanjenja broja ćelija pozitivnih na glikogen i ostaje na istom nivou i nakon 24 h (Tukey post hoc, $p < 0,001$). Kod životinja tretiranih većom dozom ibogaina (20 mg/kg t.m.), nakon 6 h takođe je zabeleženo smanjenje broja ćelija pozitivnih na glikogen u

odnosu na kontrolu ($p < 0,05$), ali je to smanjenje još izraženije nakon 24 h ($p < 0,001$). Analiza intenziteta obojenosti glikogena pokazala je značajnu razliku

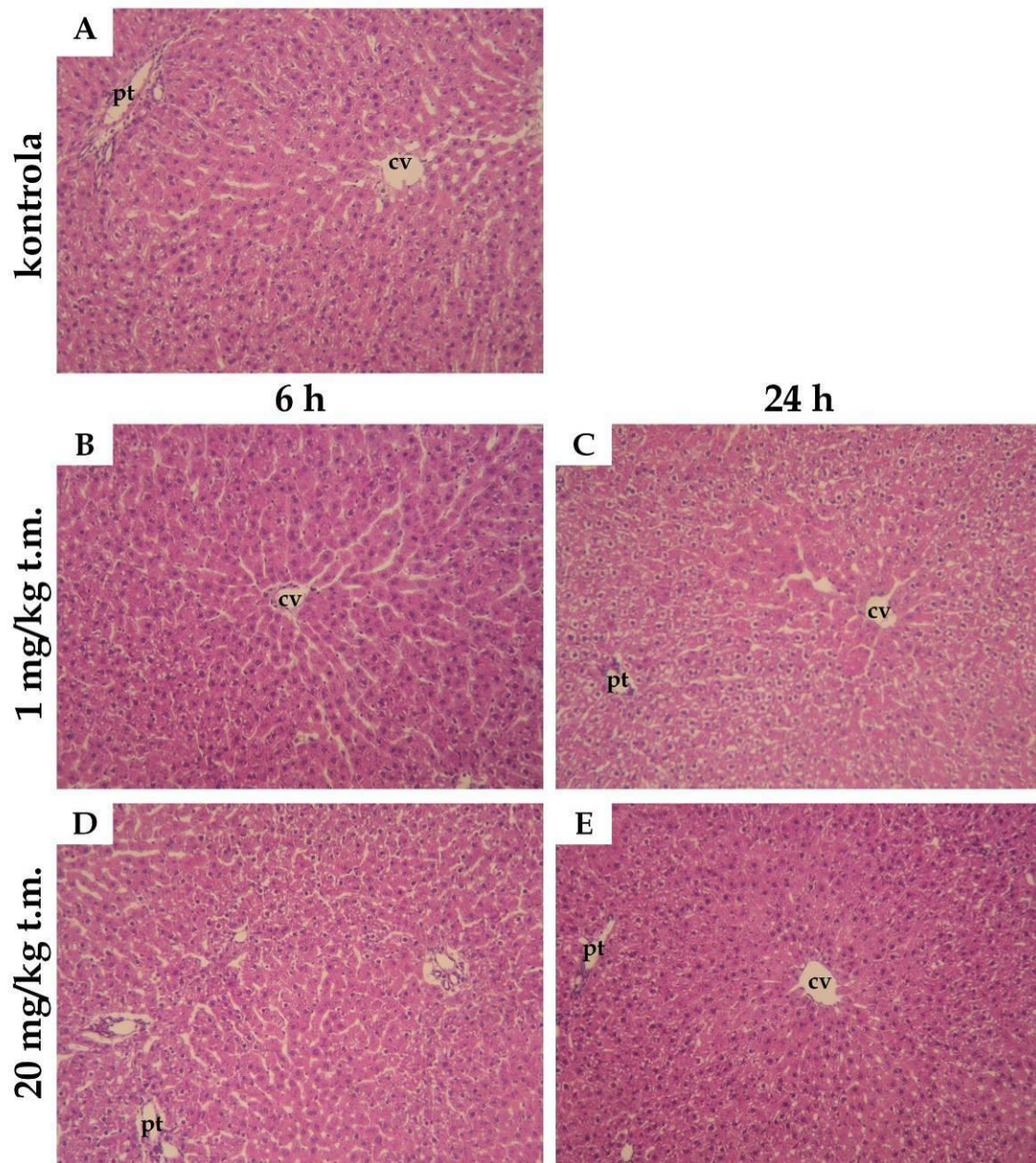


Slika 8. Aktivnost enzima u jetri: A - superoksid dismutaza 1 (SOD1), B - superoksid dismutaza 2 (SOD2), C - katalaza (KAT), D - glutation peroksidaza (GSH-Px), E - glutation reduktaza (GR) i F - glutation S transferaza (GST). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$).

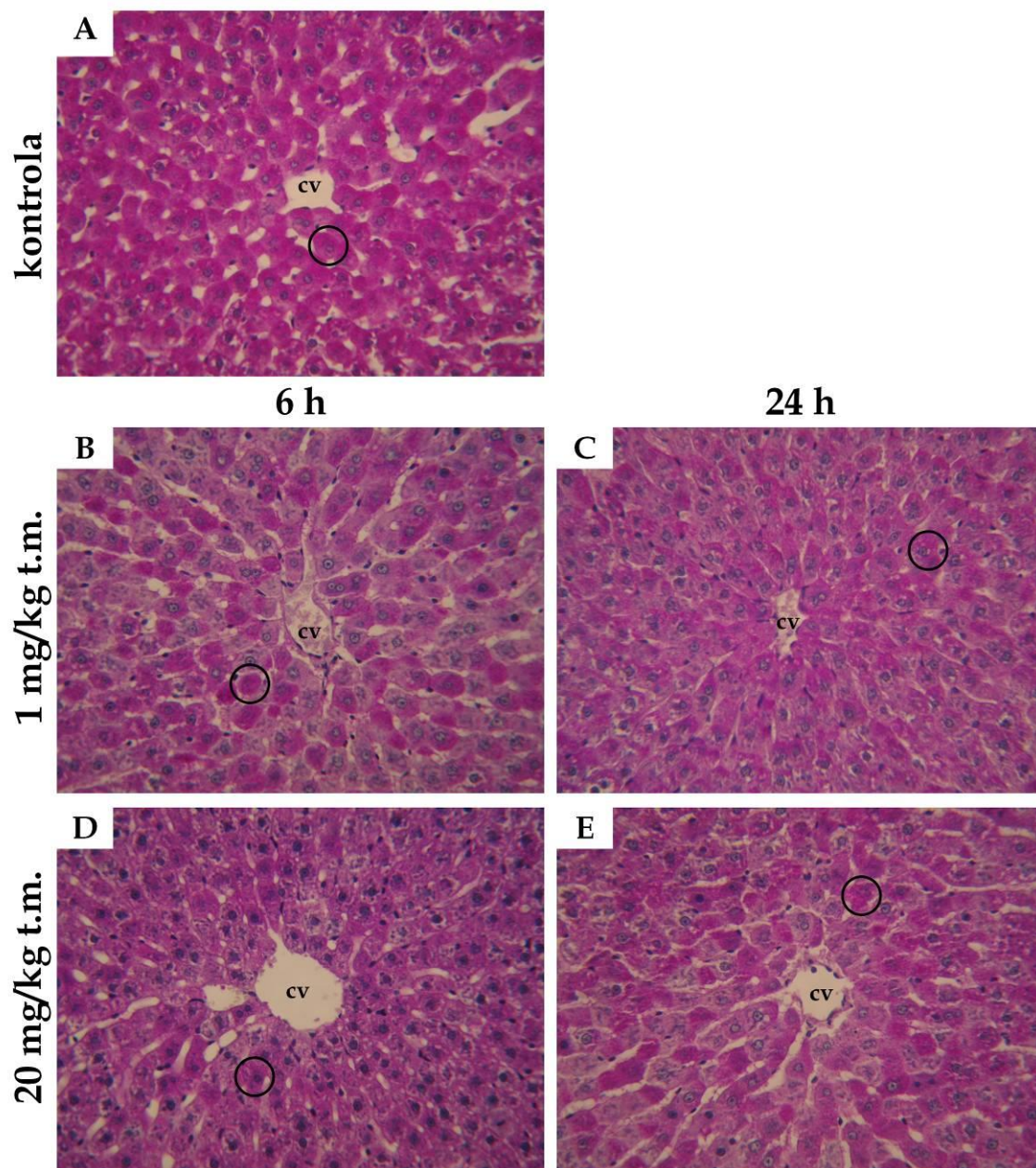


Slika 9. A - Aktivnost enzima ksantin oksidaze (XOD), B - koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS), C - ukupnih i D - neproteinskih -SH grupa u jetri. Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$).

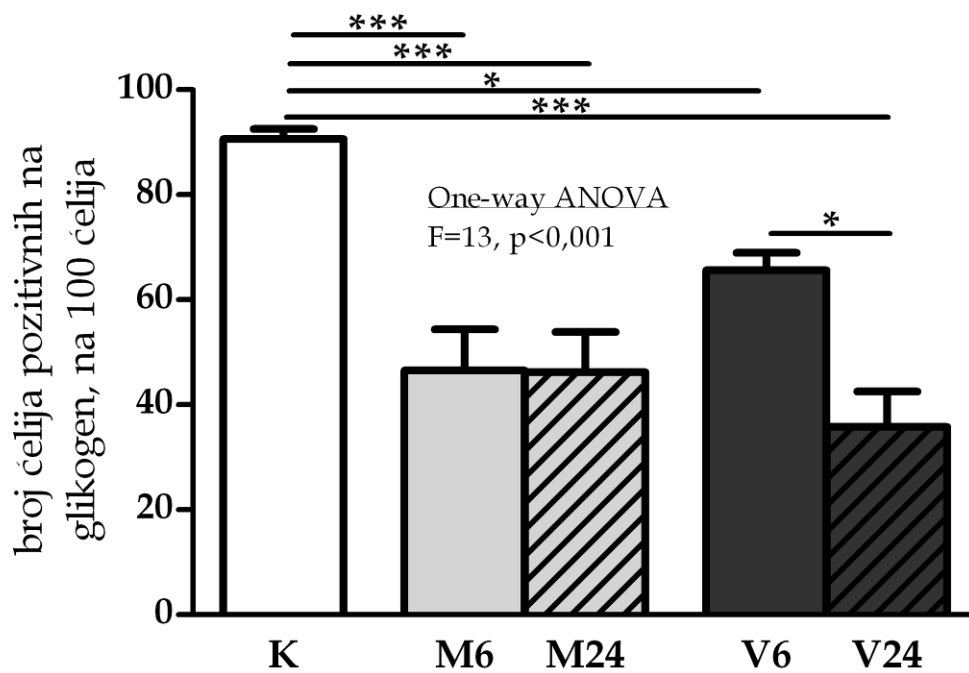
distribucije između grupa (slika 13) (Kolmogorov-Smirnov hi-kvadrat test, $p < 0,001$). U kontrolnim grupama uzorci su klasifikovani u grupu +++ . Tretman ibogainom dozom 1 mg/kg t.m. doveo je do smanjenja inteziteta obojenosti glikogena nakon 6 h, pri čemu su 3 životinje klasifikovane u grupu +, a tri u grupu ++ . Nakon 24 h intezitet obojenosti je nešto veći, dva uzorka su klasifikovana u grupu +, a četiri u grupu ++ . Tretman ibogainom 20 mg/kg t.m. takođe dovodi do smanjenja inteziteta obojenosti glikogena nakon 6 h, pet uzoraka je klasifikovano u grupu ++, a jedan u grupu +++ . Nakon 24 h izraženije je smanjenje inteziteta, pet uzoraka je u grupi +, a jedan u grupi ++ .



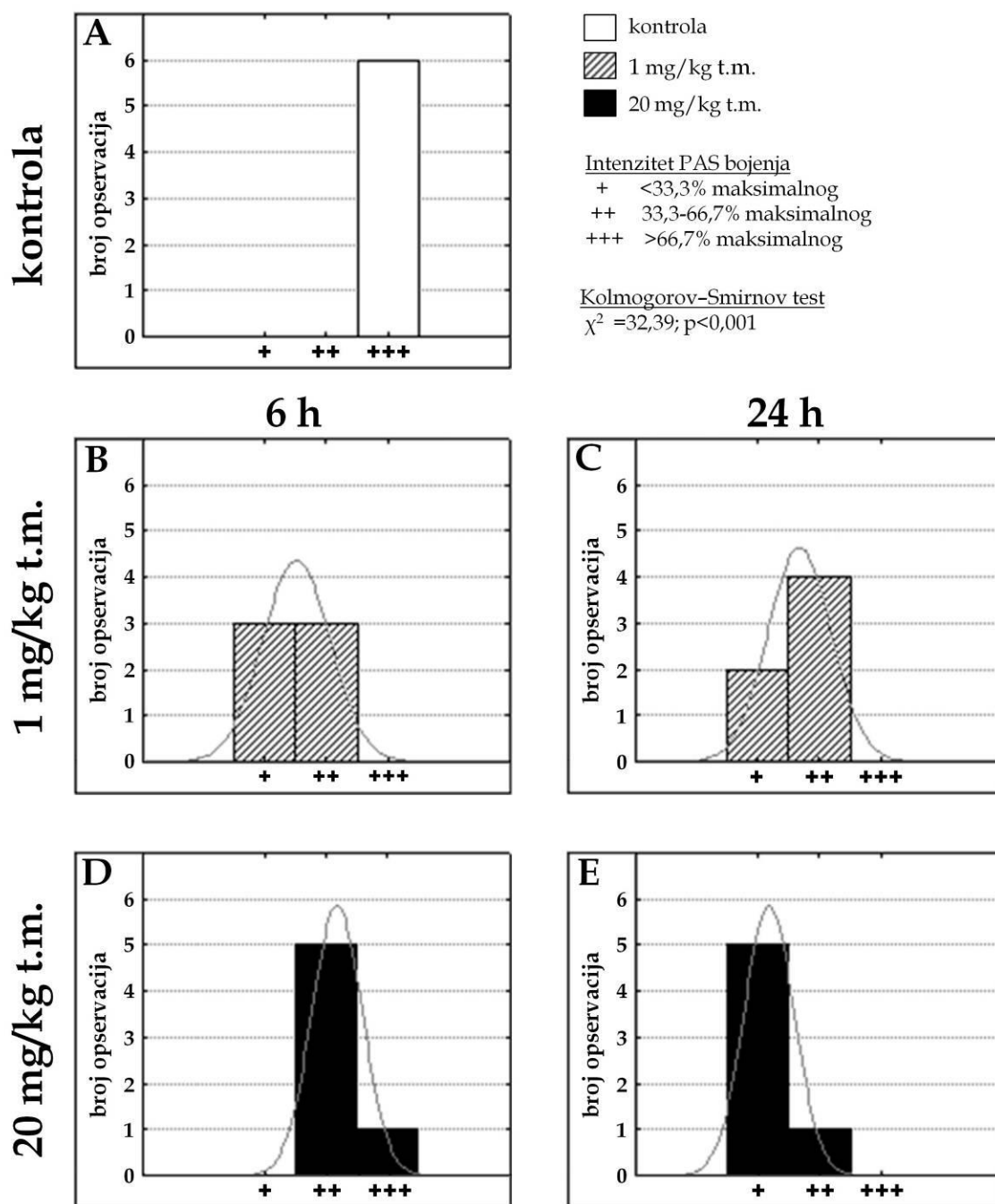
Slika 10. Reprezentativne mikrografije uzoraka jetre (HE, 200x). Nema patoloških promena ni kod jedne tretirane grupe (B, C, D, E) u odnosu na netretiranu kontrolu (A). Centralna vena (cv), portna trijada (pt), telesna masa (t.m.).



Slika 11. Reprezentativne mikrografije uzoraka jetre (PAS, 400x). Kod netretiranih kontrolnih životinja hepatociti su puni glikogena (A). Smanjena je količina glikogena kod životinja tretiranih ibogainom (B, C, D, E) u odnosu na netretiranu kontrolu (A). Centralna vena (cv), portna trijada (pt), telesna masa (t.m.), ćelije sa glikogenom su obeležene punom kružnom linijom.



Slika 12. Prisustvo glikogena u hepatocitima, izraženo kao broj ćelija koje sadrže glikogen, na 100 ćelija. Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazana je F vrednost; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); *** - $p < 0,001$, * - $p < 0,05$.

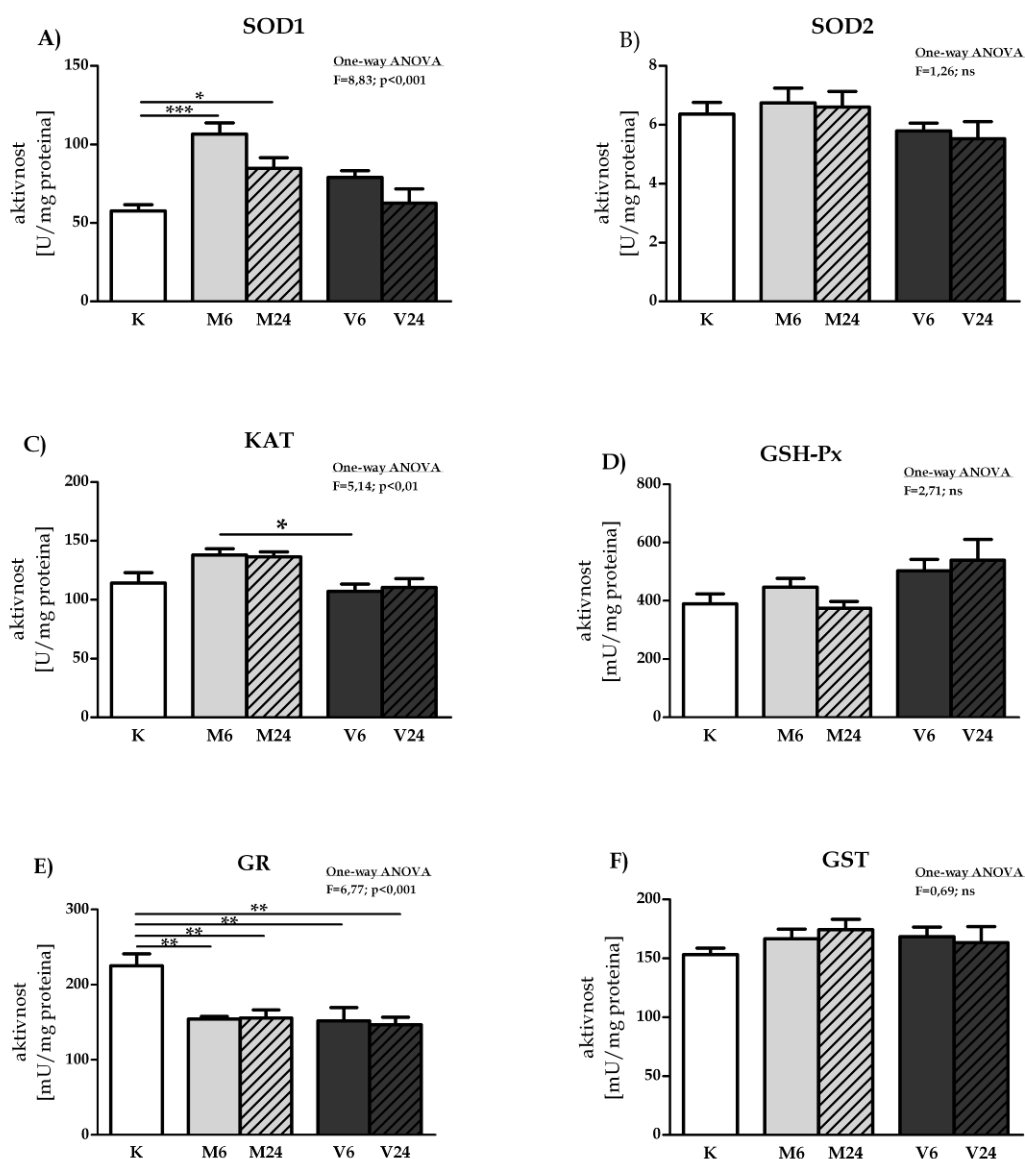


Slika 13. Intenzitet obojenosti glikogena (količina glikogena). Svaki uzorak je klasifikovan u jednu od tri grupe u zavisnosti od količine glikogena. Za statističku obradu rezultata korišćen je Kolmogorov-Smirnov hi-kvadrat test ($p < 0,05$); prikazana je χ^2 vrednost, t.m. – telesna masa.

