

Protektivno dejstvo agmatina od toksičnih efekata izazvanih hlorpromazinom kod pacova

Major, mr sc. farm.
Bratislav Dejanović

Beograd,
2015. godine

Skraćenice

adenilat ciklaza - AC
adenozin trifosfat - ATP
agmatin - AGM
amino kiselina – AK
aktivatorski protein-1 - AP-1
antioksidativni odbrambeni sistem - AOS
arginin dekarboksilaza - ADC
azot oksid - NO[•]
azot oksid sintaza - NOS
bakar cink superoksid dizmutaza - Cu, Zn SOD
vodonik peroksid - H₂O₂
gastrointestinalna GPx - GPx 2
glijalni fibrilarni kiseli protein - GFAP
glukoza-6-fosfat dehidrogenaza - G6PDH
glutation - GSH
glutation peroksidaza - GPx
glutation reduktaza - GR
GSH sintetaza - GS
guanilat ciklaza - GC
diamino oksidaza - DAO
2,2-dinitro-5,5-ditio-benzoeva kiselina - DTNB
ekstracelularna GPx - GPx 3
ekstracelularna superoksid dizmutaza - EC SOD
ekscitatorne amino kiseline - EAK
endotelna azot oksid sintaza – eNOS
inducibilna azot oksid sintaza – iNOS
intraperitonealno - *i.p.*
katalaza - CAT
klasična GPx - cGPx, GPx 1
L-askorbinska kiselina - vitamin C
L-dihidroksifenilalanin - DOPA
lipidna peroksidacija - LPO

lipidni aldehid - LOH
lipidni alkoksil radikal - LO[•]
lipidni peroksil radikal - LOO[•]
lipidni radikal - L[•]
malondialdehid - MDA
mangan superoksid dizmutaza - Mn SOD
metalotioneini - MT
molekularni kiseonik - O₂
neuronska azot oksid sintaza – nNOS
nitroblu tetrazolijum - NBT
azot oksid sintaza – NOS
nuklearni faktor-κB - NF-κB
oksidovani glutation - GSSG
ornitin dekarboksilaza - ODC
peroksinitrit - ONOO⁻
reaktivne vrste azota - RVA
reaktivne vrste kiseonika - RVK
redukovani glutation - GSH
retinol - vitamin A
selen-nezavisna glutation-peroksidaza - non-Se GPx
selen-zavisna glutation peroksidaza - Se GPx
singlet kiseonik - ¹O₂
slobodni radikali - SR
sulfinska kiselina - SO₂H
sulfonska kiselina - SO₃H
sulfhidrilne grupe - SH
superoksid anjon radikal - O₂^{•-}
superoksid dismutaza - SOD
tečna hromatografija sa masenom detekcijom - HPLC MS/MS
TBA reaktivne vrste - TBARS
tiobarbiturna kiselina - TBA
5-tio-2-nitrobenzoična kiselina - TNB
telesna masa – TM
ubihinon - koenzim Q

flavin adenin dinukleotid - FAD

fosfolipid hidroperoksid GPx - PH GPx, GPx 4

hidroksilni radikal - OH^{*}

4-hidroksi-2-noneal - HNE

8-hidroksiguanozin - 8-OH-G

hipohlorna kiselina - HOCl

hlorpromazin - HPZ

ciklični adenzin monofosfat - cAMP

α -tokoferol - vitamin E

β -karoten - provitamin A

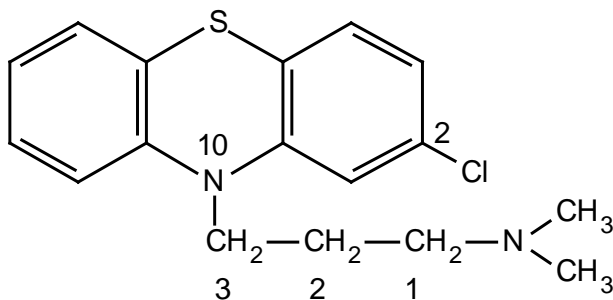
γ -aminobuterna kiselina - GABA

γ -glutamilcistein-sintetaza - γ -GCS

I UVOD

I1. Hlorpromazin (HPZ)

Hlorpromazin [(3-(2-hlorfenotiazin-10-il)-N,N-dimetilpropilamin)] je lek iz grupe fenotijazinskih antipsihotika. Predstavlja jedan od prvih sintetisanih neuroleptika, koji se u psihijatriji koristi kao standard za kvantifikaciju antipsihotičke aktivnosti ostalih antipsihotika.



Slika 11. Hlorpromazin

Hlorpromazin se proizvodi u obliku film bikonveksnih tableta (dve doze 25 i 100 mg), spakovanih u fiolu. Primarno se koristi za lečenje shizofrenija i drugih oblika psihoza. Psihoze obuhvataju čitav niz oboljenja, ali se naziv antipsihotici uobičajeno odnosi na lekove koji se koriste u terapiji shizofrenije. Shizofrenija je mentalni poremećaj koji karakteriše dezintegrisanost procesa mišljenja i emocionalnog odgovora. Predstavlja kompleksan moždani poremećaj, često ima hroničan tok i javlja se kod mladih osoba (Fernandez-Gonzalo i sar., 2014; Kato i sar., 2011; Suzuki i sar., 2011).

Jedna od novijih meta-analiza koja je obuhvatila 212 kliničkih studija sa više od 40 000 bolesnika sa shizofrenijom, u kojima je vršeno poređenje efikasnosti i podnošljivosti različitih antipsihotika, pokazala je da HPZ daleko češće, u odnosu na druge predstavnike ove grupe lekova, izaziva ekstrapiramidne simptome i antiholinergičke efekte (Leucht i sar., 2013). Ovi podaci su u skladu sa rezultatima druge velike prospektivne studije na preko 1 000 bolesnika sa shizofrenijom koji su u toku 5 godina bili na monoterapiji HPZ (Guo i sar., 2011).

Biohemijska priroda shizofrenije još uvek nije potpuno razjašnjena, mada rezultati ukazuju na uticaj oksidativnog stresa i oštećenje antioksidativne zaštite (antioksidativnog odbrambenog sistema - AOS) (Raffa i sar., 2009). Postoje i podaci da kod obolelih od shizofrenije postoji povećano stvaranje slobodnih radikala (SR) i/ili smanjenje AOS, kao i smanjena koncentracija glutaciona u cerebrospinalnoj tečnosti i u prefrontalnom korteksu (Popa-Wagner i sar., 2013).

Antipsihotici se dele na:

- tipične – klasični, konvencionalni, veliki trankilizeri, neuroleptici, gde spada i HPZ i
- atipične – novi, antipsihotici druge generacije.

Na ćelijskom nivou, antipsihotici svoje dejstvo ostvaruju najčešće blokadom dopaminskih (D_1 do D_5), uglavnom D_2 receptora (klasični antipsihotici se vezuju 50 puta jače za D_2 nego za D_1 receptore) (Schulz i sar., 2012). Kako antipsihotici deluju kao antagonisti ili agonisti i velikog broja drugih receptora (α_1 i α_2 adrenergičkih, H_1 i H_2 histaminskih, 5-HT₂ serotoninских i holinergičkih muskarinskiх receptora), njihovi klinički profili se razlikuju (Suzuki i sar., 2013). Mala specifičnost i selektivnost dejstva neuroleptika, na žalost, pored terapijskih, dovodi i do velikog broja neželjenih dejstava.

Važna neželjena dejstva zajednička za većinu predstavnika ove grupe lekova su ekstrapiramidalni motorni poremećaji (rana diskinezija, neuroleptički Parkinsonov sindrom, kasna diskinezija, maligni neuroleptički sindrom), odnosno autonomni i endokrini poremećaji (suva usta, perspiracija, poremećaj akomodacije, mikcije, konstipacija, hipotonija, tahikardija i hiperprolaktinemija, amenoreja, anovulacija, ginekomastija i seksualna disfunkcija).

Najteža komplikacija u trovanju neurolepticima je maligni neuroleptični sindrom, koji predstavlja izraženu ekstrapiramidalnu reakciju sa hipertonusom skeletne muskulature, promene u stanju svesti i hipertermiju.

11.1. Mehanizam delovanja HPZ

Hlorpromazin spada u blaže tipične antipsihotike. Mehanizam delovanja HPZ ostvaruje se dominantno blokadom dopaminskih (D_1 , D_2) i noradrenalinskiх, ali u manjoj meri i muskarinskiх acetilholinskiх receptora. Sedativno delovanje posledica je antagonističkog dejstva na histaminske H_1 receptore.

Postoje dve glavne familije dopaminskih receptora: D_1 i D_2 , pri čemu D_1 familija uključuje D_1 i D_5 podtipove i njihovo dejstvo vezano je za stimulaciju adenilat ciklaze (AC). Familija D_2 receptora uključuje D_2 , D_3 i D_4 podtipove, koji deluju inhibicijom AC. Do sada su sve poznate funkcije dopamina posredovane receptorima D_2 familije (Baldessarini i Tarazi, 2003).

U aksoplazmi terminalnih delova aksona dopaminergičkih neurona, tirozin se katalitičkim dejstvom tirozin hidroksilaze oksiduje u L-dihidroksifenilalanin (DOPA). Ona se zatim dekarboksilacijom prevodi u dopamin pomoću enzima dekarboksilaze aromatičnih amino kiselina i skladišti u vezikulama. Nakon egzocitoze, dopamin reaguje sa postsinaptičkim D_1 i D_2 receptorima, odnosno sa presinaptičkim D_2 i D_3 receptorima. Dopamin preuzet u presinaptički završetak podleže deaminaciji pomoću mitohondrijalne monoamino oksidaze. Moždani regioni sa najvećim sadržajem dopamina su kaudatus, putamen, frontalni korteks, kao i strukture limbičkog sistema (Mršulja i Kostić, 1994).

11.2. Farmakokinetika i metabolizam HPZ

Apsolutna bioraspoloživost peroralno unetog leka iznosi u proseku oko 32 % unete doze. Lek se akumulira prvenstveno u mozgu, gde koncentracija može biti i 10 puta veća nego u plazmi (Fang i sar., 1995). Nakon apsorpcije, HPZ se metaboliše u jetri, pri čemu nastaju brojni metaboliti koji su takođe farmakološki aktivni (MacAllister i sar., 2013). Mikrozomalni enzimi CYP450 su glavni posrednici metabolisanja HPZ (Wójcikowski i sar., 2012). Novija istraživanja pokazuju više od 100, a po nekim istraživanjima čak 150 metabolita HPZ (oko 60 neaktivnih), koji nastaju kombinacijom procesa demetilacije, sulfoksidacije, hidroksilacije i glukuronizacije (Wójcikowski i Daniel, 2010; Wójcikowski i sar., 2010). Metaboliti HPZ se eliminišu bubrezima. Nakon prestanka lečenja, neki od ovih metabolita mogu se i posle 2-6 nedelja naći u urinu, što pokazuje da se velike količine HPZ deponuju u tkivima (McIntosh i sar., 2010).