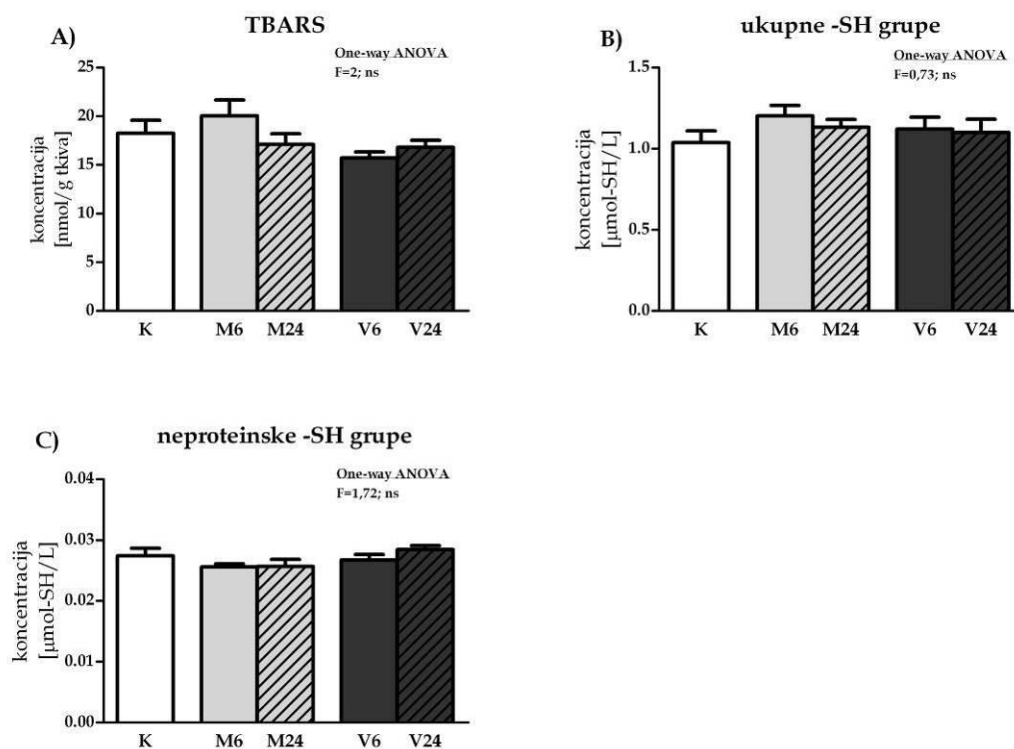
4.1.1.2. Bubrezi

Tretman ibogainom, doza 1 mg/kg t.m., dovodi do povećanja aktivnosti enzima SOD1, 6 h nakon tretmana i na tom nivou ostaje i 24 h kasnije (slika 14A). Aktivnost SOD1 nije povećana u istom periodu za primljenu dozu od 20 mg/kg t.m. - u nivou kontrole je. U bubrezima je takođe zabeleženo smanjenje aktivnosti GR (slika 14E) 6 h nakon tretmana i to za obe korišćene doze. Smanjenje aktivnosti GR je zabeleženo i nakon 24 h u odnosu na kontrolu. Aktivnosti enzima SOD2, GSH-Px i GST (slika 14) nisu promenjene nakon tretmana ibogainom. Pri tretmanu ibogainom u dozi od 20 mg/kg t.m. vidljiv je porast aktivnosti enzima GSH-Px, ali ANOVA nije pokazala statističku značajnost ($p=0,0532$), kao ni post hoc test u odnosu na kontrolu i na vrednosti posle manje doze. Razlike u aktivnosti KAT između životinja tretiranih ibogainom i kontrola ne postoje (slika 14C), ali te statistički neznačajne diskretne promene prilikom računanja su ukazale na razlike između tretiranih grupa. Kako sveukupno one nisu značajno različite od kontrola, neće se razmatrati. Primena ibogaina *per os* ni u jednoj dozi ni u jednom vremenu nije dovela do promena ni u nivou TBARS, ni u novou -SH grupa (slika 15).

Histološka analiza bubrega pokazala je normalnu morfologiju, bez prisustva histopatoloških promena u kontrolnoj grupi životinja. Međutim, u grupama životinja tretiranih ibogainom promene blagog i umerenog inteziteta su jasno uočljive (slika 16). Dok je građa glomerula očuvana, na epitelnim ćelijama proksimalnih tubula, koje se nalaze u neposrednoj blizini glomerula vide se distrofične promene. U kontrolnoj grupi životinja lumeni tubula su okruglog ili ovalnog oblika, dok su jedra jasno uočljiva. U tretiranim grupama vide se promena u veličini epitelnih ćelija (povećava im se volumen) i posledično obliku lumenu samih tubula koji postaju nepravilnog zvezdastog oblika. Intezitet promena je veći posle primene veće doze (20 mg/kg t.m.) i nakon 24 h. Tačan broj životinja unutar grupa sa blagim ili umerenim promenama prikazan je na slici 17. U citoplazmi ovih ćelija nalazi se veliki broj acidofilnih granula, koje odgovaraju uvećanim mitohondrijama što im daje

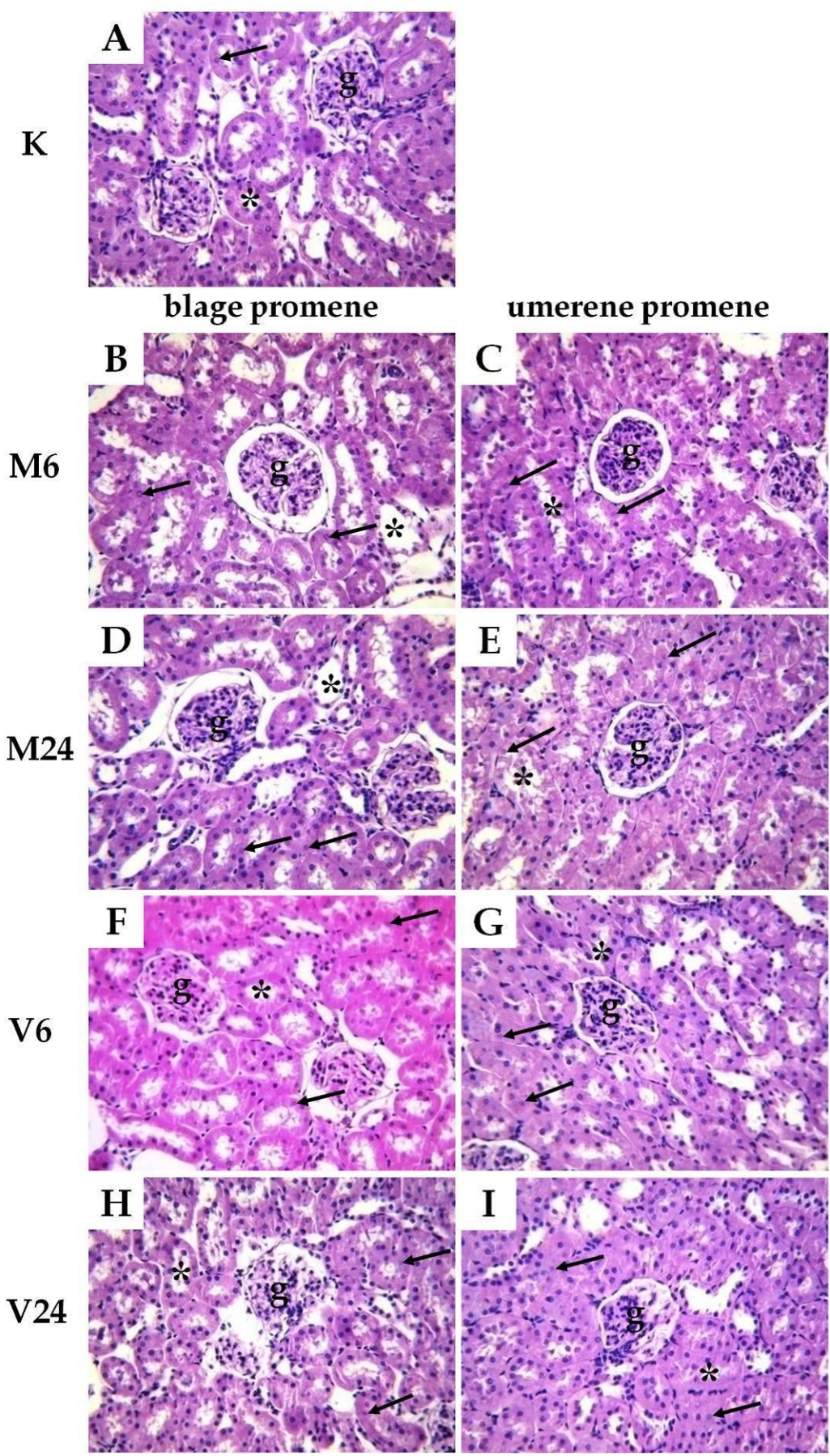


Slika 14. Aktivnost enzima u bubrezima: A - superoksid dismutaza 1 (SOD1), B - superoksid dismutaza 2 (SOD2), C - katalaza (KAT), D - glutation peroksidaza (GSH-Px), E - glutation reduktaza (GR) i F - glutation S transferaza (GST). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p<0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p<0,05$); ***- $p<0,001$; **- $p<0,01$; *- $p<0,05$.

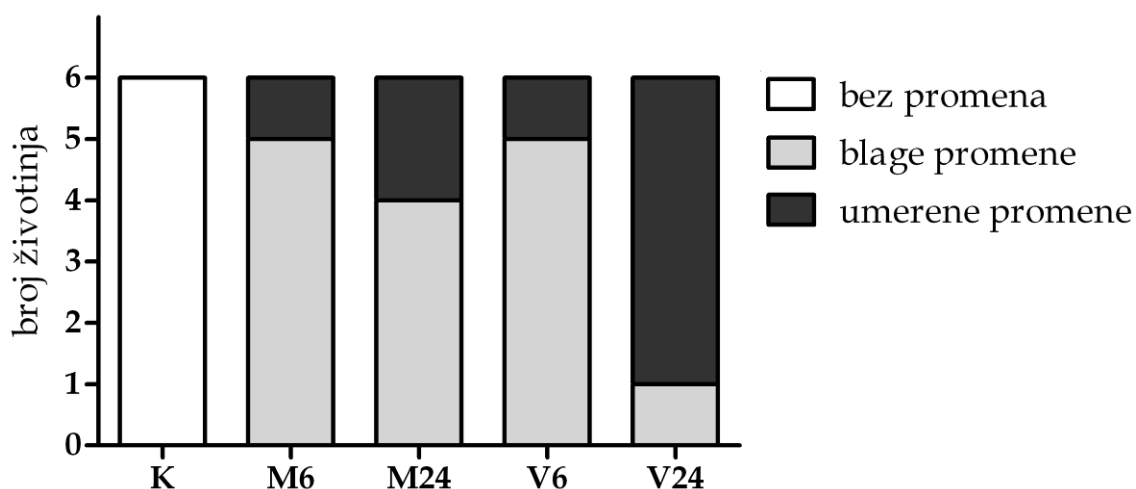


Slika 15. A – koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS), B – ukupnih i C – neproteinskih -SH grupa u bubrezima. Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p<0,05$), prikazane su F vrednosti.

karakterističan granulirani izgled. Jedra su okruglasta, slabo vidljiva ili fokalno odsutna. Granice između pojedinačnih voluminoznih ćelija su manje jasne. Renalni intersticijum je bez morfoloških promena.



Slika 16. Reprezentativne mikrografije kore bubrega (HE, 400x). A – kontrolna grupa (korteks bubrega sa očuvanim glomerulima i ovalnim tubulama, koje imaju široke i pravilne lumene i normalne epitelne ćelije sa jasno vidljivim jedrima); B, D, F, H – blage promene (lumeni tubula su okrugli ili ovalni, dok je volumen tubularnih ćelija blago povećan. Nukleusi ćelija su fokalno manje vidljivi); C, E, G, I – umerene promene (lumeni tubula su nepravilni, zvezdasti dok je volumen tubularnih ćelija izraženo povećan. Nukleusi su manje vidljivi ili fokalno odsutni. Lumeni tubula su obeleženi zvezdicama, a jedra strelicama.



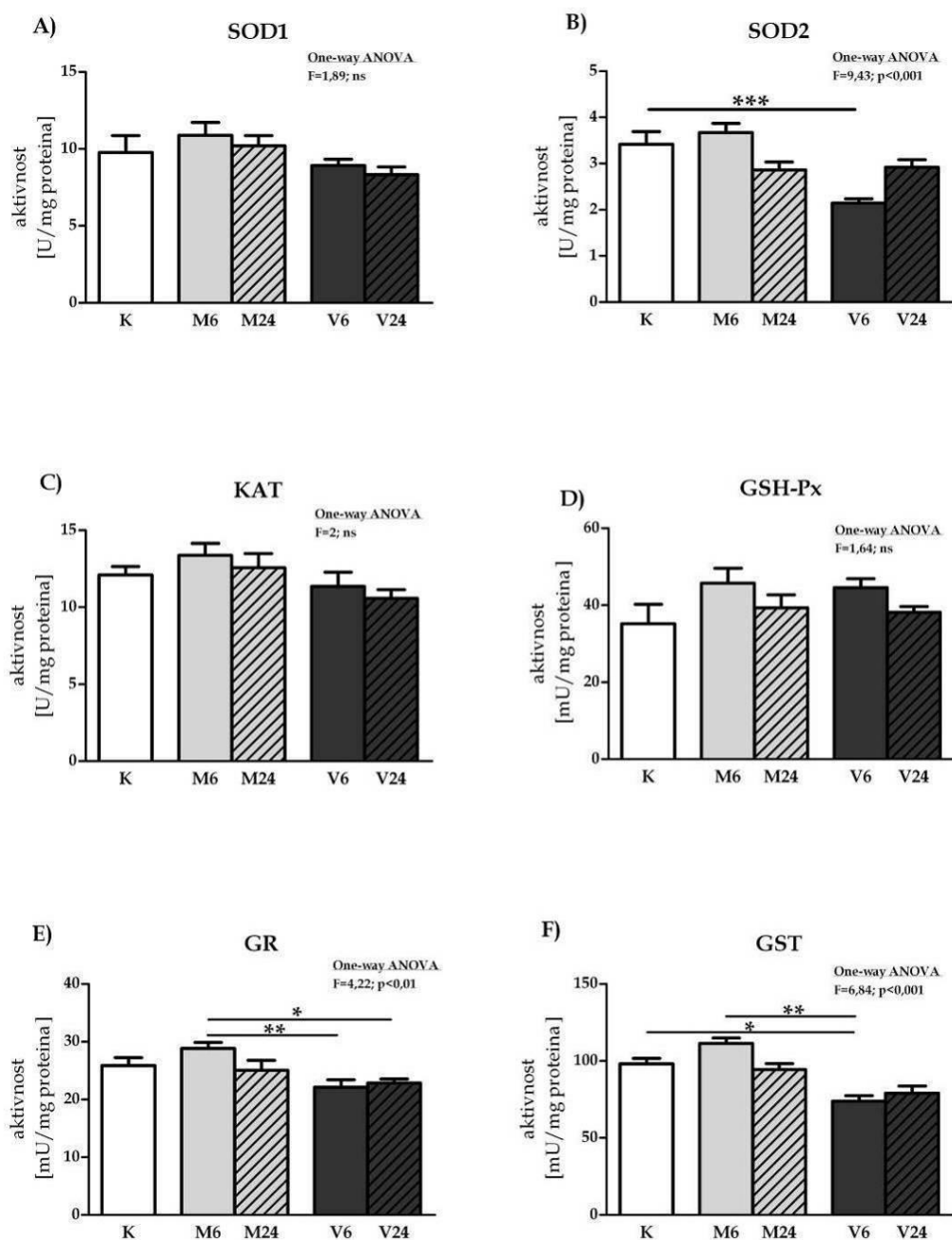
Slika 17. Morfološke promene u bubrezima. Broj životinja sa blagim ili umerenim promenama

4.1.2. Kontraktilna tkiva

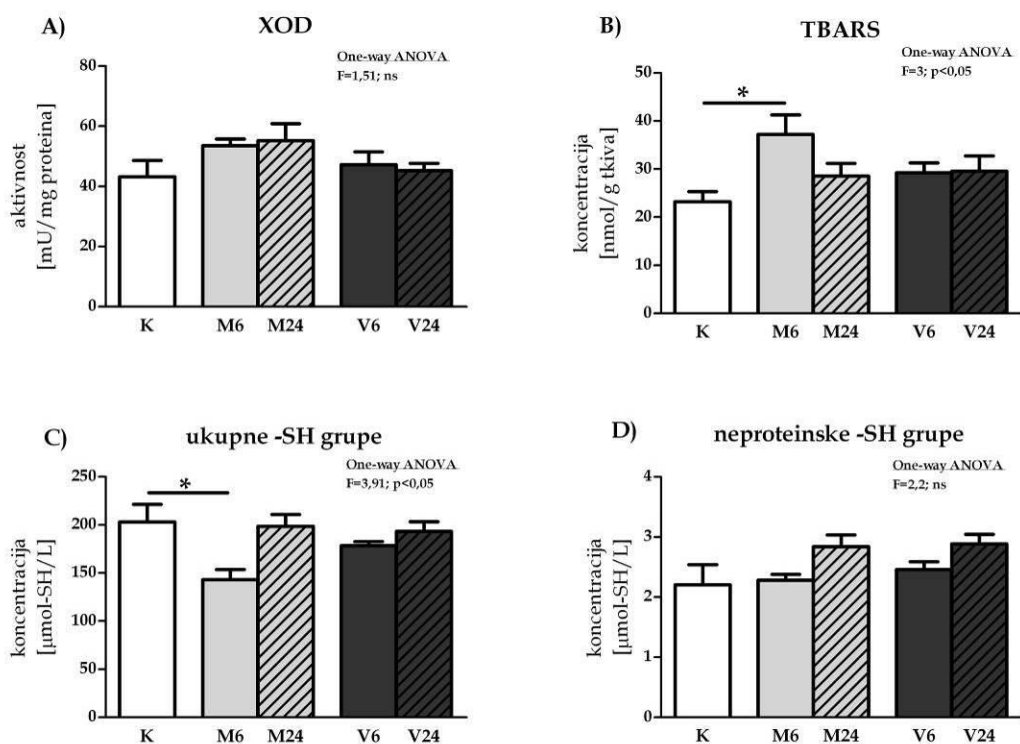
4.1.2.1. Srce

Primena ibogaina u dozi od 20 mg/kg t.m. dovela je do smanjenja aktivnosti SOD2 posle 6 h ($p < 0,001$), ali posle 24 h se statistička značajnost razlike gubi (slika 18B). Osim toga, u srcu je posle 6 h izmereno i statistički značajno smanjenje aktivnosti GST ($p < 0,05$), koje se u odnosu na kontrolu zadržava i posle 24 h, ali nije statistički značajno posle primene post hoc Tukey HSD testa (slika 18F). Kao i u slučaju bubrega, posle tretmana ibogainom, mogu se uočiti i razlike između tretiranih grupa: aktivnost GR kod životinja tretiranih većom dozom ibogaina posle 6 i 24 h je niža u odnosu na životinje tretirane malom dozom posle 6 h (slika 18E). Tretman ibogainom u dozi od 1 mg/kg t.m. uzrokovao je povećanje količine TBARS nakon 6 h ($p < 0,05$, post hoc HSD Tukey test), ali su izmereni nivoi posle 24 h u nivou kontrola (slika 19B). Generalno je posle tretmana ibogainom došlo i do smanjenja količine ukupnih -SH grupa (ali ne i neproteinskih) posle 6 h u odnosu na kontrole, ali se njihova količina vratila na kontrolni nivo posle 24 h (slika 19C).

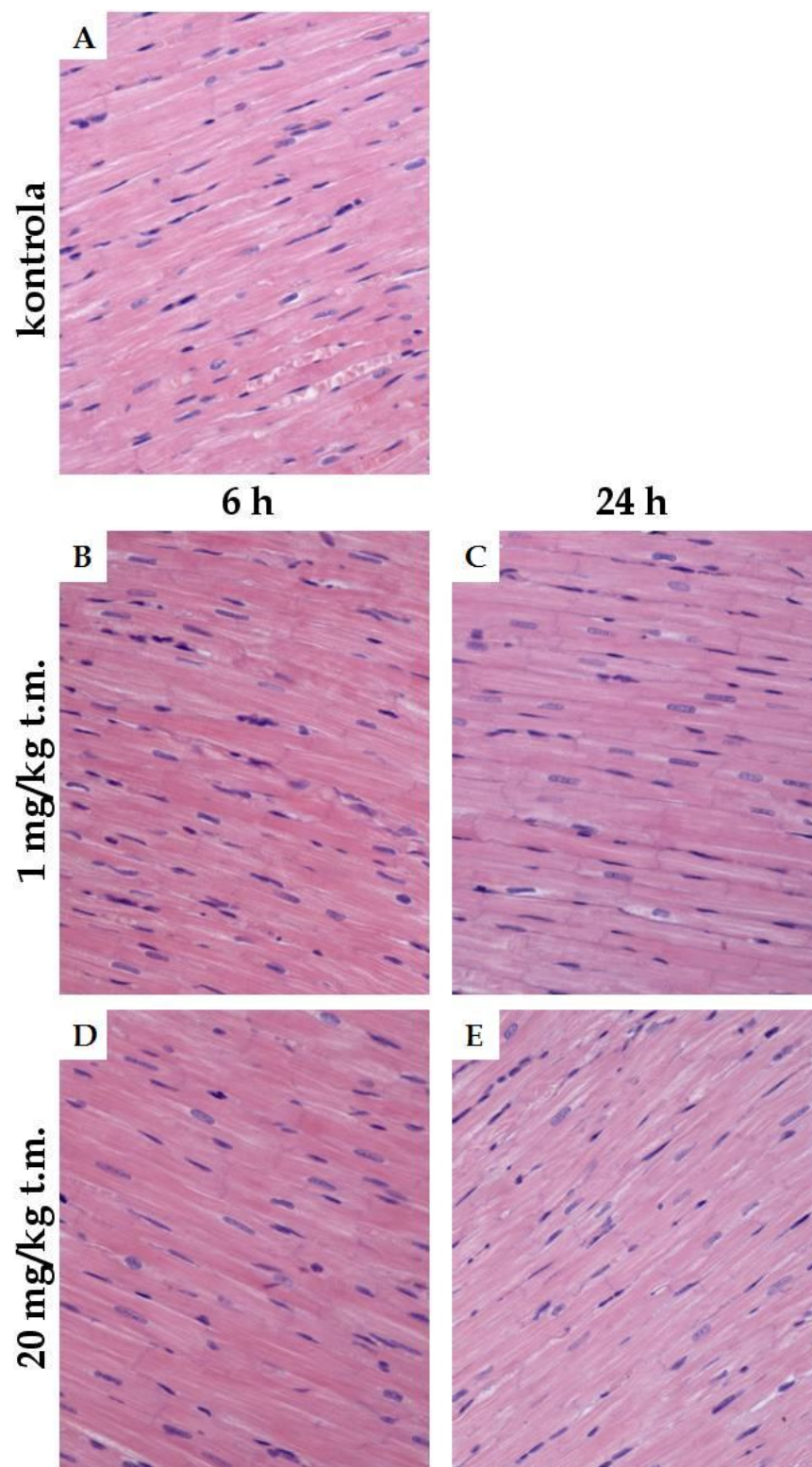
Histološka analiza srca (HE bojenje) je pokazala normalnu morfologiju, bez prisustva histopatoloških promena u kontrolnoj i tretiranim grupama (slika 20). Analiza PAS preparata (slika 21) pokazuje blago povećanje količine glikogena u miocitima životinja tretiranih ibogainom 20 mg/kg t.m., nakon 6 i 24 h.



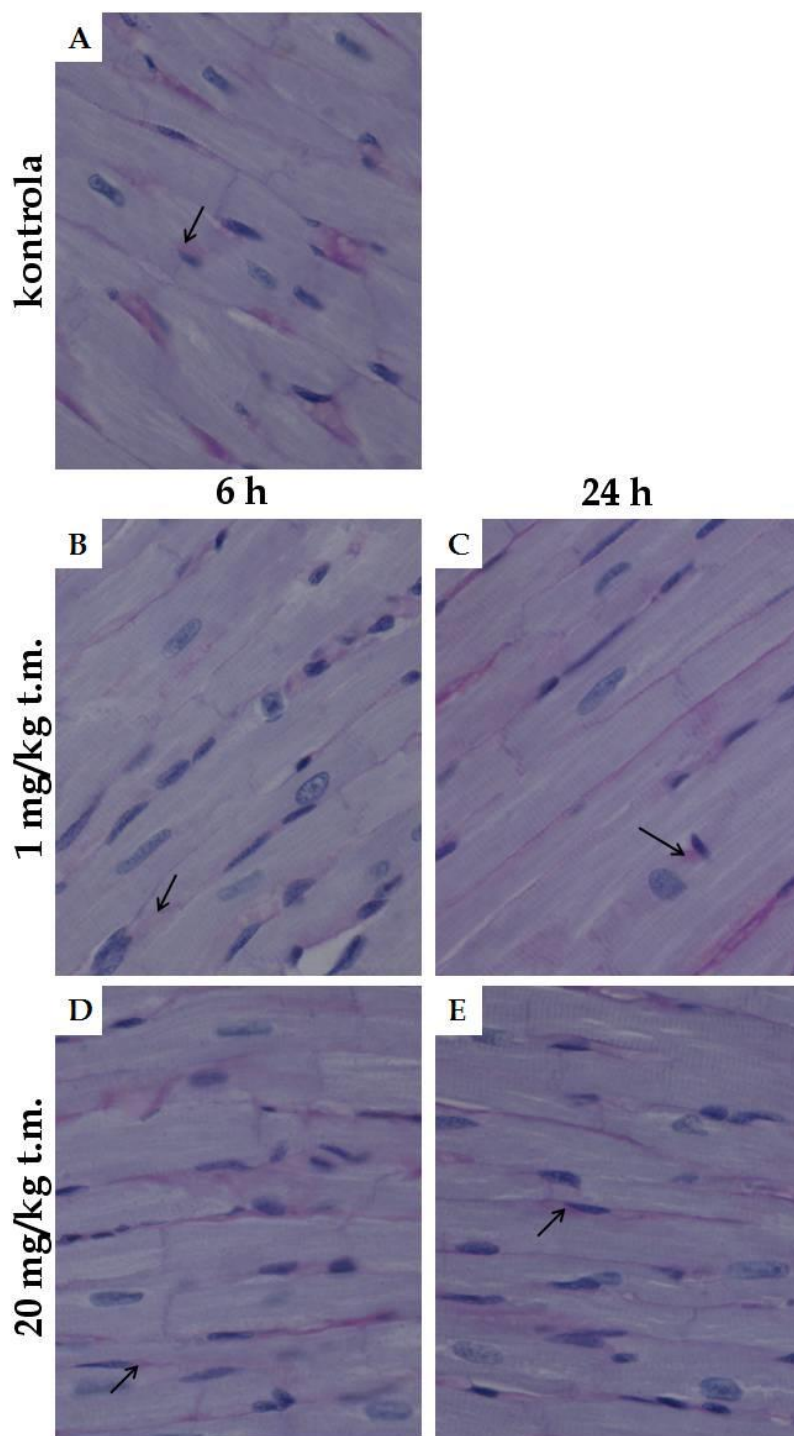
Slika 18. Aktivnost enzima u srcu: A - superoksid dismutaza 1 (SOD1), B - superoksid dismutaza 2 (SOD2), C - katalaza (KAT), D - glutation peroksidaza (GSH-Px), E - glutation reduktaza (GR) i F - glutation S transferaza (GST). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); ***- $p < 0,001$; **- $p < 0,01$; *- $p < 0,05$.



Slika 19. A - Aktivnost enzima ksantin oksidaza (XOD), B - koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS), C - ukupnih i D - neproteinskih -SH grupa u srcu. Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); *- $p < 0,05$.



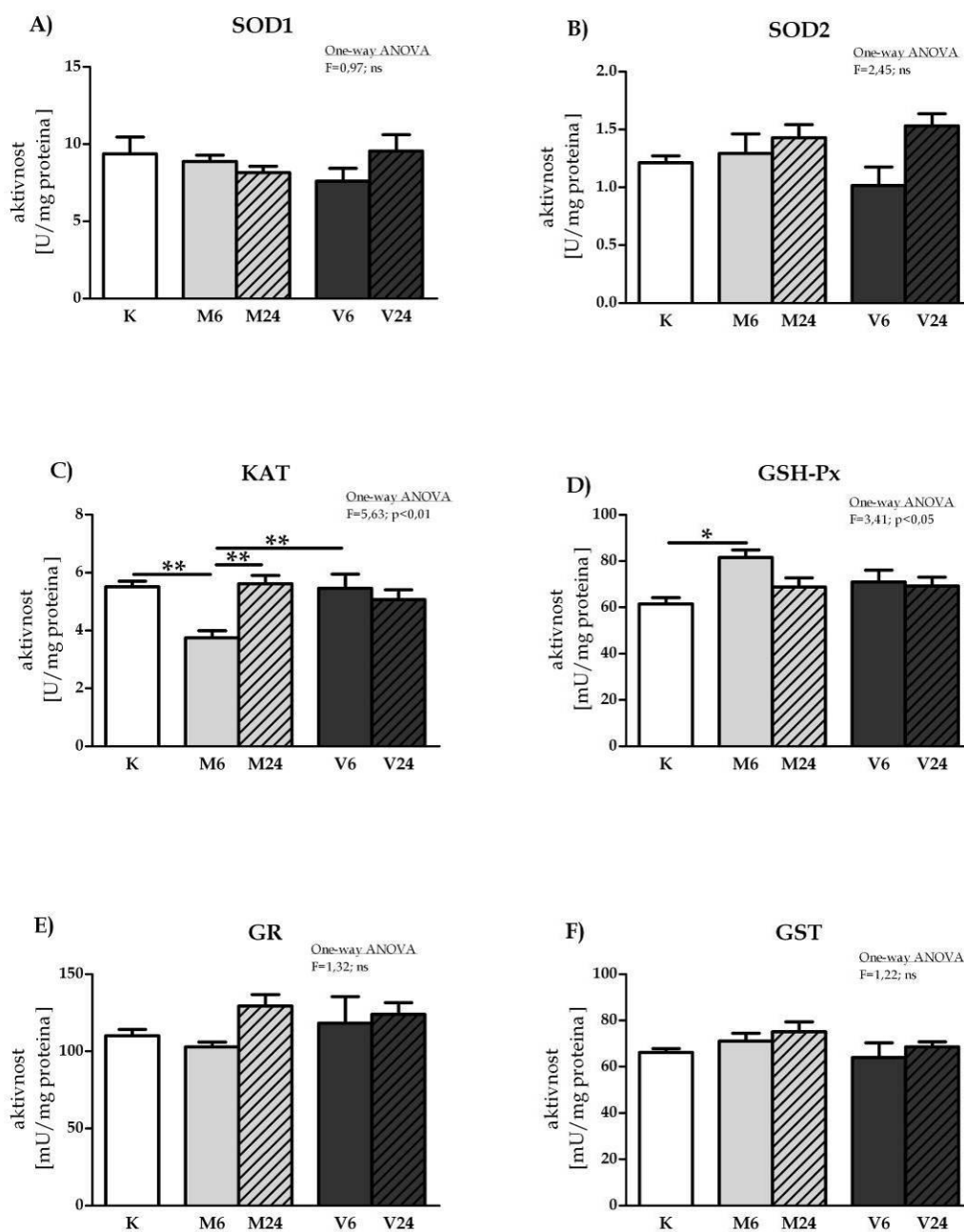
Slika 20. Reprezentativne mikrografije uzoraka srca (HE, 200x). Nema promena u izgledu miocita (bez histopatoloških promena) kod tretiranih grupa (B, C, D, E) u odnosu na netretiranu kontrolu (A).



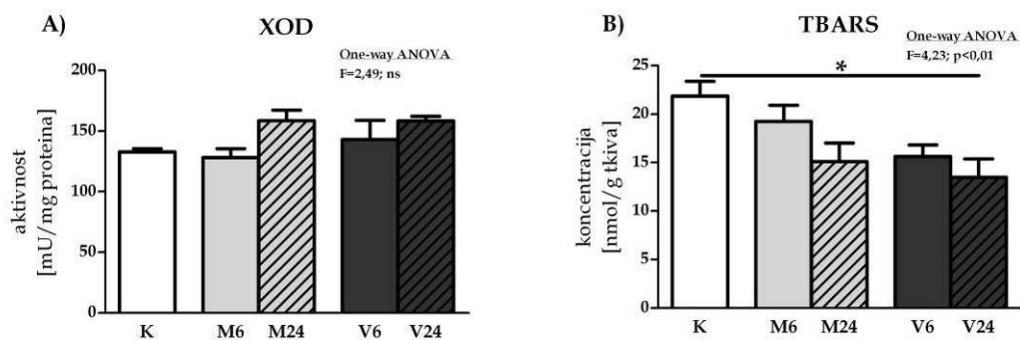
Slika 21. Reprezentativne mikrografije uzoraka srca (PAS, 400x). Nema razlika u količini glikogena u miocitima kod životinja iz grupa M6 i M24 (B, C) u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu (A). Kod životinja iz grupa V6 i V24 prisutna je nešto veća količina glikogena (D, E) u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu. Strelice označavaju glikogen u miocitima.

4.1.2.2. Ileum

Aktivnosti SOD1 i 2, GR i GST (slika 22) se nisu promenile nakon davanja ibogaina, bez obzira na dozu i vreme kada je aktivnost merena. Promene u nivou aktivnosti KAT i GSH-Px (slika 22) su zabeležene samo u grupi životinja koje su primile 1 mg/kg t.m. ibogaina posle 6 h: aktivnost KAT se smanjuje ($p < 0,01$), a GSH-Px povećava u odnosu na kontrole ($p < 0,05$); već posle 24 h aktivnosti su bile u nivou kontrole. Kod životinja koje su tretirane ibogainom došlo je do smanjenja koncentracije TBARS (ANOVA, $p < 0,01$), a statistički značajna razlika je nađena samo za višu dozu posle 24 h ($p < 0,05$) (slika 23).



Slika 22. Aktivnost enzima u ileumu: A - superoksid dismutaza 1 (SOD1), B - superoksid dismutaza 2 (SOD2), C - katalaza (KAT), D - glutation peroksidaza (GSH-Px), E - glutation reduktaza (GR) i F - glutation S transferaza (GST). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$.

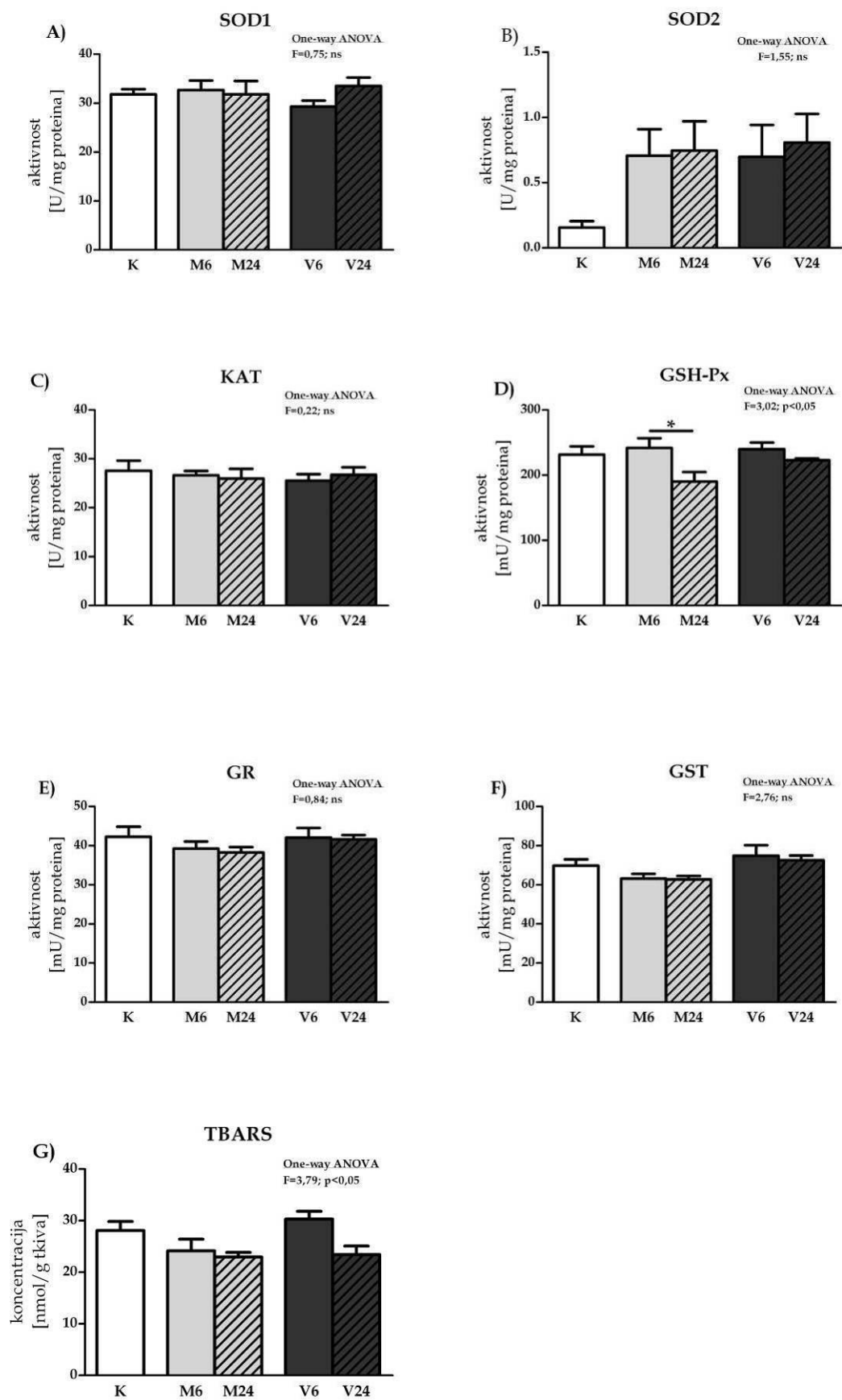


Slika 23. A - Aktivnost enzima ksantin oksidaze (XOD), B - koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS) u ileumu. Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); *- $p < 0,05$.

4.1.3. Ostala tkiva

4.1.3.1. Slezina

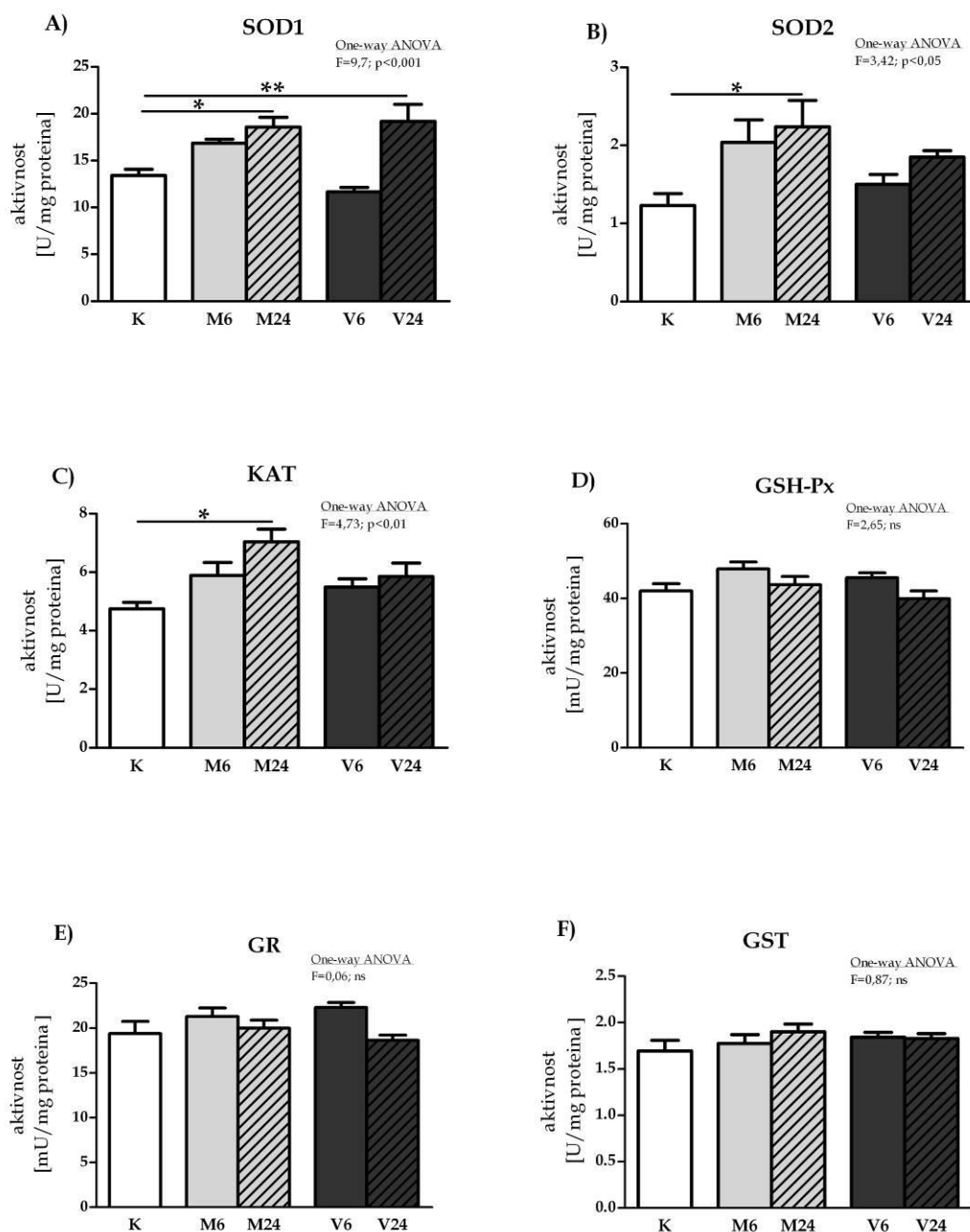
Merenja aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u slezini (slika 24) pokazuju da pod uticajem ibogaina nema statistički značajnih razlika. Ibogain je imao efekat na nivou GSH-Px (slika 24D), ali aktivnosti nisu značajno različite u poređenju sa kontrolom, već se pokazuju između samih tretmana ibogainom u vidu smanjenja aktivnosti tretmana malom dozom posle 24 h u poređenju sa 6 h. Iako se na grafiku uočavaju promene u aktivnosti SOD2 (slika 24B), ni ANOVA ni post hoc test nisu pokazali statistički značajnu razliku. Trendovi promena (ANOVA, $p < 0,05$) se uočavaju i kod količine TBARS (slika 24G), ali bez potvrde značajnosti post hoc Tukey HSD testom između kontrole i tretiranih jedinki.