11.3. Toksični efekti HPZ

Mehanizam toksičnih efekata HPZ je nepoznat, verovatno i zbog toga što lek utiče na veći broj različitih receptora sa posledičnim poremećajem homeostaze brojnih organa. Dosadašnja saznanja o toksičnosti HPZ pokazuju njegovo štetno dejstvo na mnoga tkiva i organe u organizmu, ali se efekti razlikuju u zavisnosti da li se radi o akutnom trovanju ili efektima izazvanim hroničnim tretmanom. Pri trovanju HPZ dolazi do oštećenja jetre, kardiovaskularnog sistema, nervnog sistema, kao i oštećenja reproduktivnih organa (Khatua i Bhattacharyya, 2001; Babson i sar., 1994; Sulaiman i sar., 2006).

Toksični efekti HPZ na kardiovaskularni sistem su posledica blokiranja holinergičkih i α adrenergičkih receptora (Newcomer, 2007).

Izraženi farmakološki efekti ove supstance praćeni toksičnim efektima, povlače se 12-48 h nakon prestanka unošenja leka, mada mogu trajati i do 6 h (Burns, 2001).

Hlorpromazin i neki drugi fenotiazinski trankilansi mogu da izazovu fotosenzitivne i fotoalergijske reakcije kod bolesnika koji su na terapiji malim dozama ovih lekova. Visoke doze pri hroničnom tretmanu, mogu izazvati težak dermatitis sa hiperpigmentacijom, koji je neretko udružen sa oštećenjem retine i gubitkom vida.

Kao što je pomenuto, HPZ blokira brojne receptore, posebno holinergičke (muskarinske), H₁-histaminske, α -adrenergičke i 5-HT₂ receptore. Usled blokade muskarinskih receptora, javljaju se brojni periferni efekti kao što su zamućenje vida, povećanje intraokularnog pritiska, suvoća usta i očiju, konstipacija, retencija urina. Blokodom α -adrenergičkih receptora, javlja se ortostatska hipotenzija. Povećanje telesne mase (TM) čest je neželjeni efekat koji je posledica blokade 5-HT receptora (Hu i Kulkarni, 2000; Đorđević i sar., 2000).

Pri trovanju HPZ oštećuju se brojna tkiva, dolazi do posledičnog poremećaja homeostaze mnogih organa, ali imajući u vidu da su jetra i mozak ciljna mesta delovanja HPZ, praćeno je toksično dejstvo na ova dva organa.

11.3.1. Hepatotoksičnost

Iako su ispitivanja toksičnih efekata HPZ na jetru bila predmet brojnih studija kako *in vitro*, tako i *in vivo*, i dalje je mnogo nedoumica oko toksičnog dejstva HPZ na ovaj organ (Savoy i sar., 1997; Ikeda i sar., 1997; Adamson i sar., 1994). Dobijeni rezultati na eksperimentalnim životinjama pokazali su da se pri unosu visokih doza HPZ u kratkom vremenskom periodu uočavaju morfološke promene jetre, kao i promene enzimske aktivnosti, dok još uvek nema jasnih podataka o razvoju oštećenja jetre kod pacijenata nakon trovanja ili posle duže terapije ovim lekom (Can i sar., 2003). Pored činjenice da se toksični efekti HPZ na jetri ne uočavaju kod ljudi, ovaj eksperimentalni model na životinjama poslužio je u istraživanjima za izazivanje i objašnjenje hepatotoksičnosti (Sulaiman i sar., 2006).

Eksperimentalne studije pokazale su da se pri jednokratnom unosu visokih doza HPZ, bilo parenteralnim ili oralnim putem, najviše koncentracije leka postižu upravo u jetri gde se vrši njegovo metabolisanje (Clancy i sar., 2000).

Pretpostavlja se da kod akutnog trovanja, oštećenje jetre nastaje usled direktnog toksičnog delovanja HPZ na koji se nadovezuje proces inflamacije. Primarna oštećenja jetre nakon davanja HPZ nastaju modifikacijom sulfhidrilnih (SH) grupa ključnih molekula u mitohondrijama usled delovanja leka, izazivajući oksidativni stres i smanjenje mitohondrijalne aktivnosti, ali mogu biti i posledica ishemije. Sekundarna oštećenja nastaju aktivacijom Kupferovih ćelija i kaskadom kompleksnih događaja, koji uključuju različite ćelije jetre i brojne inflamatorne i citotoksične medijatore (Hoebe i sar., 2000; Maruiwa i sar., 1993).

Poznato je da fenotijazini imaju imunomodulatorne efekte. Hlorpromazin utiče na oslobađanje citokina, koji su od izuzetne važnosti kao medijatori u inflamaciji (Pollmächer i sar., 2000). U eksperimentima na životinjama pokazano je da akutno i subhronično trovanje HPZ izaziva povećanje iRNK inflamatornih citokina i hemokina, sa povećanjem ekspresije TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , γ -interferona, makrofagnog inflamatornog proteina-2 i intracelularnog adhezionog molekula-1 (Gandhi i sar., 2010). Nastale promene u jetri, tj. oslobađanje proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1, γ -interferon) od strane Kupferovih ćelija, izazivaju infiltraciju leukocita i dodatna oštećenja ovog organa. Činjenica da se oslobađanje citokina i hemokina dešava pod dejstvom transkripcionih faktora, kao što su nuklearni faktor- κ B (NF- κ B) i aktivatorski protein-1 (AP-1), koji su inače redoks osetljivi, ukazala je na mogućnost da HPZ može izazvati ekspresiju proinflamatornih citokina i hemokina i uticajem na redoks stanje ćelije, odnosno izazivanjem oksidativnog stresa u jetri (Can i sar., 2003).

11.3.2. Neurotoksičnost

Od 50-tih godina prošlog veka i prvog nalaza o štetnom dejstvu HPZ na CNS, usledile su brojne studije, potvrđujući da je mozak ciljni organ dejstva ovog ksenobiotika, posebno pri produženom davanju (Pillai i sar., 2007).

Selektivna osetljivost pojedinih moždanih struktura na neurotoksične efekte HPZ rezultat je specifične biohemijske organizacije vulnerabilnih struktura. Toksični efekti HPZ na CNS ogledaju se u ireverzibilnom oštećenju i gubitku neurona u kori velikog mozga, strijatumu i hipokampusu (Mink, 1999).

Složenost anatomsko-funkcionalne i neurohemijske organizacije mozga osnova su specifičnih promena koje se javljaju u toku različitih patoloških zbivanja. Strijatum je deo bazalnih ganglija i ima izuzetno važnu ulogu u regulaciji motorike. Neostrijatum se sastoji od kaudatusa i putamena i najmasivniji je deo bazalnih ganglija. Najveći broj aferentnih vlakana neostrijatum dobija iz kore velikog mozga. Prvi neuronski sistem započinje u kori mozga, odakle polazi najveći broj glutamatergičkih kortikostrijatnih vlakana, koja se završavaju u putamenu i kaudatusu. Drugi glavni neuronski sistem počinje, takođe u somatomotornoj kori, čiji neuroni daju glutamatergičke neurone za neostrijatum, odakle polaze striopalidna vlakna i nastavljaju palidonigranim vlaknima, kao i strionigranim snopovima (Marinković i sar., 1989). Početni deo oba neuronska kruga bazalnih ganglija predstavljaju kortikostrijatna vlakna. Od posebnog značaja kod trovanja HPZ, pored strijatuma i kore prednjeg mozga je i hipokampus, struktura koja dobija veliki broj aferentnih vlakana, između ostalog i iz entorinalnog korteksa. Njihova međusobna povezanost čini ih naročito sklonim za oštećenja indukovana HPZ (Baf i sar., 1995).

Primarni efekti toksičnosti HPZ ispoljavaju se depresijom CNSa, od kojih su dominantni sedacija, antiholinergički efekti i poremećaji regulacije temperature.

Poznato je da citokini pokazuju brojne efekte na CNS (Mengozi i sar., 1994). Uticaj HPZ na indukciju oslobađanja citokina je važan faktor u proučavanju imunopatologije kod psihijatrijskih oboljenja. Eksperimentalne studije pokazuju da HPZ inhibira produkciju TNF- α kod miševa, i stimuliše IL-10 ekspresiju u mozgu. U jednoj studiji pokazano je da davanje HPZ povećava produkciju IL-6 i IL-10, kao i TNF- α u mozgu kod miševa (Stewart i sar., 2010).

Postoje histološki dokazi koji ukazuju da jedan od puteva oštećenja ćelija indukovano HPZ uključuje inflamatorne ćelije, preventivno reaktivnu mikrogliju, koja kod akutno otrovanih pacijenata može biti izvor citokina i učestvovati u aktivaciji proteina komplementa (Kato i sar., 2011). Imunoreaktivnost astrocita i mikroglije moguće je detektovati markiranjem brojnih citoplazmatskih proteina paletom specifičnih antitela. Jedan od takvih je glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. *Glial fibrillar*

acidic protein, GFAP), čija ekspresija je detektovana na brojnim tipovima ćelija CNS, uključujući i astrocite (Stevanovic i sar., 2013).

I2. Akutna trovanja hlormpromazinom

Na našim prostorima najčešći uzročnici akutnih trovanja su lekovi. Podaci centara za kontrolu trovanja ukazuju na milionske slučajeve trovanja usled predoziranja lekovima, a akutna trovanja lekovima predstavljaju jedan od značajnih uzročnika smrtnih ishoda. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, akutna trovanja, među kojima su procentualno najzastupljenija trovanja lekovima, uz karcinome i bolesti kardiovaskularnog sistema, predstavljaju najznačajnije uzročnike smrti na našoj planeti.

Prema podacima Američkog udruženja centara za kontrolu trovanja, tokom 2013. godine u Americi je zabeleženo 24 miliona slučajeva trovanja, gde lekovi imaju značajan udeo u ukupnom broju trovanja, a ako se posmatraju samo trovanja sa smrtnim ishodom, preuzimaju potpuni primat (više od 80 %) (Bronstein i sar., 2011). Kao razlog trovanja sa letalnim ishodom u polovini slučajeva navodi se samoubistvo, zatim zloupotreba, kao i greške u terapiji ili nepravilna upotreba leka. Trend trovanja lekovima raste (od 1999-2005. godine je udvostručen sa najvećim povećanjem u grupi osoba starosti 35-40 godina) (Paulozzi i Anest, 2007).