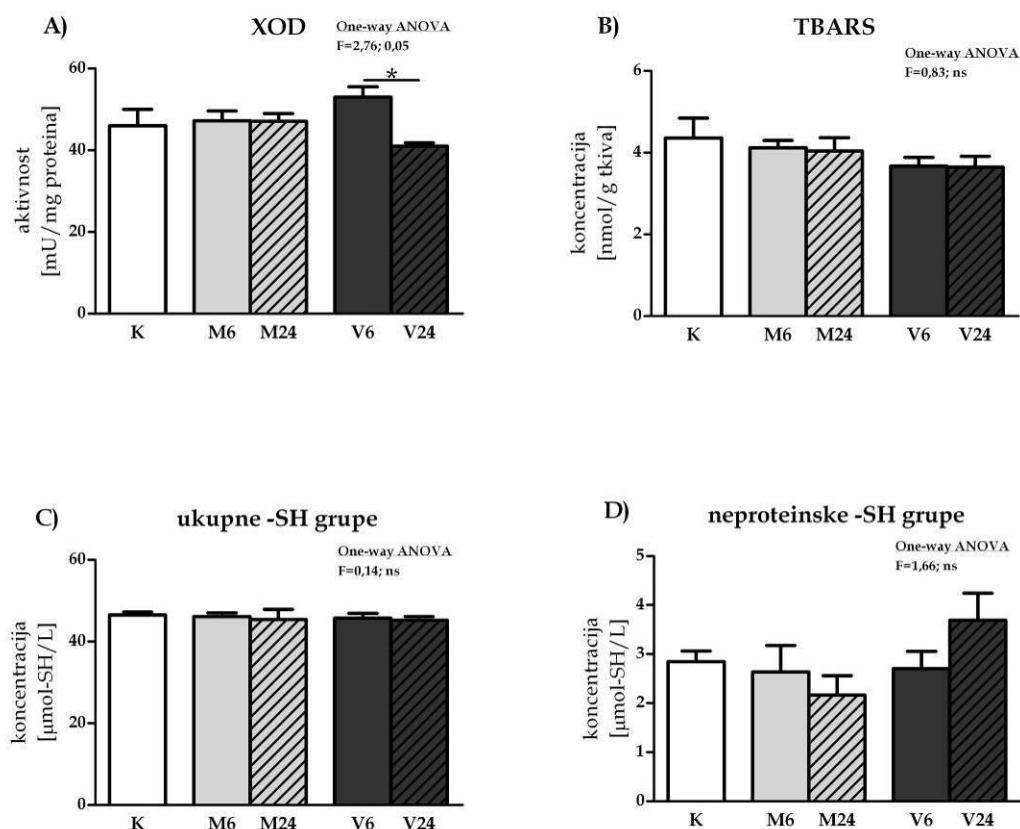
Slika 24. Aktivnost enzima u slezini: A - superoksid dismutaza 1 (SOD1), B - superoksid dismutaza 2 (SOD2), C - katalaza (KAT), D - glutacion peroksidaza (GSH-Px), E - glutacion reduktaza (GR), F - glutacion S transferaza (GST) i G - koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); *- $p < 0,05$.

4.1.3.2. Testisi

Tretman ibogainom u testisima dovodi do povećanja aktivnosti SOD1, SOD2 i KAT (slika 25), ali su efekti specifični po primenjenoj dozi. Tretman sa 1 mg/kg t.m. dovodi do povećanja aktivnosti SOD1, SOD2 i KAT posle 24 h ($p < 0,05$, za sve). S druge strane, tretman ibogainom sa 20 mg/kg t.m. dovodi samo do povećanja SOD1, posle 24 h ($p < 0,01$). Od ostalih merenih parametara, nađena je i statistički značajno smanjenje aktivnosti XOD (slika 26) posle primene 20 mg/kg t.m. ibogaina, nakon 24 h, ali samo u odnosu na primenu 1 mg/kg t.m., bez statističke značajnosti u poređenju sa kontrolom.



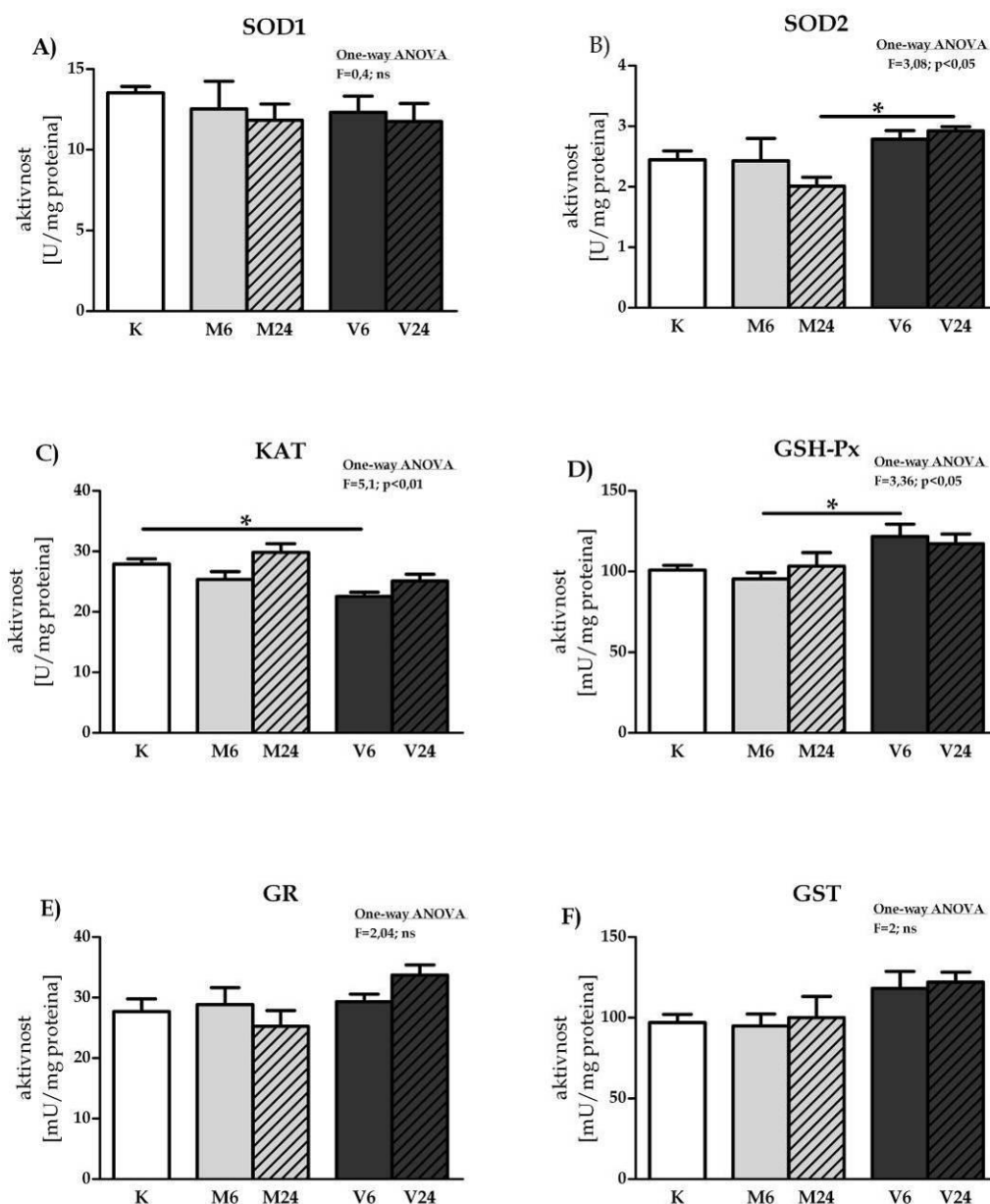
Slika 25. Aktivnost enzima u testisima: A - superoksid dismutaza 1 (SOD1), B - superoksid dismutaza 2 (SOD2), C - katalaza (KAT), D - glutation peroksidaza (GSH-Px), E - glutation reduktaza (GR) i F - glutation S transferaza (GST). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA (p<0,05). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test (p<0,05); **- p<0,01; *- p<0,05.



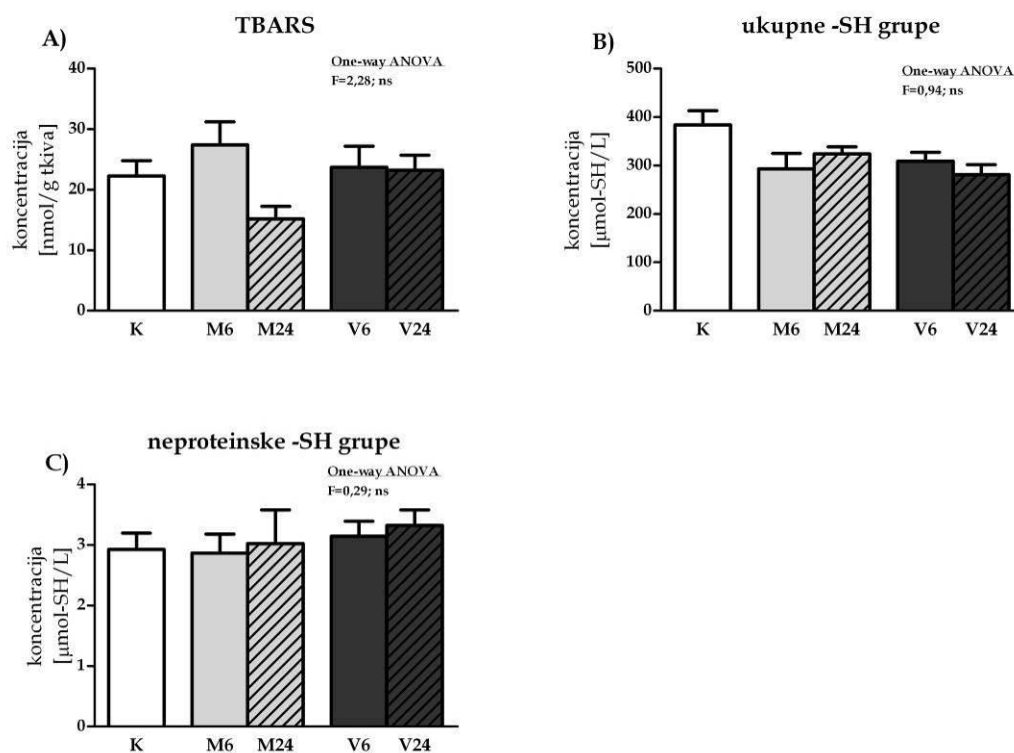
Slika 26. A - Aktivnost enzima ksantin oksidaze (XOD), B - koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS), C - ukupnih i D - neproteinskih -SH grupa u testisima. Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); *- $p < 0,05$.

4.1.3.3. Pluća

Statistički značajna razlika u efektu ibogaina u odnosu na kontrolu je jedino zabeležena u vidu smanjenja aktivnosti KAT (slika 27C) nakon primene doze od 20 mg/kg posle 6 h. Posle 24 h aktivnost je bila u nivou kontrole. Ostale statistički značajne razlike su između grupa tretiranih ibogainom, kao npr. SOD2 (slika 27A) razlika male i veće doze posle 24 h, ali bez razlika u odnosu na kontrolu ili GSH-Px (slika 27D) razlika male i veće doze posle 6 h, ali bez razlika u odnosu na kontrolu.



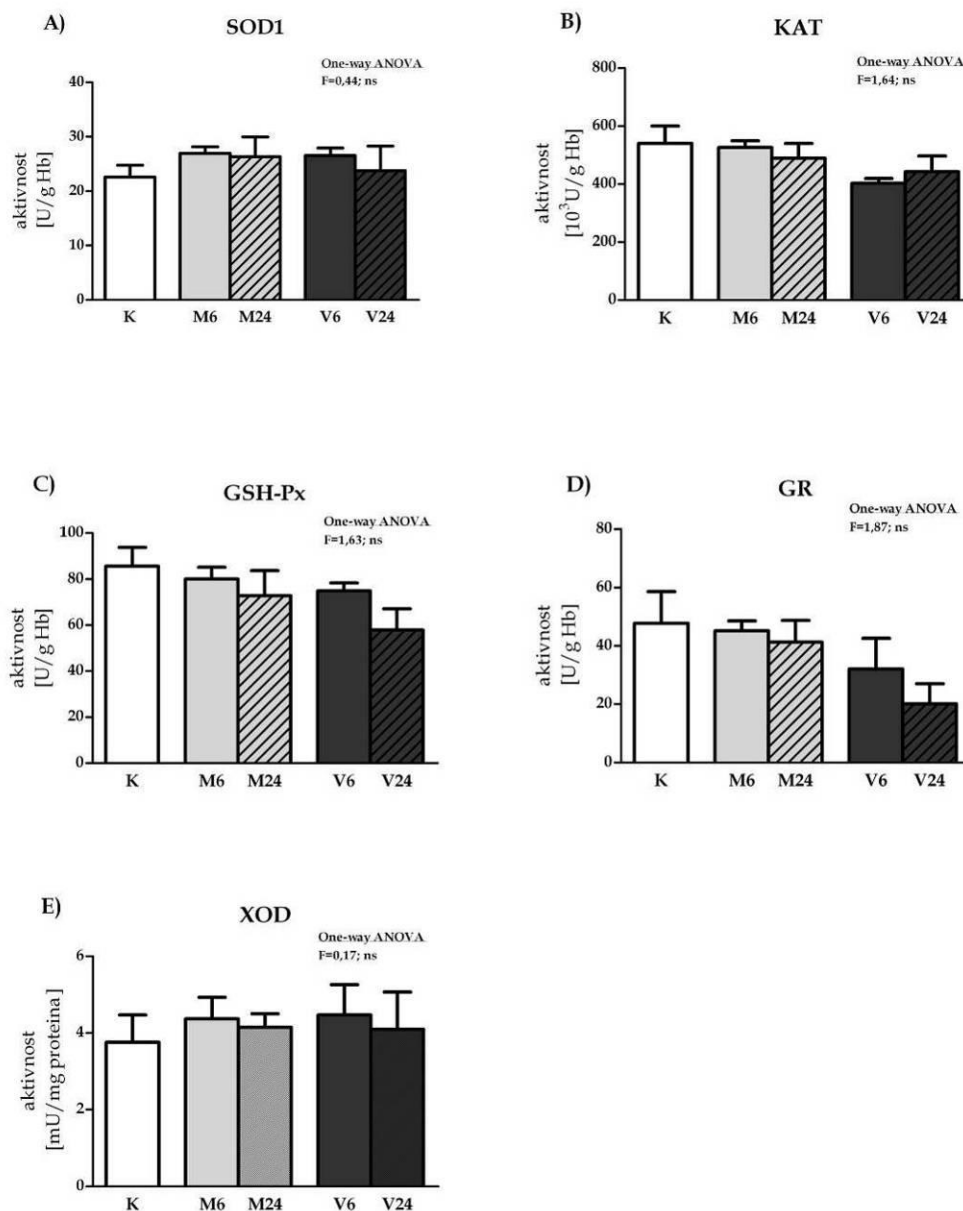
Slika 27. Aktivnost enzima u plućima: A - superoksid dismutaza 1 (SOD1), B - superoksid dismutaza 2 (SOD2), C - katalaza (KAT), D - glutation peroksidaza (GSH-Px), E - glutation reduktaza (GR) i F - glutation S transferaza (GST). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); * - $p < 0,05$.



Slika 28. A - koncentracija tiobarbituratskih reaktivnih vrsta (TBARS), B - ukupnih i C - neproteinskih -SH grupa u plućima. Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p<0,05$), prikazane su F vrednosti.

4.1.3.4. Eritrociti

Nema promena u aktivnosti antioksidativnih enzima i XOD kod tretiranih grupa životinja u odnosu na kontrolne (slika 29).



Slika 29. Aktivnost enzima u eritrocitima: A – superoksid dismutaza 1 (SOD1), B – katalaza (KAT), C – glutation peroksidaza (GSH-Px), D – glutation reduktaza (GR) i E – ksantin oksidaza (XOD). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$), prikazane su F vrednosti.

4.2. Koncentracija ibogaina i noribogaina u plazmi

U grupi M6, izmerena je koncentracija ibogaina u plazmi dve životinje ($0,9 \pm 0,2$ ng/ml), dok je koncentracija noribogaina izmerena kod svih 6 životinja ($6,0 \pm 2,2$ ng/ml). U grupi M24 koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi su bile ispod praga detekcije. U grupi V6 koncentracija ibogaina je izmerena u plazmi pet životinja ($2,2 \pm 1,5$ ng/ml), dok je noribogaina bio prisutan kod svih životinja iz grupe ($70,5 \pm 7,2$ ng/ml). U grupi V24 ibogain je detektovan kod dve životinje ($0,9 \pm 0,2$ ng/ml), dok je koncentracija noribogaina izmerena kod svih životinja iz grupe ($5,7 \pm 3,2$ ng/ml).

4.3. Koncentracija glukoze u krvi, količina konzumirane hrane i vode i parametri urina

Nema razlika u koncentraciji glukoze u krvi, količini konzumirane hrane i vode (tabela 1) i ispitivanim parametrima urina između kontrolne i tretiranih grupa.

Tabela 1. Količina potrošene hrane i vode i koncentracija glukoze u krvi. Nije bilo značajnih promena između grupa.

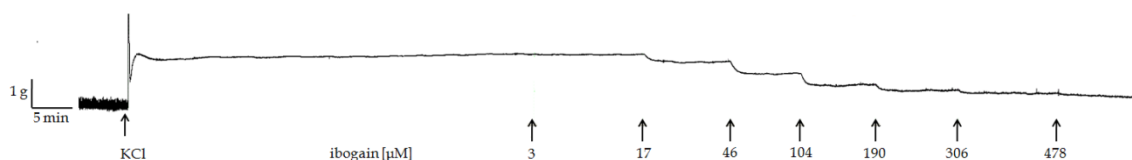
grupa	hrana [g/h/kg t.m.]	voda [ml/h/kgt.m.]	glukoza [mmol/L]
K	$2,83 \pm 0,21$	$4,37 \pm 0,35$	$6,5 \pm 0,3$
M6	$3,15 \pm 0,19$	$4,77 \pm 0,36$	$6,05 \pm 0,31$
M24	$3,07 \pm 0,21$	$4,56 \pm 0,29$	$5,75 \pm 0,27$
V6	$3,13 \pm 0,16$	$4,91 \pm 0,41$	$5,75 \pm 0,27$
V24	$3,01 \pm 0,13$	$4,50 \pm 0,37$	$6,14 \pm 0,54$
One-way ANOVA	ns	ns	ns

4.4. Efekat ibogaina na izolovani ileum

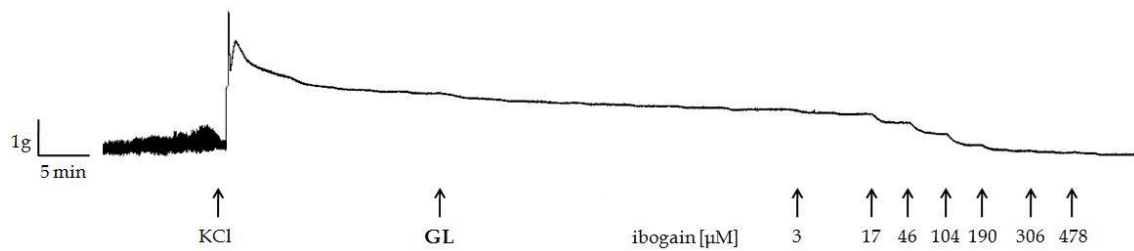
4.4.1. Izolovani ileum, tonične kontrakcije

Rezultati pokazuju da ibogain dozno zavisno inhibira tonične kontrakcije ileuma izazvane 60 mM KCl (slika 30) (ANOVA efekat koncentracije ibogaina, $p < 0,001$). Pretretman ileuma GL (slika 31) smanjuje inhibitorni efekat ibogaina (ANOVA efekat pretretmana, $p < 0,01$, statistički značajno viša EC_{50} za GL/IB u odnosu na ostale tretmane, $p < 0,001$, slika 34). Pretretmani TEA (slika 32) i 4-AP (slika 33) nemaju statistički značajan uticaj na inhibitorni efekat ibogaina. Poređenje nagiba krivih F-testom je pokazalo da one nisu statistički značajno različite (slika 34).

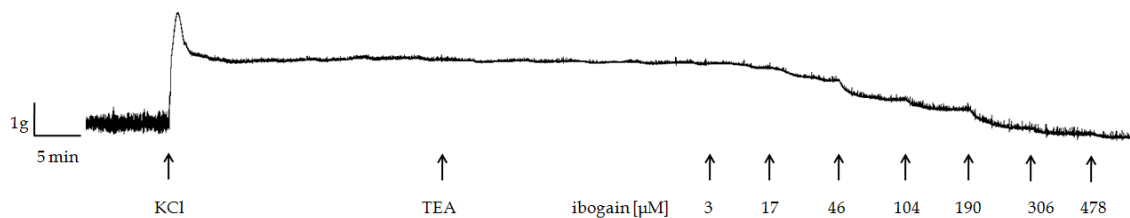
Rezultati analize AUK-a (slika 35) pokazuju da ibogain dozno zavisno inhibira tonične kontrakcije ileuma izazvane 60 mM KCl (ANOVA efekat doze ibogaina, $p < 0,001$). Pretretman ileuma sa glibenklamidom smanjuje inhibitorni efekat ibogaina (ANOVA efekat pretretmana, $p < 0,001$, statistički značajno viša EC_{50} za GL/IB u odnosu na ostale tretmane, $p < 0,001$). Poređenje nagiba krivih F-testom je pokazalo da one nisu statistički značajno različite.



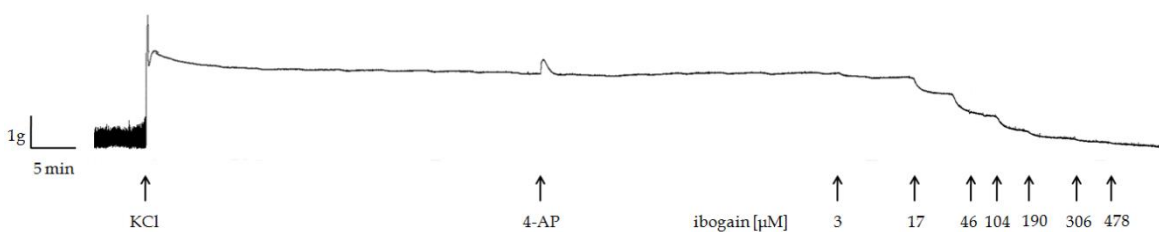
Slika 30. Izolovani terminalni ileum, tonično kontrahovan (KCl 60 mM), tretiran rastućim koncentracijama ibogaina.



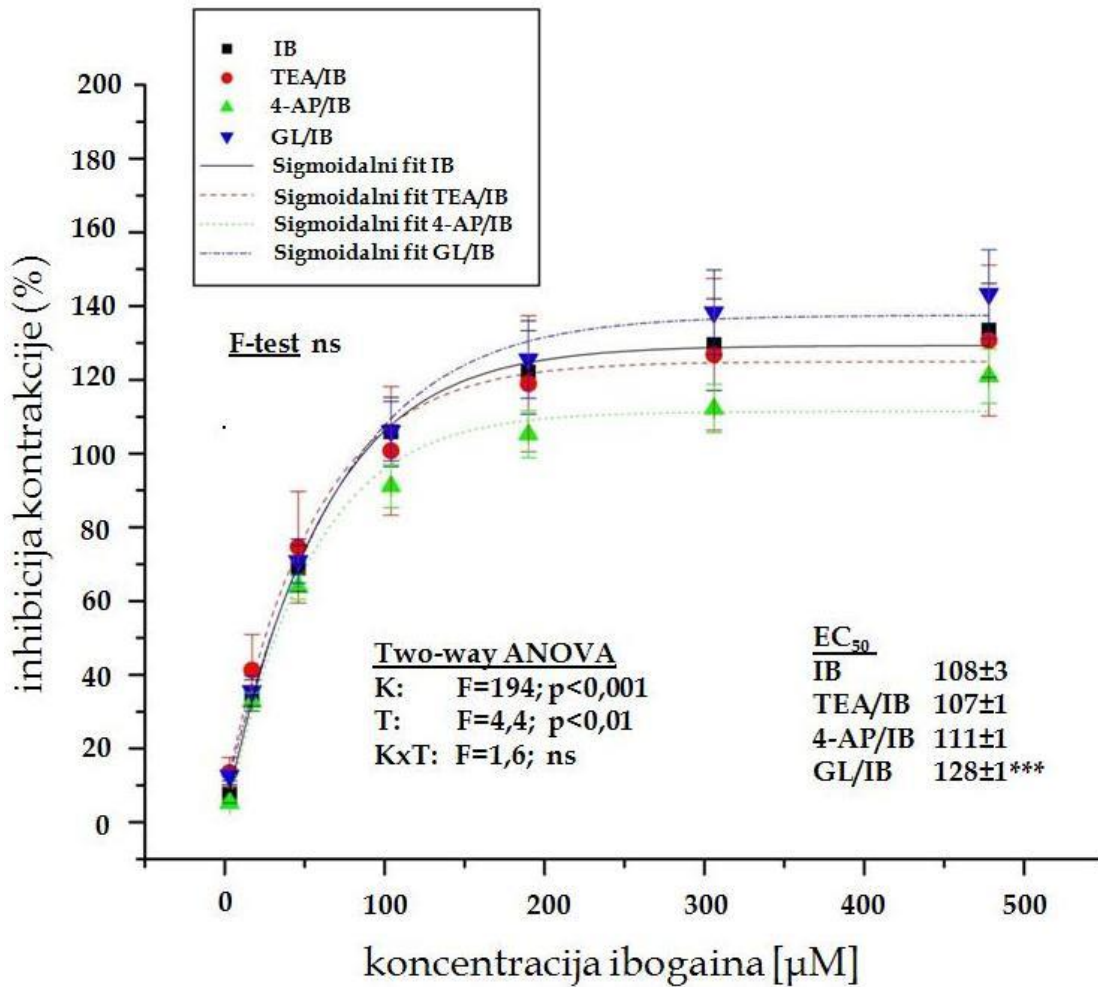
Slika 31. Tonično kontrahovani (KCl 60 mM) izolovani terminalni ileum, pretretiran 4 μM glibenklamidom (GL) i tretiran rastućim koncentracijama ibogaina.



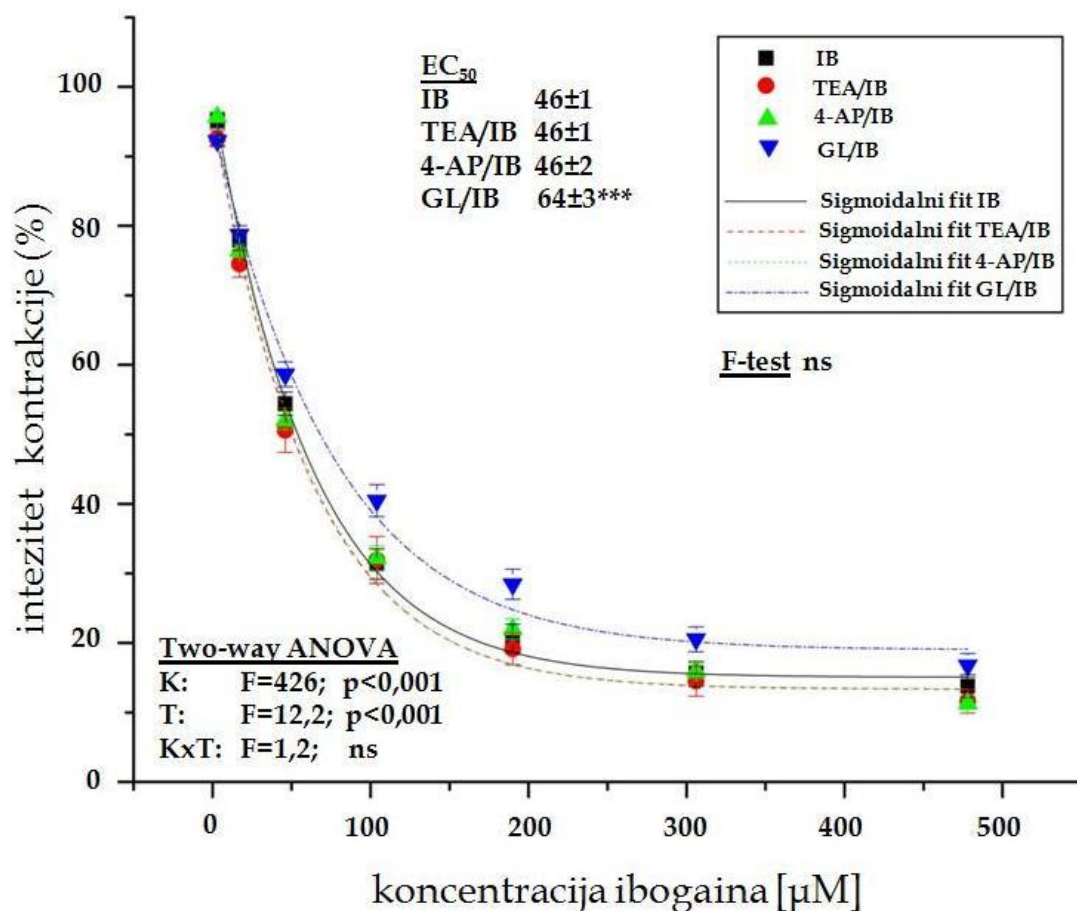
Slika 32. Tonično kontrahovani (KCl 60 mM) izolovani terminalni ileum, pretretiran 0,5 mM tetraetil amonijumom (TEA) i tretiran rastućim koncentracijama ibogaina.



Slika 33. Tonično kontrahovani (KCl 60 mM) izolovani terminalni ileum, pretretiran 5 mM 4-aminopiridinom (4-AP) i tretiran rastućim koncentracijama ibogaina.



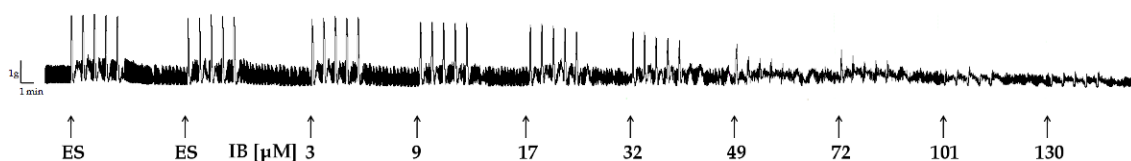
Slika 34. Uticaj ibogaina na tonično kontrahovani ileum. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SEM procenata tonusa u odnosu na maksimalno kontrahovani ileum (60 mM KCl). Statistička značajnost je proveravana dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA). Krive su fitovane na sigmoidalni način korišćenjem Bolcmanovog fita i poređene F-testom. Iz krivih su izračunavane EC_{50} vrednosti i poređene t-testom, ***- p<0,001. K - koncentracija ibogaina, T - pretretman, KxT - interakcija, IB - ibogain, TEA - tetraetil amonijum, 4-AP - 4 aminopiridin, GL - glibenklamid.



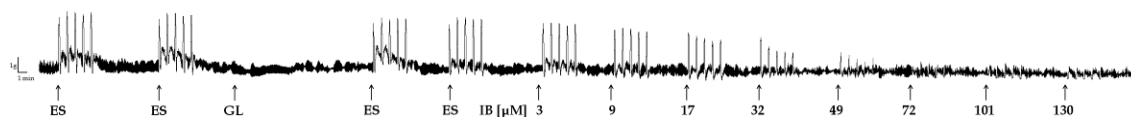
Slika 35. Uticaj ibogaina na tonično kontrahovani ileum. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SEM procenata površine ispod krive (AUK) u odnosu na maksimalno kontrahovani ileum (60 mM KCl). Statistička značajnost je proveravana dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA). Krive su fitovane na sigmoidalni način korišćenjem Bolcmanovog fita i poređene F-testom. Iz krivih su izračunavane EC_{50} vrednosti i poređene t-testom, ***- $p<0,001$. K - koncentracija ibogaina, T - pretretman, KxT - interakcija, IB - ibogain, TEA - tetraetil amonijum, 4-AP - 4 aminopiridin, GL - glibenklamid.

4.4.2. Izolovani ileum, električne stimulacije (ES)

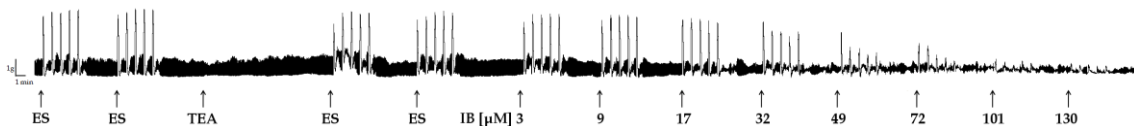
Rezultati analize kontraktilnosti ileuma nakon električne stimulacije (slika 36) pokazuju da ibogain dozno zavisno inhibira kontrakcije (ANOVA efekat koncentracije ibogaina, $p < 0,001$). Pretretman ileuma glibenklamidom povećava inhibični efekat ibogaina u opsegu niskih koncentracija (slika 37) (ANOVA efekat pretretmana, $p < 0,001$; Tukey post hoc test, $p < 0,01$ razlike između doza opsega 2,88-31 μM u odnosu na preostale više koncentracije). Pretretmani TEA (slika 38) i 4-AP (slika 39) nemaju statistički značajan uticaj na inhibični efekat ibogaina. Vrednost EC_{50} za GL/IB u odnosu na ostale tretmane je niža, ali nije statistički značajna. Poređenje nagiba krivih F-testom je pokazalo da one nisu statistički značajno različite (slika 40).



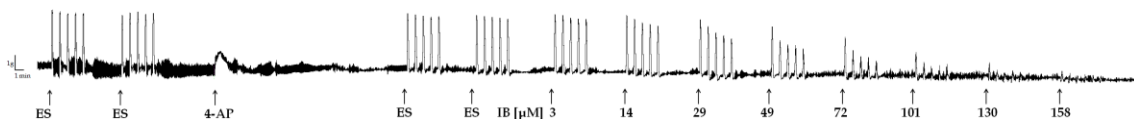
Slika 36. Reprezentativni zapis izolovanog terminalnog ileuma, kontrahovanog električnim stimulusom (PP=62,5 ms, PW=3 ms, TD=60 s, TN=160, U=60 V), tretiran rastućim koncentracijama ibogaina (IB).



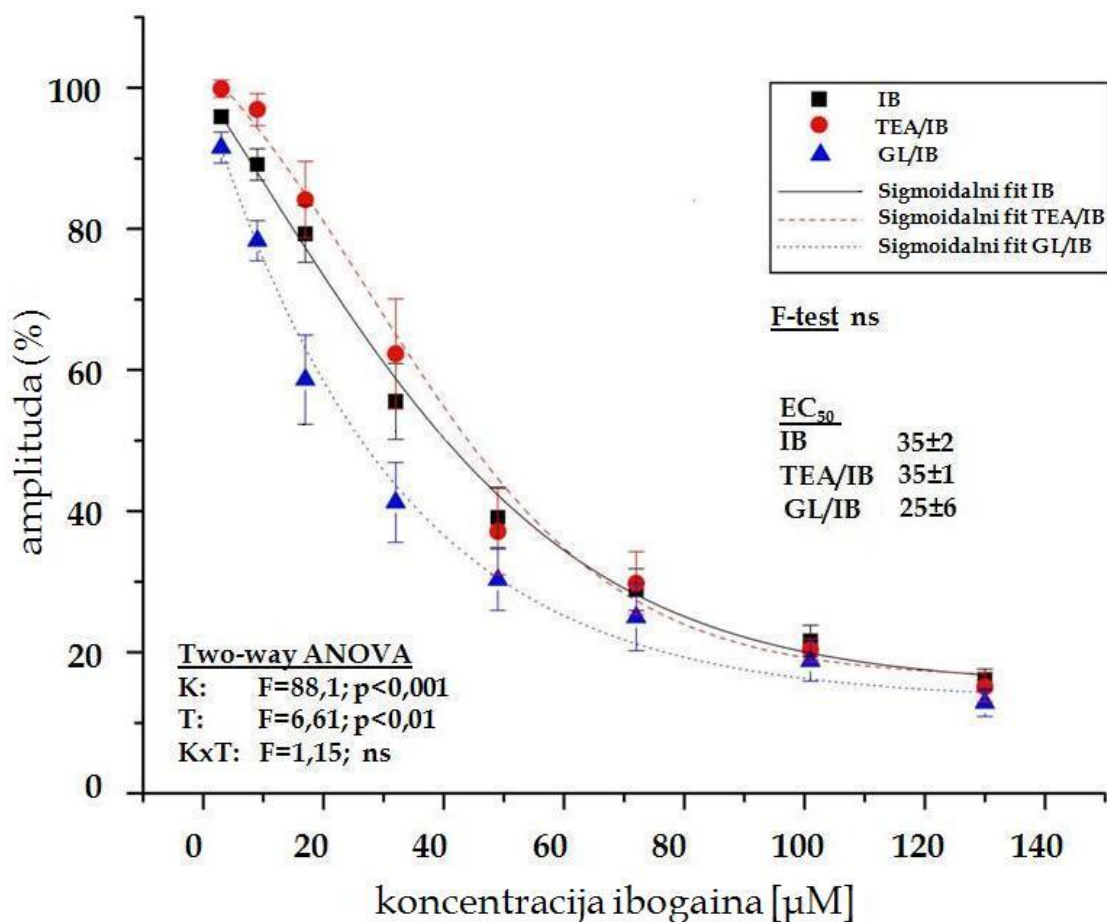
Slika 37. Reprezentativni zapis izolovanog terminalnog ileuma, kontrahovanog električnim stimulusom (PP=62,5 ms, PW=3 ms, TD=60 s, TN=160, U=60 V), pretretiran 4 μM glibenklamidom (GL) i tretiran rastućim koncentracijama ibogaina (IB).



Slika 38. Reprezentativni zapis izolovanog terminalnog ileuma, kontrahovanog električnim stimulusom (PP=62,5 ms, PW=3 ms, TD=60 s, TN=160, U=60 V), pretretiran 0,25 mM tetraetil amonijumom (TEA) i tretiran rastućim koncentracijama ibogaina (IB).



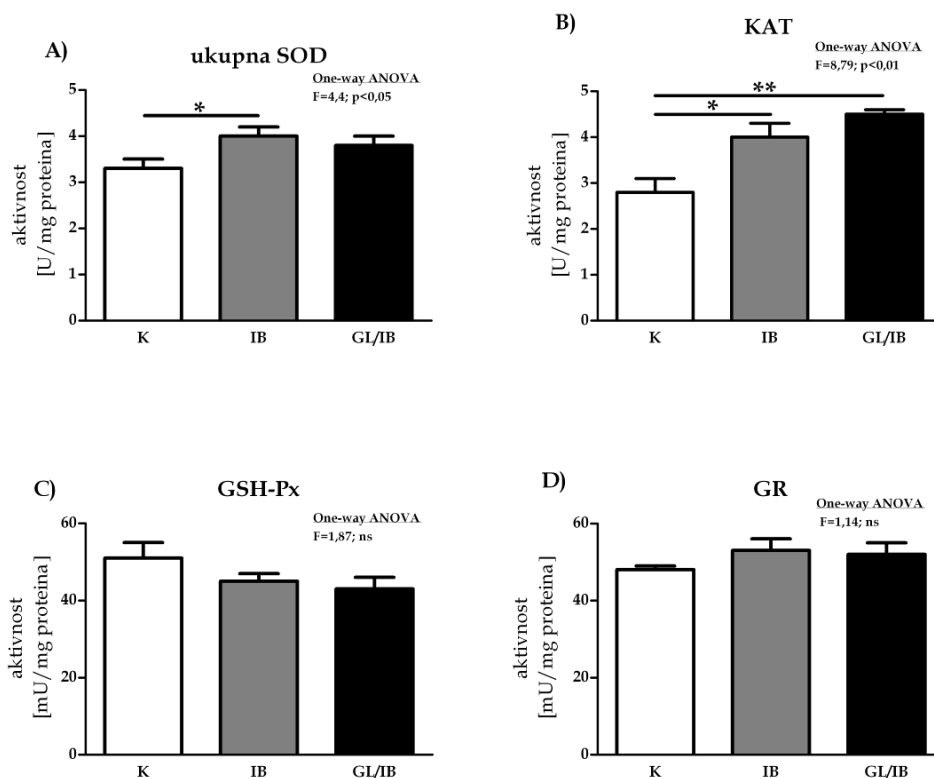
Slika 39. Reprezentativni zapis izolovanog terminalnog ileuma, kontrahovanog električnim stimulusom (PP=62,5 ms, PW=3 ms, TD=60 s, TN=160, U=60 V), pretretiran 5 mM 4-aminopiridinom i tretiran rastućim koncentracijama ibogaina (IB).



Slika 40. Uticaj ibogaina na ileum kontrahovan električnom stimulacijom. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SEM procenata amplitude u odnosu na maksimalno kontrahovani ileum stimulacijom. Statistička značajnost je proveravana dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA). Krive su fitovane na sigmoidalni način korišćenjem Bolcmanovog fita i poređene F-testom. Iz krivih su izračunavane EC_{50} vrednosti i poređene t-testom. K - koncentracija ibogaina, T - pretretman, KxT - interakcija, IB - ibogain, TEA - tetraetil amonijum, 4-AP - 4 aminopiridin, GL - glibenklamid.

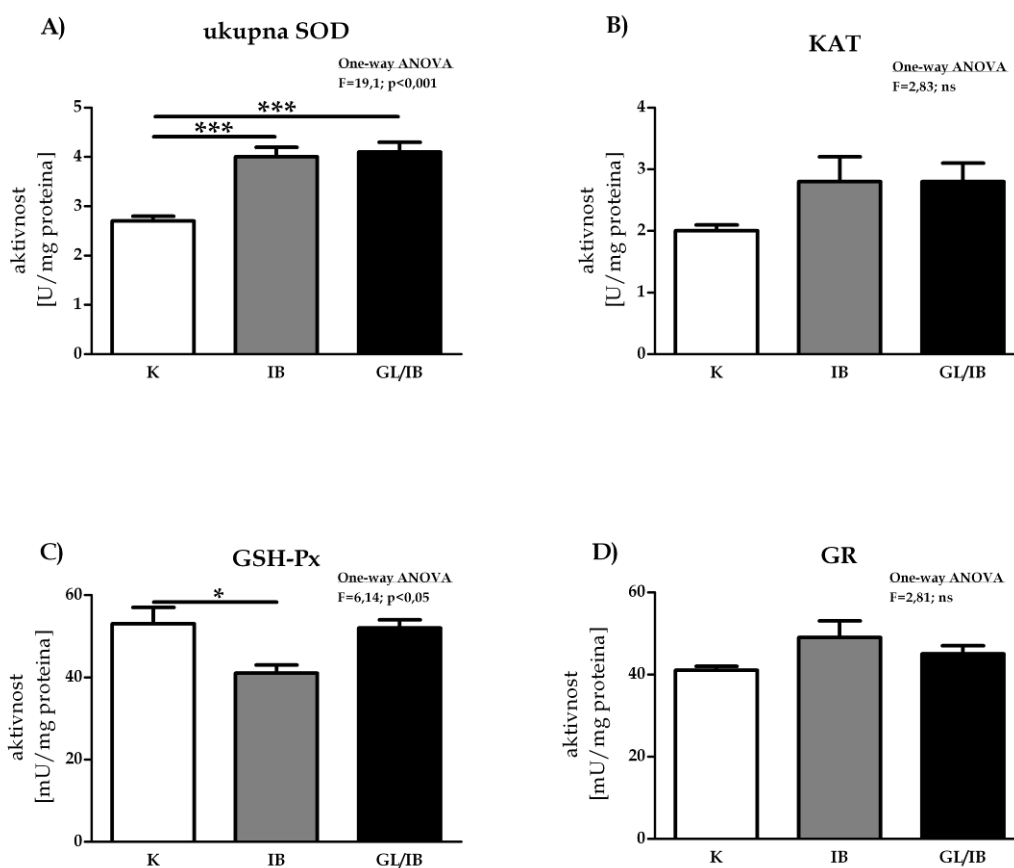
4.4.3. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u izolovanom ileumu

Rezultati merenja antioksidativnih enzima su pokazali da, u ileumima koji su stimulisani KCl i ušli su u toničnu kontrakciju, ibogain povećava aktivnost ukupne SOD (ANOVA, $p < 0,05$, post hoc Tukey HSD test $p < 0,05$), pri čemu je u prisustvu glibenklamida aktivnost SOD nešto niža i nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (slika 41). Ibogain povećava aktivnost KAT i bez i u prisustvu glibenklamida (ANOVA, $p < 0,01$; post hoc Tukey HSD test $p < 0,05$, $p < 0,01$ respektivno). U ileumu nakon tretmana ibogainom nema promena u aktivnosti GSH-Px i GR, bez obzira na prisustvo glibenklamida.