Na osnovu podataka o korišćenju HPZ u akutnim trovanjima, poznato je da sa aspekta samoubilačkih trovanja, jedna petina pacijenata sa shizofrenijom pokuša samoubistvo, a jedna polovina u tome i uspe (Bronstein i sar., 2011; Paulozzi i Anest, 2007). Prema podacima brojnih centara za kontrolu trovanja, HPZ ne spada u grupu najčešćih uzročnika samotrovanja, ali su akutna trovanja ovim lekom izuzetno teška (Sasaki i sar., 2013).

I3. Slobodni radikali i mehanizam oksidativnog stresa

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, sa jednim ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, što ih čini veoma reaktivnim, tako da mogu da reaguju međusobno ili sa drugim manje reaktivnim vrstama i time izazovu niz lančanih reakcija (Đorđević i sar., 2000). Slobodni radikali se kontinuirano stvaraju u malim količinama u ćelijama kao nusprodukti metabolizma tokom fizioloških procesa: u toku apsorpcije zračenja, kao proizvodi enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze, u oksido-redukcionim procesima u prisustvu metala promenljive valence, kao i u procesima: oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, fagocitoze, biotransformacije supstrata u endoplazmatskom retikulumu, sinteze eikosanoida, lipidne peroksidacije (LPO) nezasićenih masnih kiselina.

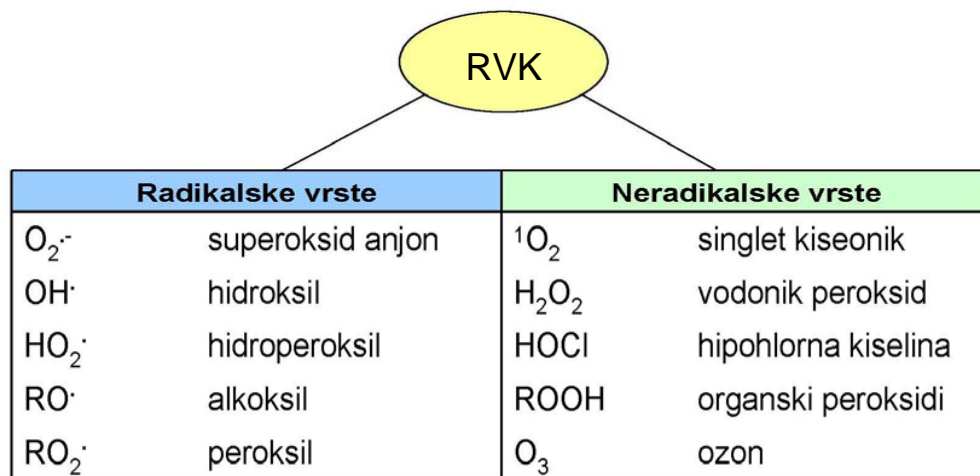
13.1. Reaktivne vrste kiseonika

Razvoj aerobnog života omogućen je prisustvom molekularnog kiseonika (O_2), koji je relativno nereaktivan u molekulskom obliku (Scandalios, 2005). Ono što ograničava oksidativnu moć O_2 je postojanje dva nesparena elektrona sa paralelnim spinom i mogućnost vezivanja samo za strukture koje imaju elektrone sa antiparalelnim spinom. Ipak, dodavanjem elektrona ili transferom energije na O_2 , moguće je otkloniti ovu spinsku restrikciju i povećati reaktivnost kiseonika. Tom prilikom nastaju reaktivne vrste kiseonika (RVK) u koje se ubrajaju SR kiseonika i neradikalske vrste koje funkcionišu kao oksidujući agensi i/ili se lako konvertuju u SR. Nespareni elektroni u spoljašnjoj orbitali odgovorni su za reaktivnost svih radikalskih vrsta kiseonika (Halliwell i Gutteridge, 1999). Fotosenzitivna jedinjenja i strukture koje sadrže flavin mogu da predaju energiju molekulu O_2 i on tada prelazi na više energetska stanje, odnosno u neradikalisku formu singlet kiseonik (1O_2). Ova forma može direktno da prenese energiju na ciljane molekule, kao što su DNK, proteini i lipidi i da ih oksiduje (Scandalios, 2005).

Svi aerobni organizmi koriste O_2 kao krajni akceptor elektrona tokom procesa koji se odvijaju u respiratornom lancu mitohondrija, pri čemu nastaje osnovni energetska molekula adozin trifosfat (ATP), u kom je vezana hemijska energija neophodna za odvijanje svih životnih funkcija (Buonocore i sar., 2010). Tokom procesa respiracije, O_2 se kompletno redukuje do vode dodavanjem četiri elektrona, što se odigrava postupno uz formiranje delimično redukovanih intermedijera. Više od 95 % O_2 unetog u ćeliju prolazi kroz kompletnu redukciju do H_2O , dok parcijalnoj redukciji podleže samo 1-5 % O_2 i transformiše se u RVK (Scandalios, 2005). Jednoelektronskom redukcijom O_2 nastaje superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), dvoelektronskom vodonik peroksid (H_2O_2), a troelektronskom hidroksil radikal (OH^{\cdot}).

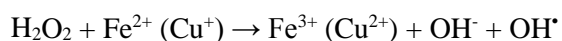
Glavno mesto stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u ćeliji su kompleks I (NADH dehidrogenaza) i kompleks III (citohrom *c* reduktaza) respiratornog lanca mitohondrija. Kompleks I je integralni multiproteinski kompleks unutrašnje membrane mitohondrija koji oksiduje NADH koristeći koenzim Q kao akceptor elektrona, dok kompleks III oksiduje koenzim Q, a kao akceptor elektrona koristi citohrom *c*. Obe reakcije dovode do translokacije protona i formiranja transmembranskog potencijala neophodnog za sintezu ATP, ali tokom ovih reakcija dolazi i do nastanka $O_2^{\cdot-}$. Dejstvom kompleksa I stvoreni $O_2^{\cdot-}$ dospeva isključivo u mitohondrijalni matriks, dok $O_2^{\cdot-}$ koji stvara kompleks III dospeva i u matriks i u citosol (Andreyev i sar., 2005). Znatne količine $O_2^{\cdot-}$ mogu da nastanu i pod dejstvom različitih enzimskih sistema kao što su peroksizomalna ksantin-oksidaza i membranski vezana NADPH-oksidaza (Buonocore i sar., 2010). Pošto je $O_2^{\cdot-}$ konjugovana baza slabe kiseline veoma reaktivnog hidroperoksid radikala (HO_2^{\cdot}), jednoelektronska redukcija O_2 u alkalnim uslovima dovodi do nastanka dva prvenstveno HO_2^{\cdot} , dok je $O_2^{\cdot-}$ dominantan pri nižim pH vrednostima (Scandalios, 2005). Uprkos visokom potencijalu stvaranja, $O_2^{\cdot-}$ kao primarna RVK umereno je reaktivan, ali može da reaguje sa drugim molekulima i stvara sekundarne reaktivne vrste koje su reaktivnije. Tako na primer u reakciji između $O_2^{\cdot-}$ i azot oksida

(NO[•]) nastaje izrazito reaktivni peroksinitrit (ONOO⁻) (Kruidenier i Verspaget, 2002). Različiti primeri radikalskih i neradikalskih RVK prikazani su na *Slici 12*.

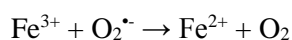
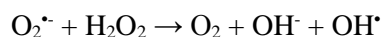


Slika 12. Primeri RVK - modifikovano, Halliwell i Gutteridge, 1999.

Spontanom ili katalizovanom dismutacijom O₂^{-•} dolazi do nastanka H₂O₂, slabo reaktivnog neradikalskog molekula koji lako difunduje kroz membrane. Stvaranje H₂O₂ u ćeliji omogućeno je i dvovalentnom redukcijom O₂ koju katalizuju pojedini enzimi. Umesto neutralizacije do vode, H₂O₂ se može metabolisati mijeloperoksidazom do hipohlorne kiseline (HOCl), koja je 100-1000 puta toksičnija od O₂^{-•} i H₂O₂ (Kruidenier i Verspaget, 2002). Pored toga, H₂O₂ ima sposobnost da reaguje sa delimično redukovanim jonima metala (Fe²⁺ ili Cu⁺) u Fentonovoj reakciji (Valko i sar., 2007):

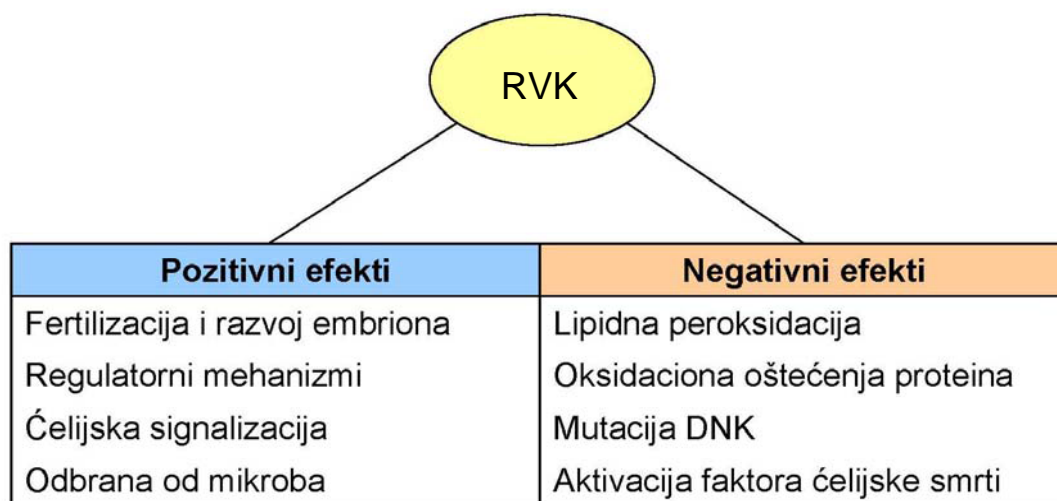


Na taj način formira se izuzetno reaktivan OH[•] koji ima poluživot samo oko 10 sekundi, tako da reaguje blizu mesta formiranja sa praktično svim molekulima, uzrokujući velika oštećenja ćelija. Ovaj najreaktivniji radikal kiseonika može nastati i interakcijom O₂^{-•} i HOCl, Fe²⁺ i HOCl, kao i reakcijom između H₂O₂ i NO[•] (Kruidenier i Verspaget, 2002). Hidroksilni radikal se formira i kad postoji povećano stvaranje O₂^{-•} i H₂O₂ u Haber-Weiss-ovoj reakciji u prisustvu prelaznog metala (Valko i sar., 2007):



Reaktivne vrste kiseonika se konstantno stvaraju tokom aerobnog metabolizma ćelije, kao deo normalnih metaboličkih procesa. Endogeni izvori RVK su mnogobrojne membranske i citosolne oksidoreduktaze, a najveće stvaranje RVK u ćeliji vezano je za mitohondrije (respiratorni lanac), peroksizome i mikrozome (Buonocore i sar., 2010). Takođe, RVK mogu da nastanu i pod dejstvom različitih egzogenih uticaja, kao što su razni biotički i abiotički faktori.