Slika 41. Aktivnost antioksidativnih enzima u izolovanom ileumu (kontrahovan 60 mM KCl): A - ukupna superoksid dismutaza (SOD), B - katalaza (KAT), C - glutation peroksidaza (GSH-Px) i D - glutation reduktaza (GR). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$. K - kontrola, IB - ibogain, GL - glibenklamid.

Kada su ileumi kontrahovani električnom stimulacijom (slika 42), ibogain dovodi do povećanja aktivnosti ukupne SOD, i u prisustvu i bez glibenklamida (ANOVA $p < 0,001$, post hoc Tukey HSD $p < 0,001$). Takođe, zabeležen je pad aktivnosti GSH-Px posle tretmana ibogainom (ANOVA, $p < 0,05$; post hoc Tukey HSD $p < 0,05$). U prisustvu glibenklamida, aktivnost GSH-Px je u nivou kontrola. Nisu zabeležene statistički značajne promene aktivnosti KAT i GR.



Slika 42. Aktivnost antioksidativnih enzima u izolovanom ileumu (kontrahovan ES, PP=62,5 ms, PW=3 ms, TD=60 s, TN=160, U=60 V). A - ukupna superoksid dismutaza (SOD), B - katalaza (KAT), C - glutation peroksidaza (GSH-Px) i D - glutation reduktaza (GR). Za statističku obradu rezultata korišćena je one-way ANOVA ($p < 0,05$). Prikazane su F vrednosti; za post hoc analizu korišćen je Tukey HSD test ($p < 0,05$); ***- $p < 0,001$, *- $p < 0,05$. K - kontrola, IB - ibogain, GL - glibenklamid.

5. DISKUSIJA

Ibogain je postuliran kao pro-antioksidant, na osnovu *in vitro* (Paškulin i sar. 2010) i *ex vivo* (Nikolić-Kokić i sar., 2015) istraživanja, gde su njegovi efekti jasno pokazani. Ipak, ovde prikazani eksperiment *in vivo* sa tretmanom *per os* dozama od 1 ili 20 mg/kg nije pokazao tako ubedljive pro-antioksidativne efekte. Osim toga, odgovor koji je dobijen na nivou antioksidativne odbrane je jasno tkivno specifičan i stoga nema jedinstvenog efekta koji bi mogao dati univerzalan odgovor o efektima ibogaina na antioksidativnu odbranu u ćelijama.

Razlika leži u činjenici da su *in vitro* i *ex vivo* upotrebljene znatno više doze od korišćenih u eksperimentu koji je urađen u ovoj tezi. Doze kojima se rukovalo u ovoj tezi su one sa kojima se manipuliralo *in vivo*, posebno kod ljudi i koje su literaturno opisane i preko alternativne prakse prikazane u priručniku za upotrebu ibogaina protiv zavisnosti (1-25 mg/kg). Nedavno je izračunata i sugerisana inicijalna doza od 0,87 mg/kg t.m. kao optimalna, uzimajući u obzir sve rizike i posledice kojima je kroz studije slučaja upoznata naučna javnost, kao i ograničene studije na animalnim modelima, uglavnom miševima i pacovima, pri čemu su primenjivani različiti načini aplikacije (Schep i sar., 2016). Kliničko ispitivanje odobreno od U.S. Food and Drug Administration je još 1995. preporučilo za tretman pacijenata sa istorijom zavisnosti inicijalne doze od 1-2 mg/kg t.m. (Mash i sar., 1998). Osim toga, Alper i sar. (Alper i sar., 1999) su, na osnovu individualnih doza korišćenih za odvikavanje pacijenata od opioda, izračunali prosečnu dozu od 19,3 mg/kg. U 2016, Global Ibogaine Therapy Alliance (GITA) je objavila klinički vodič za detoksifikaciju pomoću ibogaina i sugerisala da doza ne bi trebalo nikada da bude viša od 24 mg/kg t.m. za interval od 24 časa. Stoga su u ovoj tezi i odabrane *per os* doze koje imaju uporište u dosadašnjoj praksi: 1 i 20 mg/kg t.m.

Rezultati dobijeni u jetri su potvrdili njegov efekat na nivo energetskeg metabolizma u vidu potrošnje glikogena i njegove restitucije, koja je i dozno i

vremenski zavisna. Pri tome, nisu nađene nikakve patološke promene na hepatocitima. Iako je evidentno na osnovu nađenih promena količine glikogena u jetri da je metabolizam glukoze posle tretmana ibogainom promenjen, količina glukoze u krvi nije se značajno razlikovala od fizioloških granica u vremenskim tačkama koje smo izabrali za praćenje (6 i 24 h posle *per os* tretmana). Osim toga, promene aktivnosti antioksidativne odbrane nisu zabeležene ni u eritrocitima, što ukazuje da ne postoji sistemski disbalans u redoks ravnoteži kao rezultat ingestije ibogaina. Analiziranjem količine glikogena u jetri, pokazano je da je efekat ibogaina na količinu glikogena dozno i vremenski zavisan. Kada se za tretman koristila doza od 1 mg/kg t.m., pad količine glikogena je nađen posle 6 h, i na tom nivou je količina glikogena ostala i posle 24 h. S druge strane, pad količine glikogena u jetri nije tako izražen posle 6 h kod životinja koje su primile 20 mg/kg t.m. ibogaina u poređenju sa manjom dozom, ali su histološka istraživanja pokazala najveću glikogenolitičku aktivnost u hepatocitima baš tih jedinki, ali posle 24 h. Ovi rezultati ukazuju da dolazi do promene količine glukoze u kraćem vremenskom periodu od 6 h, neposredno nakon uzimanja ibogaina, ali da se moguće diskretne tkivne promene količine glukoze i glikogena kao posledica potrošnje ATP kompenzuju preuzimanjem glukoze iz sistemske cirkulacije, ali u obimu koji ne narušava fiziološke granice količine glukoze u krvi i koji je kompenzovan oslobađanjem glukoze iz glikogenskih depoa jetre. Ibogain u organizmu dovodi brzo do povećanja kortikosterona, a tek u većim dozama i prolaktina (10 mg/kg i.v.) (Baumann i sar., 2000) i smatra se da su ovi efekti centralno posredovani preko dopaminergičkog sistema jer ibogain smanjuje količinu ekstracelularnog dopamina u hipotalamusu (Baumann i sar., 1998). S druge strane, povećanje prolaktina može biti posledica aktivacije opioidnih receptora, koji sa druge strane inhibiraju oslobađanje dopamina iz neurona mediobazalnog hipotalamusa i otklanjaju inhibiciju toničnog oslobađanja prolaktina koji je inhibitor sekrecije prolaktina u talamusu (Ben-Jonathan, 1985). Svi ovi efekti ibogaina su kratkotrajni i već posle 2 h nivoi kortikosterona i prolaktina su u

nivou kontrola. Metabolički efekti ovih promena nisu potpuno jasni, ali ukazuju na više nivoa delovanja ibogaina i posebno raznovrsnost dejstva koje ima za posledicu promenu regulacije glukoze i opšteg metaboličkog miljea. Kako je u eksperimentu prikazanom u ovoj tezi količina glukoze u krvi posle 6 i 24 h bila u nivou kontrola, može se smatrati da su promene pod dejstvom ibogaina koje utiču na količinu glukoze u krvi ili brzog dejstva i kratkotrajna po samom unošenju ili je uzeta doza ibogaina nedovoljna da izazove sistemsku promenu u količini glukoze, koja bi se manifestovala i posle 6 h. S obzirom da nivo glikogena u jetri posle 24 h od uzimanja ibogaina ne dostiže nivo koji je zabeležen kod kontrola, jasno je da glikogenolitički proces ili i dalje traje ili da brzina sinteze glikogena nije dovoljna da bi kompenzovala nastali pad. U mozgu pacova je pokazano da se resinteza energenata odvija i 72 h posle uzimanja ibogaina, što ide u prilog činjenici da su efekti ibogaina dugotrajniji nego što je izmeren *ex vivo* na modelu kvasca (5 h), ali je u relativnoj vremenskoj saglasnosti sa efektima *in vivo* koji su nađeni na nivou mozga. Naime, eksperimenti na kvascu (Paškulin i sar., 2010) su jasno pokazali da ibogain direktno oslobađa ATP, aktivira njegovu restituciju i glikolizu, pri čemu se povećava nivo metabolizma i stvaranja ROS. Model sistem kvasca je u tom radu odabran jer nema sistem citohrom oksigenaza karakterističnih za degradaciju ibogaina kod ljudi te stoga nema metaboličke transformacije ibogaina u noribogain (Walker, 1998; Maciulaitis i sar., 2008). Tako je napravljena distinkcija između efekata ibogaina i njegovog primarnog metabolita noribogaina.

U organizmima, ibogain se vrlo brzo metaboliše u noribogain i dosta se špekuliše da su zbirni efekti ibogaina u stvari prilična posledica njegove metaboličke transformacije u noribogain, koji opet ima drugačiji afinitet za receptore, te stoga i drugačije efekte kako po intenzitetu tako i po vremenu dejstva (Baumann i sar., 2001; Pearl i sar., 1995; Glick i sar., 1996). I u ovom radu je pokazano da se ibogain vrlo brzo metaboliše u noribogain i da ga je posle 24 h nemoguće detektovati iznad praga osetljivosti metode, ako je doza *per os* 1

mg/kg t.m. Saglasno dosad pokazanoj i izračunatoj farmakokinetici ibogaina, on je prisutan kod jedinki koje su primile 20 mg/kg t.m. ibogaina, kod pojedinih čak i posle 24 h, s tim da je izmereno jasno prisustvo i ibogaina i noribogaina (koga je sa vremenom više u odnosu na ibogain). Raspoloživost ibogaina je svega 7 i 43% kod mužjaka pacova za *per os* doze od 5 mg/kg i 50 mg/kg; dozna zavisnost raspoloživosti, pretpostavlja se, je zbog toga što apsorpcija i/ili eliminacija prvim prolaskom nije linearna (Jeffcoat i sar., 1994), a i pokazalo se da je apsorpcija oralnog rastvora ibogaina prilično varijabilna i nekompletna za više ispitivanih vrsta (Alper, 2001). Kubiliene i sar. (Kubiliene i sar., 2017) su odredili farmakokinetičke parametre ibogaina i noribogaina u tkivima miševa nakon intragastralne primene jedinične doze ibogaina od 26,3 mg/kg. Pokazano je da ibogain, osim jetre, značajno metabolišu i mozak i bubrezi, a da se značajno duže u odnosu na druga tkiva zadržava u srcu. U plazmi, ibogain i noribogain dostižu maksimum već posle 30 min, da bi 6 h kasnije bili u opsegu koncentracije koje dosežu do maksimalnih 100 ng/ml. Nakon 24 h ibogain nije bilo moguće detektovati u plazmi, a koncentracija noribogaina je bila $2,5 \pm 0,01$ ng/ml (u našem eksperimentu, ibogain je detektovan kod dve od šest životinja ali svega $0,9 \pm 0,2$ ng/ml, a noribogain u svih šest sa prosečnom koncentracijom $5,7 \pm 3,2$ ng/ml). Ovi rezultati su u saglasnosti sa našim, s tim da razlike u apsolutnim nivoima su jasno species specifične. Takođe, u odnosu na ostale puteve aplikacije, intragastralnim putem se mnogo manje ibogaina metaboliše u noribogain (Kubiliene i sar., 2017). I ibogain i noribogain su brzo detektovani i u tkivima posle intragastralne aplikacije. Posle 4 h ibogain je nađen u najvećoj koncentraciji u slezini, potom jetri, srcu, i bubrezima, najmanje u mozgu i mišićima. Noribogaina je najviše nađeno u slezini, jetri i bubrezima, ali je daleko manje prisutan u srcu. Najveće totalno sistemsko izlaganje ibogainu je nađeno za slezinu, dok su višestruko manje vrednosti nađene za srce i bubrege, a i jetru (10x manje u odnosu na slezinu). Sistemsko izlaganje noribogainu posle intragastralne aplikacije ibogaina pokazano je u slezini, ali i jetri i bubrezima, dok je izloženost

noribogainu najmanja za srce. Poslednje je od posebnog značaja, jer ukazuje da se ibogain sporo eliminiše iz srca. Takođe, ovi rezultati pokazuju da se ibogain metaboliše i u bubrezima u nekom stepenu. Slični rezultati su dobijeni i merenjem koncentracije ibogaina i noribogaina u tkivima nakon direktne aplikacije u stomak miševa (Kubiliene i sar., 2012) i post mortem na pojedincu koji se intoksicirao ibogainom (Kontrimaviciute i sar., 2006). Post mortem studija je pokazala da se ibogain i noribogain zadržavaju u znatnoj meri i u plućima.

Kako posle 24 h u našem eksperimentu nije zabeleženo prisustvo ni ibogaina ni noribogaina kod jedinki koje su primile dozu od 1 mg/kg t.m., a količina glikogena u jetri je i dalje niža od kontrola, jasno je da efekti ibogaina ili traju *in vivo* znatno duže od nekoliko časova ili kapacitet jetre za resintezu glikogena nije dovoljan da bi se izvršila potpuna kompenzacija. Takođe, ovo pokazuje i da su efekti ibogaina dugotrajniji, da uključuju i druge nivoe potrošnje i resinteze ATP, glukoze i glikogena. To se može potvrditi i sagledavanjem vremenskog aspekta delovanja ibogaina u kome su njegovi efekti na nivo glikogena u jetri za period 6 h za obe doze slični, dok se za višu dozu posle 24 h uočava dalji pad koncentracije glikogena, što označava veću potrošnju nego sintezu. Takođe, u tom periodu je prisutan i efekat noribogaina, koji po metaboličkoj transformaciji ibogaina i svom nastanku nezavisno ispoljava svoje efekte. Pokazano je da noribogain ima čak i veći afinitet za sve tipove opioidnih receptore nego ibogain (Pearl i sar., 1995), te je sam vremenski aspekt *in vivo* efekata ibogaina u velikoj meri zavisen od metaboličke transformacije ibogaina u noribogain. Pokazano je i da noribogain ostaje u plazmi duže vreme u odnosu na ibogain (Mash i sar., 1995), što je i našim rezultatima potvrđeno. Takođe, veća polarnost noribogaina u odnosu na ibogain produžava njegovo prisustvo u CNS-u posle konverzije (Glick i Maisonneuve, 1998). Osim toga, noribogain se i sporije eliminiše iz organizma (eliminacija je gastrointestinalnim traktom i renalno) (Mash i sar., 1998).

Stepen metaboličke transformacije ibogaina u jetri je proveren merenjem aktivnosti GST koja se nakon tretmana ibogainom nije promenila. To ukazuje da sistem GST zavisne metaboličke transformacije ksenobiotika nije pojačan. Moguće je da je došlo do indukcije pojedinih izoformi GST, karakterističnih za metabolizam ibogaina, ali takvo povećanje nije zabeleženo na opštem nivou aktivnosti GST.

Takođe, moguće je da ibogain, kao lipofilan molekul, koji se nagomilava u masnom tkivu, vremenom diskretno biva otpuštan u sistemsku cirkulaciju, metabolisan u noribogain i da njegovo produženo vreme efektivnosti potiče upravo od prisustva u masnim depoima (Glick i sar., 1996). Ovo bi bilo značajnije za više doze, što bi se i u našem eksperimentu moglo zaključiti praćenjem promena glikogena u jetri. Ibogain je mnogo rastvorljiviji u mastima nego noribogain i brže ulazi u tkiva sa višim nivoima masti, što je i pokazano za mozak (Zetler i sar., 1972) i druga tkiva (Hough i sar., 1996). Preuzimanje ibogaina u tkivima sa visokim stepenom masti je proporcionalno veće za višu dozu, te je on i znatno više raspoloživ kasnije, što je generalno karakteristično za lipofilne molekule.

Iako je radovima *in vitro* generalno postuliran mehanizam brze aktivacije antioksidativnih enzima, prvenstveno SOD1, posle delovanja ibogaina (Paškulin i sar., 2010; Nikolić-Kokić i sar., 2015), rezultati prikazani ovde ne pokazuju tako brz i znatan efekat na sistem antioksidativne zaštite. Promene u eritrocitima nisu nađene ni posle 6 ni posle 24 h, ni za jednu dozu od upotrebljenih. Ibogain *in vitro* oslobađa ATP iz eritrocita, posle 1 h od inkubacije, što je praćeno povećanjem aktivnosti SOD1 i za više doze, GR, ukazujući na brz odgovor antioksidativnih enzima i prisustvo posttranslacionih mehanizama regulacije aktivnosti (Nikolić-Kokić i sar., 2015). Kako se aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima nakon tretmana *in vivo* ni posle 6 ni posle 24 h nije promenila, moguće je da je upotrebljena doza ibogaina nedovoljna da izazove sistemski efekat koji bi se odrazio na promenu aktivnosti, da oksidativni pritisak nakon tretmana nije bio dovoljno jak da

izazove *in vivo* promene aktivnosti ili se povećanje ROS dogodilo za manje od 6 h, uporedo sa promenama u metabolizmu. Eksperimenti *in vitro* su rađeni sa višestruko višim dozama ibogaina nego upotrebljenim *in vivo* u ovom eksperimentu i verovatnije je da oksidativni pritisak *in vivo* nije bio dovoljno jak da bi se antioksidativni sistem aktivirao. Vremenska odrednica od 6 h je izabrana upravo zbog eksperimenata *in vitro* kada su promene na antioksidativnim enzimima zabeležene.

U jetri nema značajnih promena na nivou aktivnosti antioksidativnih enzima, ali povećana aktivnost XOD (na granici statističke značajnosti, $p < 0,05$) i TBARS ukazuje na prisustvo povećanog metabolizma adenozina i prisustvo umerenog oksidativnog stresa na nivou lipidnih peroksida. Oksidativni pritisak izazavan ibogainom u primenjenim dozama očito nije dovoljan da izazove antioksidativni odgovor u periodu od 24 h. Međutim, promene u nivou antioksidativne odbrane u drugim tkivima pokazuju da je oksidativni stres jasno prisutan, da ima tkivno specifičan karakter i da je dozno zavisano, ali ne u domenu odnosa viša doza – viša antioksidativna aktivnost, već da svaka doza za sebe izazva drugačije efekte.

U bubrezima, takođe veoma metabolički i energetski zahtevnom tkivu, ibogain je izazvao promene u domenu redoks ravnoteže i aktivnosti antioksidativnih enzima. Bubrezi su skloni nastanku oksidativnog stresa i akutna oštećenja bubrega imaju uzroke i u funkciji mitohondrija i nastanku ROS-a (Ralto i Parikh, 2016). Poremećaji u redoks ravnoteži doprinose nastanku morfoloških promena proksimalnih bubrežnih tubula kod pacova tretiranih antipsihoticima (Nikolić-Kokić i sar., 2016). Posle ingestije, pokazano je da se ibogain brzo konvertuje u noribogain i ekskretuje preko bubrega i gastrointestinalnog sistema (Alper, 2001; Papadodima i sar., 2013). Takođe, u bubrezima miševa prisustvo ibogaina je potvrđeno posle 4 h od *per os* primene i njegova relativno brza konverzija u noribogain (Kubiliene i sar., 2012). Proučavanja farmakokinetičkih osobina ibogaina i noribogaina u tkivima miševa koji su primili 26,3 mg/kg t.m. intragastralno su pokazala da su bubrezi

sistemske izloženosti ibogainu koji je brzo metabolisan u noribogain (Kubiliene i sar., 2012, 2017). Slični rezultati su dobijeni i na post mortem ispitivanjima ljudi (Kontrimaviciute i sar., 2006). Iako su svi ovi radovi pokazali da bubrezi učestvuju u metaboličkoj transformaciji ibogaina i produkciji noribogaina posredstvom mikrozomalnih enzima, promene u aktivnosti GST u našem eksperimentu nisu zabeležene, što ukazuje na regularan, nepromenjen metabolizam ksenobiotika u bubrezima, te da ibogain nije značajno promenio njihovu opštu detoksifikacionu aktivnost. Takođe, ovo ukazuje da ibogain nije izazvao ekstremne uslove u ovom ćelijskom sistemu koji bi doveli do nastanka oksidativnog stresa ovim putem.

Međutim, promene aktivnosti SOD1 i GR ukazuju na postojanje oksidativno narušene redoks ravnoteže u bubrezima. Aktivnost SOD1 je povećana u odnosu na kontrolu posle 6 h za manju aplikovanu dozu (1 mg/kg t.m.) i ostaje povećana i posle 24 h, što ukazuje na visok oksidativni pritisak kao posledica povećanja količine superoksida. Paralelno, smanjena je aktivnost GR, što ukazuje na kompenzativno smanjenje antioksidativnog glutation zavisnog puta, jer je osnovna odbrana obezbeđena osom SOD-KAT (zabeleženo je blago ($p < 0,05$) povećanje aktivnosti KAT posle 6 h od primene doze od 1 mg/kg t.m., ali u odnosu na veću dozu u istom periodu). Smanjenje aktivnosti GR može biti i posledica pada količine ili dostupnosti NADPH, usled aktivnosti ibogaina vezanih za pražnjenje rezervi ATP i iscrpljivanje ćelijske količine energenata. Kod primene više doze (20 mg/kg t.m.) pokazano je takođe statistički značajno smanjenje aktivnosti GR, te se čini da je smanjenje aktivnosti GR (zajedničko za obe doze) ili usled nedostatka NADPH kao posledice primene ibogaina i smanjenja ćelijskih energenata ili se ove promene mogu smatrati kompenzatornim: smanjuje se potrošnja NADPH, dok se ne restituiše ćelijska homeostaza glukoze i uspostavi stabilna dinamička homeostatska količina energetskih molekula. U slučaju bubrega nije zabeležena promena količine ukupnih i neproteinskih -SH grupa nakon tretmana ibogainom, što ukazuje na očuvanu tiol zavisnu redoks homeostazu.

Iako nema promena u nivou TBARS niti promena u nivou -SH grupa, zabeležene su određene morfološke promene lumena tubula u domenu blagih i umerenih, koje su vidljivije nakon 24 h. Povećan je volumen epitelnih ćelija, sa acidofilnim granulama u citoplazmi koje odražavaju uvećanje mitohondrija, što ukazuje na povećanu mitohondrijalnu aktivnost. To je u saglasnosti sa pretpostavljenim povećanjem produkcije ROS i nađenim povećanjem aktivnosti SOD1. Na osnovu analize histoloških promena može se smatrati da uprkos kompenzatornom povećanju aktivnosti SOD1 (na nivou bubrega u celosti, ne pojedinačnih tipova ćelija) dolazi do nastanka poremećaja koje mogu biti prooksidativnog porekla i karakteristične samo za epitelne ćelije. Ćelije proksimalnih tubula zahtevaju intenzivnu potrošnju ATP radi reapsorpcije putem aktivnog transporta. ATP je važan za aktivnost ATPaze na ćelijskoj površini što sprečava bubrenje ćelija usled pasivnog ulaska jona natrijuma i vode. Ako ibogain prazni rezerve ATP (ili ga zasad nedefinisanim mehanizmom „troši“), očekivano je narušavanje regularne jonske homeostaze i aktivacija mitohondrija u cilju ponovnog uspostavljanja energetske stabilnosti dodatnom produkcijom ATP. Morfologija mitohondrija zavisi od ćelijskih energetskih zahteva i različito energetsko stanje i stanje mitohondrija su jasno povezane sa nastankom akutnih povrede i oštećenja bubrega (Ralto i Parikh, 2016). Međutim, ispitivani parametri urina u našem eksperimentu su pokazali da između kontrolnih i tretiranih pacova nema razlika. Koncentracija bilirubina i urobilinogena, kao i specifična gustina urina su slične, što ukazuje da nema oštećenja jetre i bubrega. U urinu nisu detektovani leukociti, eritrociti niti proteini, što pokazuje da nema ni oštećenja bubrega (tubulopatija ili glomerulopatija), a ni urinarnog trakta. Takođe, nema ni prisustva glukoze u urinu, što je očekivano s obzirom da je koncentracija glukoze i u krvi u regularnim okvirima, mada je ovo i dodatna potvrda da nema oštećenja bubrega. Odsustvo infekcije je potvrđeno odsustvom nitrita (i leukocita) u urinu. Nepromenjena koncentracija askorbinske kiseline u urinu, pH i odsustvo ketonskih tela posle tretmana ibogainom pokazuju i da je nutritivni status

eksperimentalnih životinja regularan. Nema indikatora povećane potrošnje masti umesto glukoze, ingestije askorbinske kiseline, znaka pothranjenosti ili metaboličkih promena usled dijareje ili tubularne acidoze.

U srcu je posle primene ibogaina u dozi od 1 mg/kg t.m. *per os* nakon 6 h jasna naznaka prisustva oksidativnog stresa (povećanje TBARS) i narušene redoks ravnoteže u pravcu povećanja oksidativnog statusa (smanjenje količine ukupnih -SH grupa). Kako se količina neproteinskih slobodnih -SH grupa nije smanjila (u koje spada i glutation), očito se povećala količina oksidovanih -SH grupa unutar svih klasa proteina, što za posledicu ima pomeranje opšte redoks ravnoteže ka oksidativnom te samim tim bliže i nekrozi, ali i promenu u konformaciji (formiranje -S-S- mostova ili modifikovanja tiolnih grupa) mnogih protein zavisnih regulatora, uključujući šaperone i različite klase proteaza, koje obezbeđuju kontrolu strukture proteina i održavanje mitohondrijalne proteostaze, ali i glutaredoksina, peroksiredoksina i tioredoksina koji održavaju redoks ravnotežu. Poznato je da se u uslovima povišene koncentracije H₂O₂ -SH grupe peroksiredoksina intenzivno oksidišu, molekuli peroksiredoksina se dimerizuju, a potom i formiraju dekamere i postaju ćelijski šaperoni, što smanjuje proteinske -SH grupe (Groitel i Jacob, 2014). Tiol bazirani ćelijski oksidači regulacije su karakteristični i za IP₃ receptore koji regulišu fluks Ca²⁺ (Ivanova i sar., 2014). Ovi receptori su regulisani sa IP₃, Ca²⁺, Ca²⁺-vezujućim proteinima, ATP, superoksidom i tiol modifikacijama. Svi ovi rezultati ukazuju na neke od mogućih mehanizama kojima ibogain utiče na promene redoks homeostaze u srcu koji vode ka poremećaju srčanog rada i njegovog mogućeg oštećenja. Osim toga, srčana slabost može biti direktna posledica narušavanja energetske homeostaze koja je uzrokovana ibogainom, mnogo više nego u drugim tkivima. Ibogain se nagomilava u srcu i sporo metaboliše, te je njegov uticaj na srce u stvari efekat produženog dejstva u odnosu na druge organe. Posledice narušavanja energetske ravnoteže su mnogobrojne, ali u srcu je posebno važno posredno narušavanje ravnoteže Ca²⁺ koji aktivira dehidrogenaze Krebsovog ciklusa uključenih u oksidativnu fosforilaciju,

održavanje pula redukovanog NADH, uspostavljanje energetske homeostaze i održavanje normalnog srčanog rada (Glancy i sar., 2013).

Rezultati povećanja TBARS posle doze od 1 mg/kg t.m. ukazuju na povećanje prisustva lipidnih peroksida. Nagomilavanje produkata razgradnje lipidnih peroksida (aldehida kao što je 4-hidroksi-trans-2-nonenal - HNE) i akroleina u srcu je povezano sa nastajanjem patološke hipertrofije srca, za koju se smatra da se razvija preko intenzivne autofagije koju proteinski HNE kompleksi aktiviraju posredstvom p62 (Baba i sar., 2018). Među brojnim proteinima u srcu koji se inaktiviraju pod dejstvom HNE su i mitohondrijalna NADP⁺-izocitrat dehidrogenaza (Baba i sar., 2018; Benderdour i sar., 2003), glukozom regulisani protein (GRP78) i elongacioni faktor 1- α 2 (elf2- α), koji su zaduženi da održavaju pravilno formiranje proteina (Xu i sar., 2005) i svi su povezani sa patološkom hipertrofijom srca. Posebno važno je da se pod uticajem HNE menja i aktivnost ATP sintaze što može dovesti do pražnjenja ATP-a i kontraktilne disfunkcije. Ipak, svi nabrojani efekti su za primenjenu dozu ibogaina od 1 mg/kg t.m. prolazni, jer posle 24 h su uspostavljeni nivoi kao kod kontrola. Da u srcu ibogain izaziva jak oksidativni pritisak čini se da je potvrđeno i dozom od 20 mg/kg t.m.: smanjenje aktivnosti posle 6 h ukazuje na inhibiciju SOD2 peroksidom (Zemanovic i sar., 2018), što omogućava višku superoksida da narušava signalni put posebno azot oksida, praćen stvaranjem peroksinitrita i propagacijom oksidativnih oštećenja, što su već poznati fenomeni i u regulaciji i u patologiji srca kao rezultat oksidativnog stresa, posebno posle akutnog infarkta miokarda (Liu i sar., 2005). Takođe se posle 6 h nakon tretmana dozom od 20 mg/kg t.m. smanjuje i aktivnost GST, što može biti znak supresije metaboličke konverzije ibogaina u noribogain. Posle 24 h, GST ostaje smanjena, ali bez potvrđene statističke značajnosti. Nakon 24 h od aplikacije ibogaina, zabeleženo je povećanje količine glikogena, što je u saglasnosti sa uticajem koji ibogain ima na energetske metabolizam. Zabeleženo je da i drugi alkaloidi mogu dovesti do povećanja količine glikogena u srcu (Stegelmeier i sar., 1995), a poznato je da se kod pacijenata sa poremećajem

abnormalno visokog skladištenja glikogena (Glycogen Storage Disease) razvija upravo srčana aritmija i kardiomiopatija (Austin i sar., 2011) praćena poremećajem QT talasa (Bharati i sar., 1982). Ibogain upravo usporava repolarizaciju akcionih potencijala u srcu, što može dovesti do produžavanja QT intervala i srčanih aritmija (Rubi i sar., 2017), za koje je i pokazano da su uzroci smrtnog ishoda ljudi koji su konzumirali ibogain (Alper i sar., 2012; Hoelen i sar., 2009). Sve zajedno uzeto ukazuje na prisustvo oksidativnog stresa u srcu nakon 6 h od ingestije ibogaina, što može dovesti do oksidativnih oštećenja i biti jedan od kasnijih faktora rizika nastanka zastajkivanja srčanog ritma i fatalnih ishoda, ali i otvara pitanja koliki je efekat uticaja na srce preko receptora za koje se vezuju ibogain i noribogain i koliki je udeo metaboličkog nastajanja noribogaina, sistemski i u srcu. Poznato je da terapijske koncentracije ibogaina inhibiraju ERG (hERG) kalijumove kanale ljudi, kao i voltažno zavisne jonske kanale - Nav1.5 natrijumove kanale (u približno 25x većoj koncentraciji), produžujući trajanje akcionih potencijala, čime je ibogain okarakterisan kao potencijalni aritmik (Koenig i sar., 2011; Kovar i sar., 2011).

Rezultati na srcu stoga ponovo pokreću upravo pitanje direktnih efekata (kao što je uticaj ibogaina na metabolizam energenata) i/ili posredovanih receptorima (kao posledica razlika u dužini perzistencije ibogaina i noribogaina i u njihovim afinitetima za pojedine receptore). Da bi se više istražio ovaj odnos iskorišćen je ileum kao model sistem. S jedne strane su dobijeni rezultati promena antioksidativnih parametara detektovanih posle primene ibogaina (*in vivo*), a sa druge uticaja *ex vivo* primene rastućih koncentracija ibogaina na kontraktilnu aktivnost i promene antioksidativnog statusa posle tretmana. U *in vivo* istraživanju pokazano je da nema promena u aktivnosti SOD1 i 2, ali da je povećana aktivnost GSH-Px koji ima veći afinitet prema H₂O₂ u odnosu na KAT, dok je aktivnost KAT smanjena, 6 h nakon primene niže doze ibogaina (1 mg/kg t.m.) Radovi su pokazali da ibogain ostvaruje svoje efekte u krajnjoj liniji preko kalijumovih kanala (Zhang i Cuevas, 2005), te su za ispitivanje uloge pojedinih klasa signalnih puteva u efektima ibogaina za pretretmane izabrani

blokatori: kalijumovih voltažno zavisnih kanala (6 TM familije) - 4-aminopiridin, Ca²⁺-aktiviranih kalijumovih kanala Slo subfamilije (7TM) - tetraetil amonijum i K_{ATP}-zavisnih kalijumovih kanala - glibenklamid. Rezultati su pokazali da ibogain svoje dejstvo ostvaruje samo preko K_{ATP}-zavisnih kalijumovih kanala od ispitanih, jer se njegovo dejstvo smanjuje u prisustvu glibenklamida. Glibenklamid je inhibitor K_{IR6.x} klase (2TM domena, dva tipa) kalijumovih kanala koji su ATP zavisni i koji svoju aktivnost kombinuju sa sulfonilurea receptorima (SUR1, SUR2 i SUR3) koji pripadaju familiji ATP vezujućih transportera. Ovi kanali (kombinacije K_{IR6.x} sa SUR-om daju kanale različite senzitivnosti) su regulisani citosolnim nukleotidima i povezuju ćelijski metabolizam sa električnom aktivnošću i K⁺ fluksom (Ashcroft i Gribble, 1998). Posebno su značajni u procesu endocitoze insulina (održavanje nivoa glukoze), u stanjima ishemije srca i mozga i kontroli vaskularnog tonusa. Uloga ATP je da inhibira kanal. ATP vezujuću aktivnost s druge strane smanjuje PIP₂, zasad nepoznatim mehanizmom. Pretpostavlja se da je uzrok ili povećana verovatnoća otvaranja kanala preko PIP₂ ili kompetitivna inhibicija ATP i PIP₂ za isto vezujuće mesto ili smanjenje lokalne koncentracije ATP usled elektrostatičkog uticaja negativno naelektrisanog PIP₂ (Fan i Makielski, 1997; Shyng i Nichols, 1998; Baukrowitzi sar., 1998). Fina regulacija kanala se postiže preko SUR-a, za koji se vezuju različite klase molekula, ali su najznačajniji nukleotidi vezani za Mg koji povećavaju aktivnost K_{ATP} kanala i sprečavanju aktivaciju kanala metaboličkom inhibicijom (Shyng i sar., 1997; Gribble i sar., 1997). Metabolička kontrola K_{ATP} kanala se ostvaruje upravo uticajima i ATP i MgADP preko C kraja SUR-a (Vedovato i sar., 2018). Osobina ibogaina da prazni ATP depoe i menja homeostatski odnos koncentracija ATP/ADP je jedan od mogućih mehanizama ibogainom posredovanih efekata. Efekti se razlikuju u odnosu na tip kontrakcije. Kod električne stimulacije, potrebne su manje koncentracije ibogaina da bi se inhibirale kontrakcije, a pretretman glibenklamidom pospešuje inhibitornu aktivnost, što ukazuje na aktivaciju K_{ATP} kanala, koja dolazi od metaboličke promene i povećanja prisustva MgADP

(ADP je alosterički aktivator glikolize). U situaciji delimične blokade kanala glibenklamidom u dozi koja nema efekta *per se*, nema snažnog inhibitorynog ćelijskog metaboličkog efekta ibogaina, depolarizacija se odvija i usporava se inhibicija kontraktilnosti. Za inhibiciju toničnih kontrakcija potrebne su višestruko veće koncentracije ibogaina, pri čemu prisustvo glibenklamida povećava potrebnu koncentraciju ibogaina za potpunu inhibiciju, a i EC_{50} vrednost. Ovo ukazuje na ATP oslobađanje koje nije kompenzovano.

U svakom slučaju, pad kontraktilnosti ileuma može biti i posledica metaboličkog iscrpljivanja, ali posle ispiranja preparata ileum pokazuje funkcionalnost, što znači da je za inhibitoryni efekat kontraktilnosti potrebno prisustvo ibogaina, što ukazuje i na prisustvo vezivanja ibogaina i za druge receptore. Kakva je veza ibogain posredovanih efekata sa sistemskim metabolizmom glukoze na osnovu ovde prikazanih rezultata ne može se konstatovati, ali je poznato da genetski Kir6.2 „knockout“ miševi (bez prisustva kanala) imaju normalne nivoe glukoze i pokazuju umereno pogoršanje tolerancije na glukozu (Miki i sar., 1998). Međutim, pokazano je da su K_{ATP} kanali u srcu zatvoreni u rastvoru bez glukoze i otvaraju se samo kada dođe do pada ATP-a ispod kritične fiziološke granice (Nichols i Lederer, 1991).

Rezultati merenja aktivnosti antioksidativnih enzima posle *ex vivo* tretmana ileuma sa ibogainom pokazuju jasno prisustvo oksidativnog stresa, a u tonično kontrahovanim ileumima, antioksidativni sistem reaguje povećanjem ukupne SOD i KAT, što je pokazano i našim ranijim radovima (Oreščanin i sar., 2018). Povećanje oba enzima ukazuje na jak oksidativni pritisak. Međutim, kada se ileumi pretretiraju sa glibenklamidom, dolazi do smanjenja aktivnosti SOD, što ukazuje na smanjenje fluksa superoksida. Poznato je da se K_{ATP} kanali aktiviraju u uslovima ishemije i inhibiraju aktivnost mitohondrijalnih prelaznih propusnih pora (mitochondrial permeability transition pore, MPTP). MPTP su normalno zatvorene, ali se otvaraju u uslovima nagomilavanja Ca^{2+} u mitohondrijama, pražnjenja adeninskih nukleotida, povećanja koncentracije fosfata i oksidativnog stresa (Stansfeld i sar., 2014). Blokada K_{ATP} kanala

rezultuje u smanjenju aktivacije MPTP i smanjenju superoksid fluksa, te se i aktivnost SOD smanjuje. Aktivnost KAT ostaje i tada povećana, ukazujući na i dalje visoku produkciju H₂O₂.

Međutim, kod električne stimulacije, takođe je prisutno povećanje aktivnosti SOD posle tretmana ibogainom, ali i smanjenje GSH-Px, što ukazuje na prisustvo oksidativnog stresa, ali se drugim mestima nastanka ROS. Kako je upotrebljena doza ibogaina niža od korišćene za tonične kontrakcije, efekat oksidativnog stresa je ovde niži.

Sveukupno, ovi rezultati potvrđuju višestruka dejstva ibogaina, na različitim ćelijskim nivoima i kompleksnost njegovog delovanja, koja uključuje i metaboličke efekte. Međutim, efekti koje smo dobili *in vivo* i *ex vivo* na ileumu su prisutni u velikom rasponu koncentracija i u zavisnosti od njih je i raspon dejstva i mesta na kojima ibogain deluje.

Ibogain je pokazao efekat i u testisima i to na aktivnost SOD. Poznato je da stvaranje egzogenog ROS (iz krvi ili leukocita) inhibira pokretljivost spermatozoida i dovodi do smanjivanja ATP u njima i to vrlo brzo (Armstrong i sar., 1999). Efekat je posredovan vodonik peroksidom i nezavisan je od oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. S druge strane, tokom razvoja hiperaktivnosti spermatozoida i sazrevanja (kapacitacije) sperme stvara se superoksid anjon i to sve vreme verovatno aktivnošću NADPH oksidaze (Lamirande i Gagnon, 1995). ROS su i signalni molekuli: regulišu fosforilaciju tirozina u proteinima, ali i protein kinaze A (PKA) i kinaze regulisane ekstracelularnim signalima (*eng.* extracellular signal-regulated kinases ERK) (O'Flaherty i sar., 2006). Pokazano je da egzogeni ROS pomažu, a SOD i KAT blokiraju fosforilaciju PKA supstrata vezanih za kapacitaciju spermatozoida (O'Flaherty i sar., 2004). SOD je prisutna u visokom stepenu u seminalnoj plazmi radi zaštite od oksidativnog stresa i kao faktor koji sprečava prevremeno sazrevanje (Cassani i sar., 2005; de Lamirande i Gagnon, 1993). Tačno mesto u procesu spermatogeneze i u kojim strukturama testisa bi ibogain imao efekta nije moguće proceniti. Navedena istraživanja ukazuju na

protektivno dejstvo SOD i KAT u sprečavanju preranog sazrevanja, ali i zaštite. Rezultati povećanja SOD1 (posle 6 h od davanja obe doze) bi se mogli objasniti kao zaštita od oksidativnih oštećenja. Rezultat povećanja SOD2 i KAT (posle 24 h od primene doze od 1 mg/kg t.m.) bi ukazivao na zaustavljanje fosforilacije i usporavanje sazrevanja spermatozoida, posebno jer procesu kapacitacije doprinosi i glukoza kao supstrat glukoze oksidaze (Bize i sar., 1991).

Ovi rezultati ukazuju i na vremenski zavisani uticaj ibogaina, pre nego na dozu. U ostalim ispitivanim tkivima, bez obzira na prisustvo ibogaina, nema puno statistički značajnih efekata. U plućima manja doza nije imala nikakav efekat na aktivnost antioksidativnih enzima. Veća je posle 6 h izazvala smanjenje aktivnosti KAT, što može da bude i posledica inhibicije superoksidom, ali i kompenzatornim smanjenjem usled povećanja GSH-Px aktivnosti, koje je na granici statističke značajnosti u odnosu na kontrole, ali jeste značajna u poređenju sa manjom dozom posle 6 h. U slezini takođe nisu zabeležene promene aktivnosti antioksidativnih enzima, sem malog povećanja TBARS veće doze posle 6 h koju je prikazala analiza varijanse - ANOVA, ali ne i post hoc test. Ni u eritrocitima nema izmerenih promena aktivnosti antioksidativnih enzima. I u ovim statističkim analizama pokazuje se ponovo da diskretne razlike koje se javu u odnosu na kontrole, a nisu statistički značajne mogu da daju statistički značajnu razliku između pojedinih tretmana, ali ne i u odnosu na kontrolu, te se ni ne diskutuju, jer je i njihov značaj nije eksplicitno pokazan.