Kao posledica normalne metaboličke aktivnosti prisutne su RVK u svim ćelijskim organelama i kompartmanima. One i pri niskim koncentracijama imaju bitnu ulogu u ćeliji. Međutim, povećano stvaranje RVK uz smanjenu AOS ćelije, može da dovede do oksidativnih oštećenja ćelijskih konstituenata i tako uzrokuje stanje poznato kao oksidativni stres. Pozitivni i negativni efekti RVK prikazani su na *Slici 13*.



Slika 13. Pozitivni i negativni efekti RVK - modifikovano, Buonocore i sar., 2010.

Pri proceni oksidativnog statusa u praksi, kao i u svrhe naučnih istraživanja, mogu se koristiti metode direktnog merenja SR, odnosno indirektno metode, koje obuhvataju merenje enzimskih i neenzimskih parametara AOS, merenje produkata oksidativne modifikacije lipida, proteina i DNK, zatim merenje produkata nitrozilacije i određivanje SR azota, kao i određivanje ukupnog AOS kapaciteta. Smatra se da je za objašnjenje uključenosti SR i oksidativnih oštećenja biomolekula u ispoljavanju toksičnih efekata različitih ksenobiotika, među kojima je i HPZ, neophodno pratiti više različitih parametara. Takođe je neophodna analiza antioksidanata (enzimska ili neenzimska), određivanje sadržaja bioelemenata, praćenje oksidativnih produkata lipida, proteina i DNK, kao i ispitivanja metabolizma gvožđa (Dotan i sar, 2004).

I4. Sistem zaštite od oksidativnih oštećenja

Već je pomenuto da su RVK prisutne u svim kompartmentima ćelije kao rezultat normalne metaboličke aktivnosti. Međutim, pod uticajem različitih faktora, kao što su ekstremne temperature, radijacija, pesticidi, biotoksini ili teški metali, povećava se njihovo nastajanje. Sve ćelijske strukture su potencijalna meta za oksidativna oštećenja i zato su se u ćeliji razvili različiti mehanizmi zaštite od povećane akumulacije RVK: preventivni mehanizmi, reparativni mehanizmi, mehanizmi fizičke odbrane i mehanizmi AOS (Buonocore i sar., 2010).

Sa funkcionalnog aspekta AOS organizma obuhvata tri nivoa delovanja:

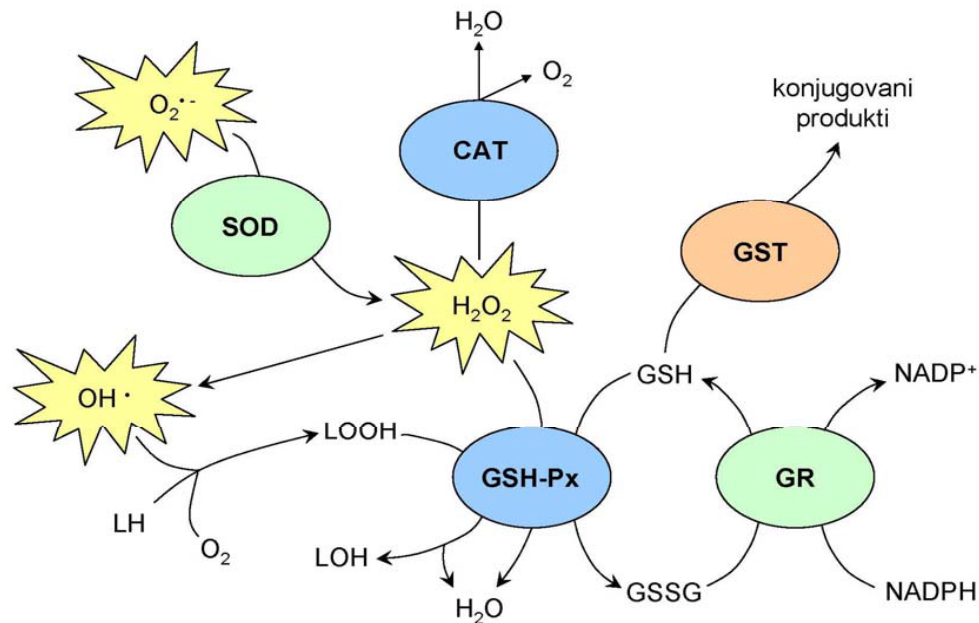
1. Sistemi AOS koji u potpunosti sprečavaju endogeno stvaranje SR i funkcionišu na osnovu prostorne razdvojenosti procesa u kojima se stvaraju SR.

2. Angažovanje sistema u uslovima pojačanog stvaranja SR, koji se prema prirodi i načinu delovanja mogu podeliti na enzimске – primarni sistemi prve linije AOS (katalaza-CAT, peroksidaza-GPx, glutation reduktaza-GR, glutation S – transferaza) i neenzimske - predstavljaju sekundarnu liniju odbrane (vitamini E i C, tiolova jedinjenja – glutation, lipoinjska kiselina, metionin, cistein, zatim koenzim Q, albumin, bilirubin, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja biljnog porekla). Neenzimski antioksidanti se prema afinitetu i rastvorljivosti u lipidima dele na lipo- i hidrosolubilne. Farmakološki aktivne supstance (nesteroidni antiinflamatorni lekovi, blokatori Ca^{2+} , alopurinol, N-acetilcistein, ACE inhibitori, desferoksamin), takođe ostvaruju neenzimsku AOS preko različitih mehanizama.

3. Enzimski antioksidanti koji učestvuju u reparaciji nastalog oksidativnog oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina (endo- i egzonukleaze, DNK-ligaze, DNK polimeraze, klasična i fosfolipid-zavisna GPx, fosfolipaza A_2 , razni proteolitički enzimi, metionin-sulfoksid-reduktaza, glikozilaze i drugi (Cadenas, 1989; Žikić i sar., 2000; Stajin i sar., 2007).

I4.1. Enzimska antioksidativna zaštita

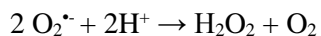
Prema jednoj od klasifikacija sistema zaštite od oksidativnih oštećenja, u enzimске komponente primarne AOS ubrajaju se enzimi superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation reduktaza (GR) i glutation-peroksidaza (GPx) (Van der Oost i sar., 2003).



Slika 14. Enzimske komponente sistema zaštite od oksidativnih oštećenja - modifikovano, Matović i sar., 2004.

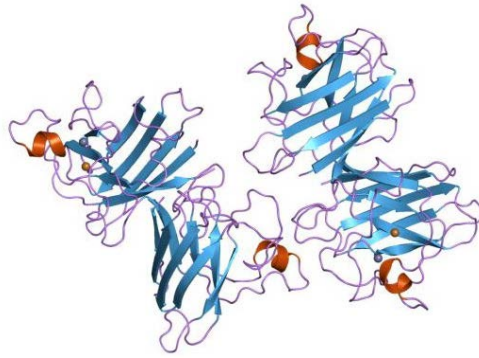
14.1.1. Superoksid-dizmutaza (SOD)

Superoksid-dizmutaza (SOD, EC 1.15.1.1) predstavlja prvu liniju odbrane od RVK i ima ključnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidativnih oštećenja. To je metaloprotein (sa redoks aktivnim metalom) koji prevodi visoko reaktivni radikal $O_2^{\bullet-}$ u manje reaktivnu vrstu kiseonika H_2O_2 i molekularni O_2 prema jednačini:



Tokom evolucije nastalo je više klasa enzima SOD, što je povezano sa dostupnošću različitih metala u biosferi u određenim geološkim erama (Alscher i sar., 2002). Na osnovu metala koji je prisutan u aktivnom centru enzima, kao i lokacije u ćeliji, opisane su tri izoforme SOD kod sisara:

- Superoksid-dizmutaza koja sadrži bakar cink (Cu, Zn SOD) – nalazi se u citosolu eukariotskih ćelija (Alscher i sar., 2002). Svaka subjedinica enzima sadrži po jedan atom redoks aktivnog metala Cu^{2+}/Cu^+ i jedan atom Zn^{2+} koji ima strukturnu ulogu. Aktivno mesto svake subjedinice funkcioniše nezavisno. To je prva identifikovana forma SOD, poznata pod nazivima hemokuprein, hepatokuprein, cerebropuprein i eritropuprein. Cu, Zn SOD je kod sisara pronađena u citoplazmi, jedru, endoplazmatičnom retikulumu, mitohondrijama i lizozomima, homodimer je i ima molekulsku masu od 32 kDa. Lokalizovana je na hromozomu 21 kod čoveka, hromozomu 1 kod govečeta, hromozomu 9 kod majmuna i hromozomu 16 kod miša (Zelko i sar., 2002).



Slika 15. Struktura Cu, Zn SOD

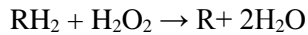
- Superoksid-dizmutaza koja sadrži mangan (Mn SOD) – prisutna je kod prokariota i u mitohondrijama i peroksizomima eukariota kao homodimerna ili homotetramerna izoforma, sa jednim atomom Mn^{3+}/Mn^{2+} po subjedinici (Alscher i sar., 2002). Kod sisara Mn SOD je homotetramerni mitohondrijski protein, a molekulska masa svake subjedinice iznosi 23 kDa. Ova izoforma obezbeđuje vitalnu zaštitu protiv RVK nastalih hiperoksijom i ima glavnu ulogu u ćelijskoj diferencijaciji i genezi tumora. Gen za Mn SOD nalazi se na hromozomu 6 kod čoveka, a na hromozomu 17 kod miša (Zelko i sar., 2002).

- Ekstracelularna superoksid-dizmutaza (EC SOD) – je ekstracelularni homotetramer molekulske mase od 135 kDa. Pronađena je isključivo kod sisara i ima jedinstvenu strukturu. To je glikoprotein koji se prvenstveno nalazi u intersticijalnom matriksu tkiva i glikokaliksi, gde je vezan za heparan sulfat proteoglikane. U manjoj količini pronađena je i u ekstracelularnim tečnostima, kao što su plazma, limfa, sinovijalna i cerebrospinalna tečnost (Alscher i sar., 2002). Ekstracelularna SOD je poslednja otkrivena i najmanje proučena forma enzima SOD. Iako u katalitičkom centru ima Cu i Zn, smatra se da je divergirala od Cu, Zn SOD u ranim fazama evolucije (Bafana i sar., 2011). Gen za SOD je lokalizovan na hromozomu 4 kod čoveka, dok se kod miša nalazi na hromozomu 5 (Zelko i sar., 2002).