Značaj stvaranja ROS i oksidativnog stresa na procese u ćelijama i sudbinu organizama na jednoj strani i uloge antioksidativnih enzima i antioksidanasa na drugoj stranije sada već deo standardne literature (Halliwell i Gutteridge, 2015). ROS imaju dvostruku ulogu i kao unutarćelijski toksikanti i kao signalni molekuli, te njihova veza sa dejstvima farmakoloških agenasa može imati za posledicu različite efekte koji su deo diskretnog signalnog miljea. Rezultati pokazuju da ibogain ostvaruje efekte na visoko metaboličkim i kontraktilnim tkivima, dok u plućima i slezini, bez obzira na visoku prisutnost

ne ispoljava neko dejstvo. Koliko je njegova uloga u narušavanju/modifikaciji ćelijske i sistemske komunikacije ne može se sa sigurnosti reći. Ono što je jasno je da mu je efekat visoko tkivno specifičan i da zavisi od opšteg nivoa metabolizma. Osim toga, tkivna specifičnost je izražena i nepostojanjem klasične dozne zavisnosti, što može biti posledica višestrukih ćelijskih signalnih mesta na koje ibogain deluje.

6. ZAKLJUČCI

1. Ibogain u primenjenim dozama utiče na redoks status posmatranih tkiva i menja aktivnost antioksidativne odbrane, ali je odgovor visoko tkivno, dozno i vremenski specifičan, bez jasne zajedničke karakteristike.
2. Ibogain u primenjenim dozama pokazuje glikogenolitičku aktivnost u jetri.
3. Ibogain u srcu smanjuje količinu proteinskih -SH grupa i time narušava redoks ravnotežu, što može dovesti do promena u srčanom radu.
4. Ibogain menja i redoks ravnotežu u testisima, a povećanje aktivnosti SOD ukazuje na delikatnost očuvanja balansa koncentracija superoksida i vodonik peroksida koja se smatra krucijalnom u procesu kapacitacije spermatozoida.
5. Ibogain inhibira kontraktilnost ileuma u nivou doza ispod mM, pri čemu je efekat pri električnoj stimulaciji u odnosu na tonične značajno veći.
6. Ibogain svoje dejstvo ostvaruje delimično preko K_{ATP} zavisnih kanala.

7. LITERATURA

Alper K, Cordell G, editors. The Alkaloids. Proceedings from the 1st International Conference; 1999 Nov; New York University's School of Medicine, USA. London: Academic Press; 2001 Oct. 333 p.

Alper K, Lotsof H, Kaplan C. The ibogaine medical subculture. *J Ethnopharmacol.* 2008;115(1):9-24.

Alper K. Ibogaine: A Review. *Alkaloids Chem Biol.* 2001; 56:1-38.

Alper KR, Stajic M, Gill JR. Fatalities temporally associated with the ingestion of ibogaine. *J Forensic Sci.* 2012;57(2):398-412.

Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(7-8):869-80.

Ashcroft FM, Gribble FM. Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Neurosci.* 1998;21(7):288-94.

Atkinson HJ, Babbitt PC. Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry.* 2009;48(46):11108-16.

Austin SL, Proia AD, Spencer-Manzon MJ, Butany J, Wechsler SB, Kishnani PS. Cardiac Pathology in Glycogen Storage Disease Type III. *JIMD Rep.* 2012;6:65-72.

Baba SP, Zhang D, Singh M, Dassanayaka S, Xie Z, Jagatheesan G, Zhao J, Schmidtke VK, Brittan KR, Merchant ML, Conklin DJ, Jones SP, Bhatnagar A. Deficiency of aldose reductase exacerbates early pressure overload-induced cardiac dysfunction and autophagy in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;118:183-92.

Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP, Fakler B. PIP₂ and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science.* 1998;282(5391):1141-4.

Baumann M, Rothman R, Pablo J, Mash D. In vivo neurobiological effects of ibogaine and its O-desmethyl metabolite, 12-hydroxyibogamine (noribogaine), in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(2):531-9.

Baumann MH, Pablo JP, Ali SF, Rothman RB, Mash DC. Noribogaine (12-hydroxyibogamine): a biologically active metabolite of the antiaddictive drug ibogaine. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;914:354-68.

Baumann MH, Rothman RB, Ali SF. Neurochemical and neuroendocrine effects of ibogaine in rats: comparison to MK-801. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;844:252-64.

Benderdour M, Charron G, DeBlois D, Comte B, Des Rosiers C. Cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adduct formation: an event that precedes hypertrophy development. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45154-9.

Ben-Jonathan N. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev.* 1985;6(4):564-89.

Bergdahl A, Swärd K. Caveolae-associated signalling in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004;82(5):289-99.

Beutler E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. 3rd ed. New York: Grune and Stratton; 1982. 102 p.

Bharati S, Serratto M, DuBrow I, Paul MH, Swiryn S, Miller RA, Rosen K, Lev M. The conduction system in Pompe's disease. *Pediatr Cardiol.* 1982;2(1):25-32.

Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod.* 1991;44(3):398-403.

Bolt HM. Genetic and individual differences in the process of biotransformation and their relevance for occupational medicine. *Med Lav.* 1994;85(1):37-48.

Cassani P, Beconi MT, O'Flaherty C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and

morphological parameters in canine semen. *Anim Reprod Sci.* 2005;86(1-2):163-73.

Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:493-531.

Chen K, Kokate TG, Donevan SD, Carroll FI, Rogawski MA. Ibogaine block of the NMDA receptor: in vitro and in vivo studies. *Neuropharmacology.* 1996; 35(4):423-31.

de Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl.* 1993;16(1):21-5.

de Lamirande E, Gagnon C. Capacitation associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(3):487-95.

Deecher DC, Teitler M, Soderlund DM, Bornmann WG, Kuehne ME, Glick SD. Mechanisms of action of ibogaine and harmaline congeners based on radioligand binding studies. *Brain Res.* 1992;571(2):242-7.

Drabkin D, Austin J. Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells: nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem.* 1935;112:51-5.

Ellman G. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82(1):70-7.

Fan Z, Makielski JC. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J Biol Chem.* 1997;272(9):5388-95.

Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978; 201(4359):875-80.

Ghatta S, Nimmagadda D, Xu X, O'Rourke ST. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther.* 2006;110(1):103-16.

Glancy B, Willis WT, Chess DJ, Balaban RS. Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry*. 2013;52(16):2793-809.

Glatzle D, Vuilleumier J, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*. 1974;30(6):665-8.

Glick SD, Maisonneuve IM, Pearl SM, Deibel CR, Gallagher CA, Hough LB. Mechanism of action of ibogaine: role of kappa opioid effects. *NIDA Res Monogr*. 1996;162:135.

Glick SD, Maisonneuve IS. Mechanisms of antiaddictive actions of ibogaine. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;844:214-26.

Glick SD, Pearl SM, Cai J, Maisonneuve IM. Ibogaine-like effects of noribogaine in rats. *Brain Res*. 1996;713(1-2):294-7.

Global ibogaine therapy alliance [Internet]. Montreal: The Global Ibogaine Therapy Alliance; 2016. Clinical Guidelines for Ibogaine-Assisted Detoxification; 2016 Sep 11 [cited 2018 Nov15]. Available from: <http://www.ibogainealliance.org/guidelines/>

Glue P, Cape G, Tunnick D, Lockhart M, Lam F, Hung N, Hung C, Harland S, Devane J, Crockett R, Howes J, Darpo B, Zhou M, Weis H, Friedhoff L. Ascending single-dose, double-blind, placebo-controlled safety study of noribogaine in opioid-dependent patients. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2016; 5(6):460-8.

Glue P, Winter H, Garbe K, Jakobi H, Lyudin A, Lenagh-Glue Z, Hung C. Influence of CYP2D6 activity on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single 20 mg dose of ibogaine in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2015; 55(6):680-7.

Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM. The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J*. 1997;16(6):1145-52.

Groitel B, Jakob U. Thiol-based redox switches. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1844(8):1335-43.

Habig N, Pabst M, Jakoby N. GST: 1st enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974;249:7130-9.

Halliwell B, Gutteridge MCJ. *Free radicals in biology and medicine*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2015.

Hayes J, Flanagan J, Jowsey R. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88.

Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(2):531-54.

Helsley S, Rabin RA, Winter JC. Drug discrimination studies with ibogaine. *Alkaloids Chem Biol*. 2001;56:63-77.

Hinkle E, Wiersma W, Jurs G. *Applied statistics for behavioral sciences*. 5th ed. Boston: Houghton Mifflin Company; 2002.

Hoelen DW, Spiering W, Valk GD. Long-QT syndrome induced by the antiaddiction drug ibogaine. *N Engl J Med*. 2009;360(3):308-9.

Hough L, Pearl S, Glick S. Tissue distribution of ibogaine after intraperitoneal and subcutaneous administration. *Life Sci*. 1996;58(7):PL119-22.

Ivanova H, Vervliet T, Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, Bultynck G. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(10):2164-83.

Jeffcoat R, Cook C, Hill J, Coleman D, Pollack G. Disposition of [3H] ibogaine in the rat [abstract]. In: Harris L, editor. 55th Annual Scientific Meeting of the College on Problems of Drug Dependence; 1993 Jun; Toronto, Canada. Rockville: National institute on drug abuse; 1994. p. 309.

Johnson L. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 5th ed. Academic Press; 2012.

Koenig X, Kovar M, Rubi L, Mike AK, Lukacs P, Gawali VS, Todt H, Hilber K, Sandtner W. Anti-addiction drug ibogaine inhibits voltage-gated

ionic currents: a study to assess the drug's cardiac ion channel profile. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;273(2):259-68.

Koenig X, Kovar M, Rubi L, Mike AK, Lukacs P, Gawali VS, Todt H, Sandtner W, Hilber K. The anti-addiction drug ibogaine inhibits cardiac ion channels: a study to assess the drug's proarrhythmic potential. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2012;13(Suppl 1):A38.

Kontrimaviciute V, Mathieu O, Mathieu-Daude JC, Vainauskas P, Casper T, Baccino E, Bressolle FM. Distribution of ibogaine and noribogaine in a man following poisoning involving root bark of the *Tabernanthe Iboga* scrub. *J Anal Toxicol.* 2006;30(7):434-40.

Kovar M, Koenig X, Mike A, Cervenka R, Lukacs P, Todt H, Sandtner W, Hilber K. The anti-addictive drug ibogaine modulates voltage-gated ion channels and may trigger cardiac arrhythmias. *BMC Pharmacol.* 2011; 11(Suppl 2):A1.

Koželj G. Development of an analytical method for the determination of alkaloids in biological samples. [dissertation]. [Ljubljana]: Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana. 2015.

Kubiliene A, Ivanauskas L, Kiliuviene G, Marksiene R, Sadauskiene I, Ivanov L. Cumulation of *Tabernanthe Iboga* alkaloid and its metabolite in organs of mice. *J Med Plants Res.* 2012;6(11):2194-9.

Kubiliene A, Sveikata A, Zevzikovas A, Sadauskiene I, Ivanov L. Investigation into pharmacokinetic properties of active alkaloid ibogaine and its metabolite noribogaine. *Acta Pol Pharm.* 2017;74(5):1591-7.

Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Kunz WS. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(4):163-8.

Liu YH, Carretero OA, Cingolani OH, Liao TD, Sun Y, Xu J, Li LY, Pagano PJ, Yang JJ, Yang XP. Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to

myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(6):H2616-23.

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

Ma D. Applications of yeast in drug discovery. *Prog Drug Res*. 2001;57:117-62.

Mach RH, Smith CR, Childers SR. Ibogaine possesses a selective affinity for sigma 2 receptors. *Life Sci*. 1995;57(4):PL57-62.

Maciulaitis R, Kontrimaviciute V, Bressolle FM, Briedis V. Ibogaine, an anti-addictive drug: pharmacology and time to go further in development. A narrative review. *Hum Exp Toxicol*. 2008;27(3):181-94.

Mash D, Kovera C, Buck B, Norenberg M, Shapshak P, Hearn W, Sanchez-Ramos J. Medication development of ibogaine as a pharmacotherapy for drug dependence. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;844:274-92.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969;244(22):6049-55.

Meisner JA, Wilcox SR, Richards JB. Ibogaine-associated cardiac arrest and death: case report and review of the literature. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2016;6(2):95-8.

Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(18):10402-6.

Misra H, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-5.

Mitrović M, Mazić D, Petrović M. *Osnovi fiziologije čoveka, Grafomark Beograd* 2000.

Monro R, Bertrand P, Bornstein J. ATP participates in three excitatory postsynaptic potentials in the submucous plexus of the guinea pig ileum. *J Physiol*. 2004 15;556(Pt 2):571-84.

Munday MK, Blaylock NA, Mason R, Glick SD, Maisonneuve IM, Wilson VG. Pharmacological comparison of the effect of ibogaine and 18-methoxycoronaridine on isolated smooth muscle from the rat and guinea-pig. *Br J Pharmacol*. 2000;129(8):1561-8.

Nichols CG, Lederer WJ. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol*. 1991;261(6 Pt 2):H1675-86.

Nikolić-Kokić A, Mijušković A, Tatalović N, Nestorov J, Miler M, Oreščanin-Dušić Z, Nikolić M, Milošević V, Blagojević D, Spasić M, Miljević Č. Effects of antipsychotic drug administration on antioxidative defense enzymes in male rat kidney. *J Toxicol Environ Health A* 2016;79(20):905-11.

Nikolić-Kokić A, Oreščanin-Dušić Z, Spasojević I, Slavić M, Mijušković A, Paškulin R, Miljević Č, Spasić M, Blagojević D. Ex vivo effects of ibogaine on the activity of antioxidative enzymes in human erythrocytes. *J Ethnopharmacol*. 2015;164:64-70.

Obach S, Pablo J, Mash D. Cytochrome P4502D6 catalyzes the O-demethylation of the psychoactive alkaloid ibogaine to 12-hydroxyibogamine. *Drug Metab Dispos*. 1998;26(8):764-8.

O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Phosphorylation of the arginine-X-X-(serine/threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(5):355-63.

O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(4):528-40.

Oreščanin-Dušić Z, Tatalović N, Vidonja-Uzelac T, Nestorov J, Nikolić-Kokić A, Mijušković A, Spasić M, Paškulin R, Bresjanac M, Blagojević D. The effects of ibogaine on uterine smooth muscle contractions: relation to the activity of antioxidant enzymes. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:5969486.

Paglia D, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):74-7.

Paling FP, Andrews LM, Valk GD, Blom HJ. Life-threatening complications of ibogaine: three case reports. *Neth J Med*. 2012;70(9):422-4.

Papadodima SA, Dona A, Evaggelakos CI, Goutas N, Athanaselis SA. Ibogaine related sudden death: a case report. *J Forensic Leg Med*. 2013;20(7):809-11.

Paškulin R, Jamnik P, Danevčič T, Koželj G, Krašovec R, Krstić-Milošević D, Blagojević D, Štrukelj B. Metabolic plasticity and the energy economizing effect of ibogaine, the principal alkaloid of *Tabernanthe iboga*. *J Ethnopharmacol*. 2012;143(1):319-24.

Paškulin R, Jamnik P, Obermajer N, Slavić M, Štrukelj B. Induction of energy metabolism related enzymes in yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ibogaine is adaptation to acute decrease in ATP energy pool. *Eur J Pharmacol*. 2010;627(1-3):131-5.

Paškulin R, Jamnik P, Živin M, Raspor P, Štrukelj B. Ibogaine affects brain energy metabolism. *Eur J Pharmacol*. 2006;552(1-3):11-4.

Pearl SM, Herrick-Davis K, Teitler M, Glick SD. Radioligand-binding study of noribogaine, a likely metabolite of ibogaine. *Brain Res*. 1995;675(1-2):342-4.

Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(2):245-62.

Pleskovic A, Gorjup V, Brvar M, Kozelj G. Ibogaine-associated ventricular tachyarrhythmias. *Clin Toxicol (Phila)*. 2012;50(2):157.

Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Matic M, Coric V, Djukic T, Radic T, Simic T. Glutathione Transferases: Potential Targets to Overcome Chemoresistance in Solid Tumors. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12).

Popik P, Layer R, Skolnick P. 100 years of ibogaine: neurochemical and pharmacological actions of a putative anti-addictive drug. *Pharmacol Rev.* 1995; 47(2):235-53.

Ralto KM, Parikh SM. Mitochondria in acute kidney injury. *Semin Nephrol.* 2016;36(1):8-16.

Rehoncorna S, Smith D, Akesson B, Westerberg E, Siesjo B. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe³⁺ - and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem.* 1980;34(6):1630-8.

Rubi L, Eckert D, Boehm S, Hilber K, Koenig X. Anti-addiction drug ibogaine prolongs the action potential in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cardiovasc Toxicol.* 2017;17(2):215-8.

Saltman P. Oxidative stress: a radical view. *Semin Hematol.* 1989;26(4):249-56.

Schep L, Slaughter R, Galea S, Newcombe D. Ibogaine for treating drug dependence. What is a safe dose? *Drug Alcohol Depend* 2016;166:1-5.

Schneider AS, Nagel JE, Mah SJ. Ibogaine selectively inhibits nicotinic receptor-mediated catecholamine release. *Eur J Pharmacol.* 1996;317(2-3):R1-2.

Sheppard S. A preliminary investigation of ibogaine: case reports and recommendations for further study. *J Subst Abuse Treat.* 1994;11(4):379-85.

Sherwood L. *Human Physiology: From Cells to Systems.* Cengage Learning, 2010, 293-6.

Shyng SL, Ferrigni T, Nichols CG: Regulation of KATP channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J Gen Physiol.* 1997;110(6):643-54.

Shyng SL, Nichols CG. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science*. 1998;282(5391):1138-41.

Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem. Int. Ed. Eng.* 1986; 25:1058-71.

Simic T, Mimic-Oka J, Ille K, Savic-Radojevic A, Reljic Z. Isoenzyme profile of glutathione S-transferases in human kidney. *Urol Res.* 2001;29(1):38-44.

Stansfield WE, Ranek M, Pendse A, Schisler JC, Wang S, Pulinilkunnil T, Willis MS. Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease. 1st ed. London: Academic Press; c2014. Chapter 4, Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure; p. 51-78.

Stegelmeier BL, Molyneux RJ, Elbein AD, James LF. The lesions of locoweed (*Astragalus mollissimus*), swainsonine, and castanospermine in rats. *Vet Pathol.* 1995;32(3):289-98.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44784-90.

Taverne YJ, Merkus D, Bogers AJ, Halliwell B, Duncker DJ, Lyons TW. Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life: A molecular timescale from Earth's earliest history to the rise of complex life. *Bioessays.* 2018;40(3).

Terada L, Leff J, Repine J. Measurement of xanthine oxidase in biological tissues. *Methods Enzymol.* 1990;186:651-6.

Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem.* 1990;265(1):454-61.

Tibell L, Hjalmarsson K, Edlund T, Skogman G, Engström A, Marklund SL. Expression of human extracellular superoxide dismutase in Chinese

hamster ovary cells and characterization of the product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(19):6634-8.

Tsuchihashi M. Zur Kenntniser Blutkatalase. *Biochemistry*. 1923; 140:65-74.

Vedovato N, Rorsman O, Hennis K, Ashcroft FM, Proks P. Role of the C-terminus of SUR in the differential regulation of β -cell and cardiac KATP channels by MgADP and metabolism. *J Physiol*. 2018;596(24):6205-6217.

Walker GM. *Yeast physiology and biotechnology*. Hoboken: Wiley and sons;1998.

Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol*. 2004;207(Pt 18):3221-31.

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2656-64.

Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J*. 1996;318(Pt 3):889-96.

Zemanovic S, Ivanov MV, Ivanova LV, Bhatnagar A, Michalkiewicz T, Teng RJ, Kumar S, Rathore R, Pritchard KA Jr, Konduri GG, Afolayan AJ. Dynamic Phosphorylation of the C Terminus of Hsp70 Regulates the Mitochondrial Import of SOD2 and Redox Balance. *Cell Rep*. 2018;25(9):2605-16.

Zetler G, Singbartl G, Schlosser L. Cerebral pharmacokinetics of tremor-producing harmala and iboga alkaloids. *Pharmacology*. 1972;7(4):237-48.

Zhang H, Cuevas J. Receptor activation blocks potassium channels and depresses neuroexcitability in rat intracardiac neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(3):1387-96.

BIOGRAFIJA KANDIDATA

Teodora Vidonja Uzelac, rođena 31.07.1983. godine u Beogradu, upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu 2002. godine. Diplomirala je 2010. godine sa prosečnom ocenom tokom studiranja 8,00. Od decembra 2011. godine zaposlena je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. Iste godine upisala je doktorske studije iz oblasti Medicinska farmakologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Angažovana je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patologiji“ 173014. Tema doktorske disertacije prihvaćena je 25.10.2016.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Vidonja Uzelac Teodora

broj upisa MF 1011

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Efekat ibogaina na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima i kontraktilnost
terminalnog ileuma kod mužjaka pacova

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 19. 2. 2019.

Vidonja Uzelac Teodora

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Teodora Vidonja Uzelac

Broj upisa MF 1011

Studijski program Medicinska farmakologija

Naslov rada Efekat ibogaina na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima i kontraktilnost terminalnog ileuma kod mužjaka pacova

Mentor N. sav. dr Duško Blagojević

Potpisani *D. Čarvarek*

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 19.2.2019.

Vidonja Uzelac Teodora

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Efekat ibogaina na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima i kontraktilnost terminalnog ileuma kod mužjaka pacova
koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na polednjoj listi).

Potpis doktoranta

U Beogradu, 19.2.2019.

Vidojka Uzelac Teodor