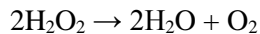
14.1.2. Katalaza (CAT)

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je jedan od najefikasnijih enzima u živom svetu. Osnovna uloga ovog antioksidativnog enzima je razlaganje neradikalnog H_2O_2 do H_2O , čime se sprečava njegova difuzija u druge delove ćelije. Zbog svoje široke distribucije, evolutivne očuvanosti i brze aktivnosti, CAT ima važnu ulogu u sistemima koji su se razvili u aerobnoj sredini. Katalaza je homotetramer, molekulske mase od 240 kDa, koji u aktivnom centru ima gvožđe Fe^{3+} vezano za porfirin hem grupu enzima (Scandalios, 2005).

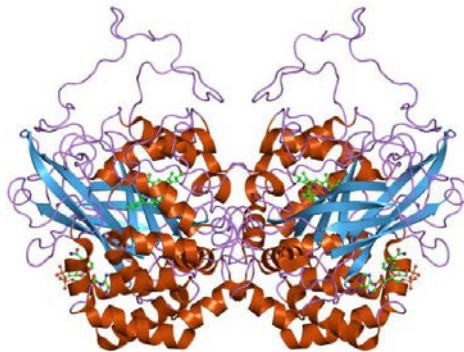
Pri niskim koncentracijama H_2O_2 ($< 1 \mu\text{M}$) CAT pokazuje peroksidaznu reakciju i redukuje H_2O_2 koristeći različite donore vodonika (alkoholi, askorbinska kiselina):



Pri visokim koncentracijama supstrata ($> 1 \mu\text{M}$), CAT brzo uklanja H_2O_2 kroz katalaznu reakciju, gde je H_2O_2 i donor i akceptor vodonika:



Ovaj proces je energetski veoma efikasan, jer se u katalaznoj reakciji ne koriste redukujući ekvivalenti. To je značajno kada je povećana energetska potreba ćelije, odnosno kada je povećan intenzitet kataboličkih procesa i respiracije. Na taj način formira se veća količina H_2O_2 , koji uspešno uklanja CAT na energetski povoljan način (Scandalios, 2005). Katalaza ne može da bude saturisana svojim supstratom H_2O_2 bez obzira na njegovu koncentraciju, tako da enzimski aktivnost raste linearno sa porastom koncentracije H_2O_2 (Kruidenier i Verspaget, 2002).

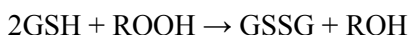
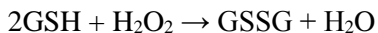


Slika 16. Struktura CAT

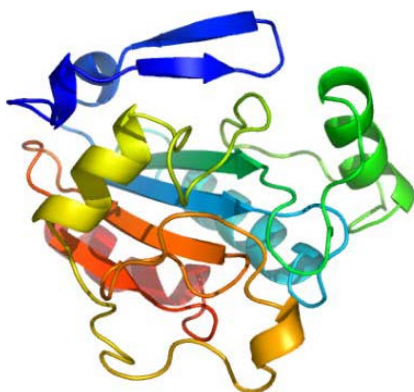
U eukariotskim ćelijama CAT se predominantno nalazi u peroksisomima, a prisutna je i u citosolu i mitohondrijama (Scandalios, 2005). Mnogi peroksisomalni enzimi, uključujući i enzimski sistem za β -oksidaciju masnih kiselina, dovode do stvaranja velike količine H_2O_2 . Zbog toga je uloga CAT u ovim organelama od presudnog značaja za zaštitu ćelije od oksidativnih oštećenja (Fidaleo, 2010). Humani gen za CAT nalazi se na hromozomu 11, a najveći nivo katalazne aktivnosti kod sisara prisutan je u jetri (Ilyukha, 2001).

14.1.3. Glutation peroksidaza (GPx)

Glutation peroksidaza (GPx, EC 1.11.1.9) predstavlja bitan enzim sistema zaštite od oksidativnih oštećenja. Kod eukariotskih organizama nalazi se u različitim ćelijskim kompartmentima, kao što su citosol, mitohondrije, peroksizomi i intermembranski prostor i prisutna je u gotovo svim ćelijama. Katalizuje redukciju H_2O_2 u H_2O i organskih hidroperoksida (ROOH) u alkohole (ROH), pri čemu kao kofaktor koristi glutation:



Glutation peroksidaza ima veći afinitet za H_2O_2 u odnosu na CAT, tako da ima važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama H_2O_2 , dok je CAT značajniji enzim u uslovima izrazitog oksidativnog stresa (Kruidenier i Verspaget, 2002).



Slika 17. Struktura Se GPx

Opisane su tri forme ovog enzima:

- selen-zavisna glutation peroksidaza (Se GPx) – je homotetramer i sadrži Se u formi selenocisteina u svakoj subjedinici;
- selen-nezavisna glutation-peroksidaza (non-Se GPx) – je monomer koji ima manji afinitet za H_2O_2 , a efikasno redukuje organske peroksidge i zahteva visoku koncentraciju glutationa;
- fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza (PH GPx) – je monomerni selenoenzim koji redukuje H_2O_2 , fosfolipidne hidroperoksidge i peroksidge holesterola. To je jedini enzim koji redukuje membranske fosfolipidne hidroperoksidge, prekida proces LPO i tako ima ključnu ulogu u ćelijskom sistemu zaštite od RVK (Andreyev i sar., 2005). Molekulska masa jednog monomera GPx iznosi oko 20 kDa (Maiorino i sar., 1998; Arenas i sar., 2010).

Kod sisara je detektovano pet izoformi GPx koje imaju različitu tkivnu distribuciju:

- klasična GPx (cGPx, GPx 1) – je prvi identifikovani selenoprotein i nalazi se na hromozomu 3 kod čoveka. Ova izoforma je homotetramer i prisutna je u citosolu svih ćelija. Redukuje H₂O₂ i lipidne hidroperoksida, a ima ulogu i u skladištenju i transportu Se.

- gastrointestinalna GPx (GPx 2) – obezbeđuje zaštitu od toksičnosti lipidnih hidroperoksida koji su uneti hranom. Ova izoforma je najvažniji selenoproteinski antioksidant u debelom crevu i omogućava rani odbrambeni odgovor u borbi protiv kancera debelog creva.

- ekstracelularna GPx (GPx 3) – je selenoprotein detektovan u plazmi i bubrezima i ima ulogu u AOS ekstracelularnog kompartmenta (Brown i Arthur, 2001).

- fosfolipid hidroperoksid GPx (PH GPx, GPx 4) – je monomer koji ima bitnu funkciju u reduktivnoj destrukciji lipidnih hidroperoksida, malih rastvorljivih hidroperoksida, hidroperoksida holesterola i holesterolskih estara. Nivo enzima GPx 4 nizak je u jetri, plućima i bubrezima, a visok u testisima gde učestvuje u sazrevanju spermatozoida. Za razliku od ostalih formi GPx, ova izoforma pokazuje nizak nivo reakcije sa glutationom (Maiorino i sar., 1998).

- GPx 5 – je selen nezavisna GPx i detektovana je u epididimisu kod velikog broja sisara (Chabory i sar., 2009).

14.1.4. Glutation-reduktaza (GR)

Glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) je detektovana kod svih organizama. Prisutna je u prokariotskim ćelijama i u citosolu i mitohondrijama eukariotskih ćelija (Ondarza i sar., 1983). Ovaj antioksidativni enzim katalizuje reakciju koja je esencijalna za stabilnost i integritet ćelije, jer prevodi oksidovani glutation (GSSG) u redukovanu glutation (GSH), pri čemu kao redukujući ekvivalent koristi NADPH:



Enzim GR je homodimerni flavoprotein koji u aktivnom centru ima redoks aktivan disulfid. Svaka subjedinica ima molekulsku masu od oko 55 kDa i sadrži prostetičku grupu flavin adenin dinukleotid (FAD). Dimerna priroda enzima neophodna je za njegovu funkciju, jer obe subjedinice učestvuju u formiranju aktivnog centra enzima. Kod nekih organizama pronađeni su i tetrameri, pa i veće forme enzima. Katalitički ciklus GR ima dve faze, prvo NADPH redukuje FAD, pri čemu se redukujući ekvivalent prenosi na redoks aktivan disulfid, a zatim dolazi do redukcije GSSG u aktivnom centru enzima (Ulus i Tandoğan, 2007).



Slika 18. Struktura GR

Redukovani glutation učestvuje u velikom broju enzimskih i neenzimskih reakcija koje su od presudnog značaja za funkcionisanje ćelije, pri čemu prelazi u svoju oksidovanu GSSG formu. Enzim GR je zaslužan za održavanje pula glutationa uglavnom u redukovanom stanju, tako da ima značajnu ulogu u regulaciji redoks homeostaze u ćeliji (Dickinson i Forman, 2002).

14.2. Neenzimski antioksidativni sistem

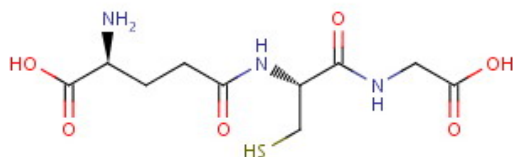
U neenzimske komponente sistema zaštite od oksidativnih oštećenja ubrajaju se različita hidrosolubilna i liposolubilna jedinjenja. Najviše proučavane hidrosolubilne neenzimske komponente sistema zaštite od oksidativnih oštećenja su glutation, L-askorbinska kiselina (vitamin C), mokraćna kiselina, albumin, transferin, bilirubin, poliamini, a liposolubilne retinol (vitamin A), β -karoten (provitamin A), α -tokoferol (vitamin E) i ubihinon (koenzim Q).

Među neenzimskim antioksidantima, značajno mesto pripada i metalotioneinima (MT). Ovi proteini male molekulske mase učestvuju u regeneraciji tkiva i regulišu ekspresiju gena, što sve doprinosi zaštiti od toksičnih efekata ksenobiotika (Cherian i Kang, 2006). Takođe, s obzirom da učestvuju u odbrani organizma od toksičnog dejstva SR, štite ćelije i od oksidativnih oštećenja izazvanih antipsihoticima. U molekulu MT, cistein-tiolatne grupe vezuju se sa jonima metala i grade metal-tiolatne grupe koje reaguju sa $O_2^{\cdot-}$ i OH^{\cdot} . Smatra se da MT imaju izraženu sposobnost uklanjanja OH^{\cdot} radikala, dok im je uloga u "neutralisanju" $O_2^{\cdot-}$ manja u poređenju sa SOD (Thornalley i Vasak, 1985). Pokazano je da molekuli MT ostvaruju antioksidativnu ulogu i neutralisanjem reaktivnih vrsta azota (RVA), koje se vezuju za cistein-tiolatne grupe MT i daju S-nitrozo-tiole (Misra i sar., 1996).

14.2.1. Glutation

Tripeptid glutation (L- γ -glutamil-L-cistenil-glicin) je niskomolekulska tiolna jedinjenja, koje čini 90 % ukupnih neproteinskih sulfhidrilnih jedinjenja ćelije (Parris i Kidd, 1997). Glutation učestvuje u brojnim metaboličkim aktivnostima ćelije, uključujući AOS, detoksifikaciju različitih ksenobiotika, održavanje proteinske strukture i funkcije, regulaciju sinteze i degradacije proteina, metabolizam leukotriena i prostaglandina, redukciju ribonukleotida do dezoksiribonukleotida, regulaciju ćelijskog ciklusa i gensku ekspresiju (Dickinson i Forman, 2002).

U većini ćelija glutacion se nalazi u milimolarnoj koncentraciji, u citosolu je prisutan u koncentraciji od 1-11 mM, u jedru 3-15 mM, a u mitohondrijama od oko 5-11 mM (Valko i sar., 2007). Ekstracelularni nivo glutaciona je nizak i njegova koncentracija iznosi nekoliko μ M (Schafer i Buettner, 2001).



Slika 19. Struktura glutaciona

U γ -glutamilskom ciklusu, glutation se sintetiše iz glutamata, cisteina i glicina uzastopnim dejstvom γ -glutamilcistein-sintetaze (γ -GCS) i glutation sintetaze (GS). Za ove reakcije potrebna su dva molekula ATP. Njihovom hidrolizom obezbeđuje se potrebna energija pri čemu se karboksilna grupa aktivira za sintezu peptidne veze stvaranjem acil-fosfatnog intermedijera. Degradacija glutaciona do amino kiselina iz kojih se sastoji, odigrava se katalitičkim dejstvom više enzima: γ -glutamil transpeptidaze, γ -glutamil ciklotransferaze, 5-oksoprolinaze i intracelularne proteaze. Glutacion omogućava transport amino kiselina u γ -glutamilskom ciklusu kroz ćelijsku membranu u bubrezima. Glutacion se najpre transportuje na spoljašnju stranu membrane gde se amino kiselina (AK) koja se unosi u ćeliju vezuje za glutacion i nastaje γ -glutamil-aminokiselinski-dipeptid (Anderson i Meister, 1983). U ovoj reakciji stvara se peptidna veza između α -amino-grupe i γ -glutamil ostatka glutaminskog dela glutaciona.

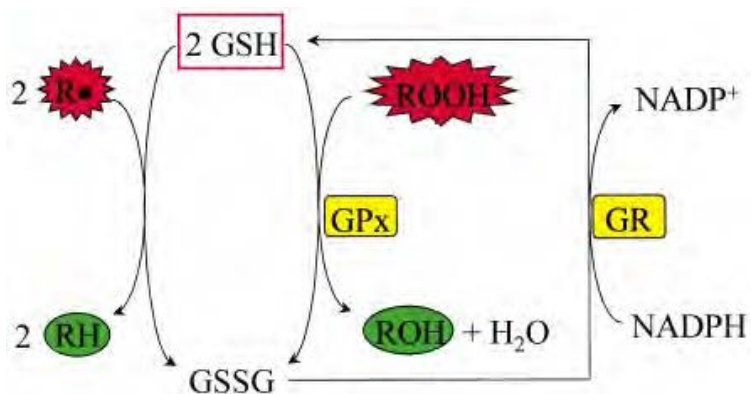


Reakciju katalizuje enzim γ -glutamil-transpeptidaza. Kompleks γ -glutamil-aminokiselina prolazi kroz membranu i ulazi u citosol ćelije. Za ovaj proces neophodni su enzimi koji oslobađaju aminokiselinu

iz ovog kompleksa i resintetišu glutation održavajući potreban nivo njegove koncentracije u ćeliji. Iz γ -glutamil-aminokiselinskog kompleksa oslobađa se transportovana amino kiselina i 5-oksoprolin kao intermedijer. Poslednji stepen predstavlja hidroliza 5-oksoprolina, koja se vrši u prisustvu ATP dejstvom 5-oksiprolinaze (Trayhurn i van Heyningen, 1973).

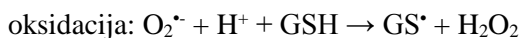
U ćeliji postoji citoplazmatski i mitohondrijski put metabolisanja glutationa. Intracelularna koncentracija glutationa regulisana je preko aktivnosti enzima uključenih u sintezu, zatim preko dostupnosti aminokiselina, posebno cisteina, intenziteta trošenja u procesu detoksikacije u ćeliji kao i preraspodelom glutationa između organa (Bannai, 1991).

Glutation se u ćelijama nalazi kao učesnik metabolizma, transporta i zaštite u ćeliji. Uključen je u redukciju disulfidnih i drugih molekula, kao i konjugaciju sa jedinjenjima egzogenog i endogenog porekla. Na taj način on štiti ćeliju od štetnog dejstva slobodnih kiseoničnih radikala. Najvažnija uloga glutationa je da kao tiolno jedinjenje deluje kao antioksidant u ćeliji, što se ostvaruje direktnim uklanjanjem SR kroz neenzimsku reakciju, glutation zavisnom redukcijom H_2O_2 i drugih hidroperoksida uz GPx i detoksikacijom ksenobiotika i elektrofila uz glutation S-transferazu (Parke i Sapota, 1996).



Slika 110. Shematski prikaz funkcije glutationa kao antioksidanta

Zbog prisutne reaktivne SH grupe iz molekula, glutation spada među osnovne učesnike u ćelijskom AOS. Atom sumpora u SH grupi se lako prilagođava gubitku jednog elektrona i dužina života tiol radikala može biti dosta duža od života drugih SR.



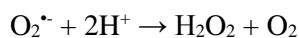
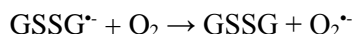
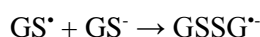
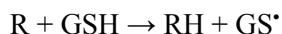
Pri određenim fiziološkim pH uslovima, SH grupe se mogu delimično jonizovati, stvarajući na taj način tiolatni anjon koji je reaktivniji nukleofil i odgovoran je za reakcije tiola u metabolizmu

ksenobiotika. U toku oksidativnog stresa, reakcije SH grupa uključuju slučajeve u kojima su važni i sumporni radikali i tiolatni anjoni (Dlugosz i sar., 2009).

Glutation je jedan od najmoćnijih antioksidanata, ali je i regulator drugih antioksidanata. Nivo glutaciona u toku starenja opada zbog povećanog unosa polinezasićenih i delimično hidrogenizovanih biljnih masti i preterane izloženosti toksičnim supstancama kao što su lekovi i pesticidi (Anderson i Meister, 1980).

U AOS sistemu zaštite glutacion funkcioniše na više nivoa. Pored toga što je kofaktor pojedinih antioksidativnih enzima, glutacion direktno uklanja slobodne radicalske vrste $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} i $ONOO^{\cdot}$, kao i lipidne radikale i hidroperokside, regeneriše važne neenzimske antioksidante (askorbinsku kiselinu, α -tokoferol) do njihovih aktivnih formi, uključuje se u direktnu popravku oksidativnih oštećenja molekula DNK i sprečava apoptozu izazvanu RVK i citokinima (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Glutation može da učestvuje u AOS u neenzimskim reakcijama, zahvaljujući sposobnosti da reaguje sa organskim radikalima (R^{\cdot}) i tako zajedno sa SOD sprečava oksidativna oštećenja:



Glutation je jedan od značajnih liganada koji vezuju metale, tako da ima važnu ulogu u transportu, deponovanju i metabolizmu metala. Sulfhidrilna grupa cisteina u molekulu glutaciona ima visok afinitet za metale i formira merkaptide sa nekoliko endogenih metala, kao što su živa, kadmijum, bakar, selen, hrom, olovo i cink. Jedna od važnih uloga glutaciona je skladištenje i transport cisteina, koji se brzo autooksiduje u cistin, čime se stvaraju toksični radikali kiseonika. Da bi se sprečila toksičnost ove autooksidativne reakcije, većina neproteinskog cisteina se nalazi u formi glutaciona (Wang i Ballatori, 1998).

Glutation postoji u dve forme, redukovanoj tiolnoj GSH formi i oksidovanoj disulfidnoj GSSG formi (Parris i Kidd, 1997). Ključni funkcionalni element molekula glutaciona je aminokiselina cistein, koja poseduje reaktivnu SH grupu i odgovorna je za mnoge funkcije glutaciona. Pri normalnim fiziološkim uslovima, više od 98 % intracelularnog glutaciona je u redukovanom stanju, dok je ostatak prisutan u ćeliji u vidu disulfidne forme GSSG, mešanih disulfida (uglavnom GSS-protein) i tioestara (Wang i Ballatori, 1998). Oksidovani glutacion u normalnim okolnostima čini manje od 1 % ukupnog glutaciona, dok u stanju oksidativnog stresa dolazi do povećanja koncentracije GSSG (Brigelius-Flohe, 1999). Odnos GSH i GSSG odražava redoks status ćelije od kojeg zavisi smer mnogih ćelijskih reakcija

(Buonocore i sar., 2010). Ravnoteža GSH i GSSG u ćeliji reguliše određene metaboličke puteve preko aktivacije ili inaktivacije važnih enzima koji poseduju funkcionalne SH grupe. Tako glutation koji je prisutan u jedru održava redoks status SH grupa proteina koji su neophodni za DNK reparaciju i ekspresiju (Valko i sar., 2007).

Unutarćelijski sadržaj glutaciona zavisi od balansa između njegovog korišćenja i sinteze. Glutacion je redukujući ekvivalent u redukciji H_2O_2 i lipidnih hidroperoksida pod dejstvom antioksidativnog enzima GPx i konjugujući je molekul u reakciji sa enzimom faze II biotransformacije GST koja olakšava ekskreciju ksenobiotika. Obe ove reakcije dovode do stvaranja oksidovane forme glutaciona (GSSG). Enzim GR konvertuje GSSG u GSH uz prisustvo redukovanog NADPH koji se obezbeđuje iz glukozomonofosfatnog ciklusa. Glukozo-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) stvara NADPH, molekul koji je esencijalan za funkcionisanje mnogih antioksidativnih enzima (Halliwell i Gutteridge, 1999; Almroth, 2008).

Pored aktivnosti enzima GR, koncentracija glutaciona u ćeliji regulisana je i *de novo* sintezom, koja se odigrava u citosolu svih ćelija, dok je jetra glavno mesto biosinteze ovog jedinjenja (Wang i Ballatori, 1998; Griffith, 1999).

De novo sinteza glutaciona regulisana je nivoom γ -GCS koja je prisutna u ćeliji, dostupnošću supstrata i povratnom spregom glutaciona na γ -GCS. Intracelularni nivoi aminokiselina variraju s obzirom na vrstu organizma i tkivo, ali nivo L-cisteina je konstantno niži u odnosu na nivoe L-glutamata i glicina, tako da je dostupnost L-cisteina osnovni ograničavajući faktor za sintezu glutaciona (Griffith, 1999). Sintaza glutaciona zahteva ATP, tako da i ovaj supstrat može da bude još jedan faktor ograničenja. Nedostatak glukoze povezan je sa niskim nivoom glutaciona, jer ATP može ograničiti sintezu glutaciona kada je narušen energetskei metabolizam ćelije (Papadopoulos i sar., 1997).

Eritrociti predstavljaju svojevrsan transportni sistem za glutacion i njegove konjugate (Dass i sar., 1992). U procesu konjugacije sa glutacionom vrši se ekskrecija konjugata u plazmu, odakle se ova jedinjenja preko žuči ili urina izlučuju u spoljašnju sredinu.

U bubregu se glutacion aktivno i sintetiše i sekretuje (Bellomo i sar., 1992). Pored bubrega, u resintezi i međuorganskom protoku glutaciona učestvuju i pluća i epitel intestinalnog trakta. U uslovima pokrenutog oksidativnog stresa, intenzivnija je ekskrecija glutaciona iz jetre u perifernu krv, čime se obezbeđuje dostupnost glutaciona za druge organe (Cao i sar., 2005).

Iako se glutacion sintetiše u ćeliji, njegova biodegradacija odigrava se van ćelije. Glutacion poseduje specifičnu γ -karboksilnu peptidnu vezu između glutamata i cisteina, koju može da raskine samo γ -glutamyltranspeptidaza, koja se nalazi na spoljašnjoj površini membrane određenih ćelijskih tipova i to uglavnom na apikalnoj površini epitelnih tkiva. Vezu između cisteina i glicina raskidaju dipeptidaze, koje se takođe nalaze na spoljašnjoj površini ćelijskih membrana. Produkti razgradnje, aminokiseline glutamat,

glicin i cistein, mogu da se reapsorbuju u ćeliju za ponovnu sintezu glutaciona. Konjugate glutaciona metabolizuju isti degradativni enzimi koji metabolizuju glutation. Glutamat i glicin se reapsorbuju u ćeliju, a cistein S-konjugati se intracelularno acetiluju do odgovarajuće merkapturne kiseline, a zatim se ekskretuju iz organizma ili podležu daljem metabolizmu (Wang i Ballatori, 1998).

14.2.2. Sulfhidrilne (SH) grupe

Svako organsko jedinjenje koje sadrži SH grupu vezanu za ugljenik naziva se tiol (R-SH). Funkcionalna SH grupa aminokiseline cistein ima najvažniju ulogu u živim sistemima. Osim najzastupljenijeg niskomolekuskog tiola u ćeliji, glutaciona, veliki broj proteina sadrži aminokiselinu cistein koja zbog postojanja funkcionalne SH grupe može da bude modifikovana kroz različite redoks reakcije (Di Simplicio i sar, 2003).

Određena reverzibilna modifikacija cisteina pod biološkim uslovima dovodi do jedinstvenog funkcionalnog odgovora proteina. Promena konformacije proteina može da dovede do promene enzimske aktivnosti i aktivnosti transportera, da utiče na vezivanje liganada za receptore, a može da izazove i međuproteinske interakcije, protein-DNK interakcije i dovede do degradacije proteina (Sun i sar., 2012). Svi aspekti života zavise od redoks reakcija, jer većina proteina sadrži najmanje jednu ovakvu aminokiselinu podložnu reverzibilnoj oksidaciji. Sulfhidrilne grupe proteina su molekularni okidači sposobni da obrade redoks signal u jedinstven funkcionalni odgovor (Kemp i sar., 2008).

Redoks modifikacija SH grupa proteina obuhvata različite reakcije, kao što su nitrozilacija (S-NO), hidroksilacija (S-OH), glutationilacija (S-SG) i formiranje proteinskih disulfida (S-S). Nitrozilacija SH grupa igra važnu ulogu u procesu prenosa signala sa površine ćelije u intracelularne kompartmente, kao što su jedro i mitohondrije. Hidroksilacija proteina može da dovede do dalje oksidacije u štetne sulfinske (SO₂H) i sulfonske (SO₃H) kiseline. Glutacionilacija predstavlja zaštitni mehanizam koji učestvuje u prevenciji formiranja ovih kiselina, ali ima i regulatornu funkciju u aktivnosti proteina (Kalinina i sar., 2010).

Mnogi proteini su aktivni kada su SH grupe koje su ključne za njihovo funkcionisanje u redukovanoj, tiolnoj formi, dok je za druge potrebno da budu u oksidovanoj, disulfidnoj formi. Tiol-disulfidne promene su bidirekzione, tako da je njihova ravnoteža određena ćelijskim redoks statusom (Schafer i Buettner, 2001).

Redoks par GSH/GSSG čini veliki pul redukujućih ekvivalenata u ćeliji, pa se redoks stanje ovog para koristi kao indikator redoks okruženja ćelije. Oksidovani glutation reaguje sa proteinima (R-SH) pri čemu nastaju protein-GSH mešani disulfidi (glutationilovani proteini, R-SSG), dok u slučaju reakcije sa dve SH grupe proteina nastaju disulfidni mostovi, pri čemu su obe reakcije reverzibilne (Dickinson i Forman, 2002).

Nivo protein-GSH mešanih disulfida u ćeliji iznosi oko 1 %, ali se u slučaju oksidativnog stresa taj nivo povećava. Smisao glutacionilacije je zaštita cisteinskih rezidua od dalje oksidacije proteina. Proteinska glutacionilacija može da utiče i na enzimsku aktivnost, što ukazuje na dodatnu regulatornu ulogu ovog procesa (Netto i sar., 2007).

Pored glutaciona, u regulaciju metabolizma SH grupa u ćeliji uključeni su i tiolni proteini koji funkcionišu kao ditiol/disulfid oksido-reduktaze. Regulatorni enzimi koji imaju važnu ulogu u redoks kontroli i funkcionisanju bitnih SH grupa su tioredoksin, glutaredoksin i protein disulfid izomeraza. Tioredoksin i glutaredoksin imaju ditiol/disulfid grupu u aktivnom centru, funkcionišu kao disulfid reduktaze i katalizuju redukciju disulfidnih mostova ciljnih proteina kroz reakciju ditiol/disulfid razmene (Pirazzini i sar., 2014).

Tioredoksin i glutaredoksin redukuju niz različitih proteina u ćeliji, pri čemu glutaredoksin može da katalizuje i redukciju protein-GSH mešanih disulfida (deglutacionilacija proteina). Disulfidni tioredoksin vraća se u aktivnu formu preko NADPH zavisnog enzima tioredoksin reduktaze, a glutaredoksin se redukuje drugim molekulom glutaciona (Janssen-Heininger i sar., 2008). Dok tioredoksin i glutaredoksin redukuju SH grupe, protein disulfid izomeraza uglavnom stvara disulfidne mostove u proteinu, takođe kroz proces ditiol/disulfid razmene (Netto i sar., 2007). Kako odgovor ćelije na stres podrazumeva promenu u koncentraciji slobodnih SH grupa, ovaj parametar određuje nivo oksidacije proteina i drugih tiola u ćeliji i predstavlja dobar biomarker oksidativnog stresa (Kovačević i sar., 1996)

15. Oksidativna modifikacija biomolekula

15.1. Lipidna peroksidacija

Najizraženiji negativni efekat delovanja SR je oksidacija višestruko nezasićenih masnih kiselina sadržanih u ćelijskim membranama, poznata kao LPO, tokom koje dolazi do oštećenja plazma membrane. Krajnji proizvod LPO je malondialdehid (MDA), biohemijski marker stepena oksidativnog oštećenja ćelijskih membrana (Ayala i sar., 2014).

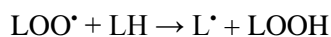
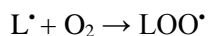
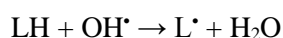
Lipidi su estri viših masnih kiselina i glicerola. To je heterogena grupa jedinjenja koja u organizmu ima nekoliko važnih uloga: važan su izvor energije, konstituenti su membrana i nervog tkiva, termički su i električni provodnici, itd. (Loewen, 2012).

Polinezasićene masne kiseline fosfolipidnog dvosloja ćelijskih membrana predstavljaju glavne ciljne molekule za RVK. Najreaktivniji SR kiseonika, OH^{\bullet} , započinje proces LPO koji se zatim nastavlja nizom lančanih reakcija do formiranja lipidnih hidroperoksida i aldehida. Akumulacija hidroperoksida u plazma membrani i membranama organela dovodi do promene fluidnosti membrane i tako utiče na aktivnost transmembranskih enzima, transportera, receptora i drugih membranskih proteina. Krajnji

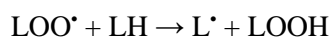
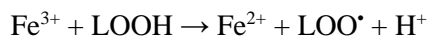
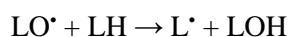
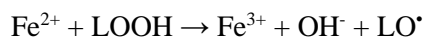
rezultat LPO je promena propustljivosti membrane, što dovodi do narušavanja ćelijskog metabolizma, poremećaja homeostaze, odnosno do ćelijske smrti (Kruidenier i Verspaget, 2002).

U procesu oksidacije lipida, nezasićene masne kiseline podležu oksidativnom oštećenju, pri čemu su SR inicijatori i terminatori procesa LPO (naročito $O_2^{\cdot -}$) (McCord i Frinovich, 1969).

Proces LPO započinje preuzimanjem vodonikovog atoma nezasićene masne kiseline lipida (LH) od strane inicijatornog radikala (OH^{\cdot}), što dovodi do nastanka lipidnog radikala (L^{\cdot}). On u reakciji sa O_2 prelazi u izrazito reaktivan lipidni peroksil radikal (LOO^{\cdot}), koji zatim preuzima vodonikov atom sa susednog lipida i formira lipidni hidroperoksid (LOOH). Novonastali L^{\cdot} radikal interaguje sa drugim susednim lipidom u lančanoj reakciji koja dovodi do akumulacije oštećenih lipida (Catalá, 2006):



Produkt LPO (LOOH) u reakciji sa redukovanim metalima (Fe^{2+}) dovodi do nastanka lipidnog alkoksil radikala (LO^{\cdot}). On može da interaguje sa drugim lipidom, pri čemu se formiraju L^{\cdot} i lipidni aldehid (LOH). Takođe, LOOH može da interaguje sa oksidovanim metalima (Fe^{3+}) formirajući LOO^{\cdot} . Novonastali lipidni radikali iniciraju dodatne lančane reakcije (Fagali i Catalá, 2009):



LOOH su nestabilni, razlažu se i formiraju veoma reaktivna aldehidna jedinjenja, koja su znatno stabilnija od RVK i lako difunduju u ćelijski medijum. Najpoznatiji toksični aldehidni produkti LPO su 4-hidroksi-2-noneal (HNE) i MDA, koji se koristi kao biomarker LPO (Valko i sar., 2007; Buonocore i sar., 2010).

15.2. Oksidativna modifikacija DNK

Reaktivne vrste kiseonika mogu da reaguju sa svim komponentama DNK molekula (purinske i pirimidinske baze, dezoksiribozna osnova) i dovedu do različitih oštećenja DNK (jednolančani i dvolančani prekidi, modifikacija purinskih i pirimidinskih baza i dezoksiriboze, delecija, mutacija i translokacija, unakrsna povezivanja u okviru jednog ili oba lanca DNK, kao i unakrsna povezivanja DNK

i proteina). Jedno od oštećenja nastaje modifikacijom purinske baze guanozina i formiranjem 8-hidroksiguanozina (8-OH-G), koji predstavlja biomarker oksidativnog stresa. Rezultat ovog procesa je zamena guanozin-citozin (GC) baznog para u timin-adenin (TA) bazni par nakon dva replikaciona ciklusa. Oštećenja DNK pod dejstvom različitih RVK sprečavaju indukciju transkripcije, dovode do grešaka u replikaciji i genomske nestabilnosti, što predstavlja prvi korak u procesu mutageneze, karcinogeneze i starenja (Halliwell i Gutteridge, 1999; Buonocore i sar., 2010).

15.3. Oksidativna modifikacija proteina

Proteini su važni ćelijski konstituenti i značajni ciljni molekuli RVK. Relativno male strukturne modifikacije proteina mogu da dovedu do značajnih promena u njihovoj ćelijskoj aktivnosti. Aminokiselinske rezidue proteina razlikuju se po stepenu osetljivosti na RVK, a aminokiseline koje su najosetljivije na oksidaciju su cistein i metionin (Buonocore i sar., 2010). Slično LPO, OH^{*} predstavlja najreaktivniju RVK koji uzrokuje oksidativna oštećenja proteina. Proces oksidacije proteina najčešće dovodi do nastanka novih funkcionalnih grupa, kao što su hidroksilne i karbonilne grupe (Kruidenier i Verspaget, 2002). Karbonilacija proteina je ireverzibilan proces u kome nastaju proteinski karbonili koji se koriste kao biomarkeri oksidativnog stresa (Valko i sar., 2007; Almroth, 2008). Sekundarni efekti oksidacije proteina uključuju nastanak alkil, alkoksil i alkil-peroksil radikala, zatim fragmentaciju polipeptidnog lanca, promenu naelektrisanja proteina, povećanu osetljivost na proteolizu, protein-protein interakcije i agregaciju nastalih produkata (Scandalios, 2005). Narušavanje tercijarne strukture i funkcije različitih proteina (promene u aktivnosti enzima, receptornih i transportnih proteina) mogu dovesti do smrti ćelije (Almroth, 2008).

16. Uloga SR u fiziološkim i patofiziološkim mehanizmima

Slobodni radikali imaju sposobnost oštećenja gotovo svih biomolekula u ćeliji, narušavanja međumolekulskih veza, poremećaja fluidnosti i propustljivosti ćelijske membrane. U reakcijama sa drugim biomolekulima (proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama) dolazi do promena u strukturi i funkciji ovih jedinjenja, koje rezultiraju oštećenjem i smrću ćelije (Akanmu i sar., 1991).

Oksidativni stres je rezultat metaboličkih procesa u kojima se koristi kiseonik i predstavlja narušenu ravnotežu između prooksidativnih i antioksidativnih reakcija. RVK mogu da interaguju sa proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama i tako dovedu do oštećenja ovih molekula i inhibicije njihove funkcije. Okidači oksidativnog stresa mogu biti nasledni ili indukovani genski defekti, faktori životne sredine, kao i metaboličke fluktuacije (Andreyev i sar., 2005). Iako je kiseonik esencijalan za aerobni život, može se smatrati i veoma toksičnim (Scandalios, 2005).

Oksidativni stres i produkti LPO uključeni su u patofiziologiju različitih oboljenja, kao i u mehanizam toksičnih dejstava mnogih ksenobiotika.

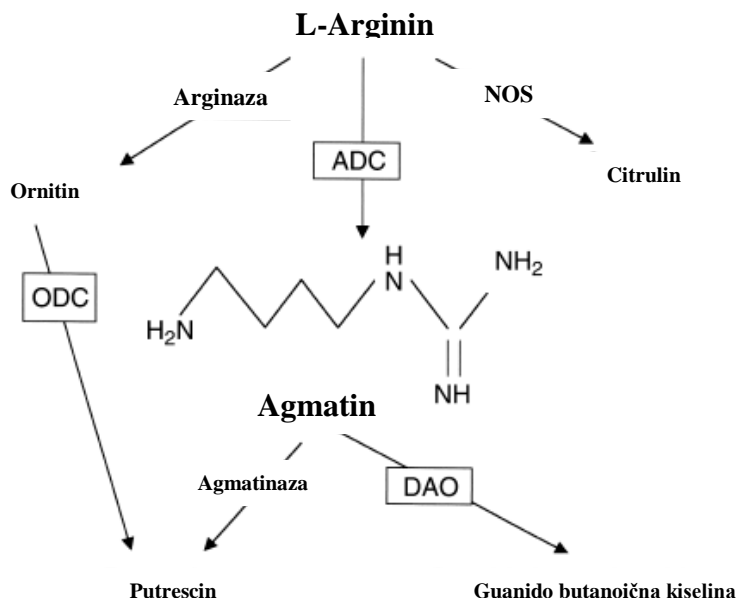
Pri niskim i umerenim koncentracijama, RVK imaju mnogobrojne fiziološke uloge u ćeliji, kao što su odbrana od infektivnih agenasa i uloga u funkcionisanju regulatornih mehanizama i intraćelijskih signalnih puteva (*Slika 13*). Reaktivne vrste kiseonika npr. imaju bitnu ulogu u sazrevanju spermatozoida i aktivaciji njihove pokretljivosti, dok tokom razvoja embriona i fetusa utiču na aktivaciju ključnih faktora transkripcije, koji menjaju gensku ekspresiju tokom razvića (Buonocore i sar., 2010).

Formiranje RVK u inflamatornim procesima dovodi do uništavanja invazivnih patogena. Povećano stvaranje RVK u fagocitima predstavlja odbranu od mikroorganizama. U interakciji sa inflamatornim agensima (citokini, bakterijski produkti) dolazi do aktivacije NAD(P)H oksidaza u plazma membrani neutrofila i makrofaga, što dovodi do oslobađanja velike količine RVK. Formiranje O_2^* u fagocitima ima esencijalnu ulogu u zaštiti organizma od bakterijskih infekcija. Međutim, prekomerno stvaranje RVK tokom zapaljenskih procesa može da dovede do oštećenja tkiva (Valko i sar., 2007; Buonocore i sar., 2010).

Takođe, RVK imaju važnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji. Signalna transdukcija je proces koji omogućava prenos informacije iz ćelijskog okruženja do različitih funkcionalnih elemenata u ćeliji. Okidači signalne transdukcije su ekstracelularni signali (hormoni, faktori rasta, citokini i neurotransmiteri), koji dovode do aktivacije različitih protein kinaza i odgovarajućih transkripcionih faktora - NF- κ B i AP-1. Regulacija ovih transkripcionih faktora je redoks zavisna. Transkripcioni faktori indukuju ekspresiju određenih gena, koji imaju ulogu u aktivaciji imunog sistema, ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji, reparaciji, apoptozi, kao i u AOS (Valko i sar., 2007). Signalni put u ćeliji često uključuje RVK kao signalne molekule intraćelijske transdukcijske kaskade, tako da oni imaju važnu fiziološku ulogu kao sekundarni glasnici u ćeliji. Poznato je da pojedine RVK kontrolišu nivo respiratorne ventilacije, relaksaciju muskulature, imunološku funkciju i odgovor na oksidativni stres (Dröge, 2002).

I7. Agmatin (AGM)

Agmatin (AGM) - (4-aminobutil)guanidin je biogeni amin koji nastaje dekarboksilacijom L-arginina. Poznat je više od 100 godina, ali zbog mnogo kontroverzi, njegova biosinteza ostaje kod ljudi nedovoljno poznata (Halaris i Plietz, 2003). Novi radovi pokazuju modulatorna dejstva AGM na brojne molekule koji su uključeni u procese neurotransmisije, sintezu NO i metabolizam poliamina, što daje osnovu za brojne terapijske intervencije (Iizuka i sar., 2010; Keynan i sar, 2010).



Slika 111. Agmatin

Albrecht Kossel je dobio Nobelovu nagradu kada je 1910. godine otkrio AGM, kao jedinjenje koje se sintetiše iz arginina preko enzima arginin dekarboksilaze (ADC), zbog čega se naziva i dekarboksilisani arginin (Kossel, 1910). U toku I svetskog rata, AGM je istraživan kao potencijalni netoksični antidijabetički aminoguanidinski analog u kliničkim istraživanjima, da bi do 1990. godine biomedicinska istraživanja na AGM bila zaista retka (Cameron, 1928). 1994. godine desilo se revolucionarno otkriće endogenog AGM kod sisara, tako da su Li i kolege zanovili ovo polje istraživanja i doveli do novih otkrića u ovoj oblasti (Li i sar., 1994).

Godine 1995. prvi put su otkriveni neuroprotektivni efekti AGM (Gilad i sar., 1996). Potvrđena je njegova uloga kao neurotransmitera, neuromodulatora i ko-transmitera (Reis i Regunathan, 2000). Veoma brzo, otkrivene su citoprotektivne mogućnosti AGM i u bubrežnom i srčanom tkivu. Njegove neuromodulatorne karakteristike potvrđene su kod dejstva opijata, psihijatrijskih oboljenja i kognitivnih funkcija (Molderings i Haenisch, 2012; Uzbay i sar, 2013). Prva klinička ispitivanja na ljudima 2010. godine pokazala su da je oralna primena AGM bezbedna i efikasna kod neuropatskog bola (Keynan i sar., 2010).

17.1. Regulacija metaboličkih puteva AGM

Agmatin je u niskim koncentracijama (pM-nM) prisutan u mnogim organima. Najveća koncentracija AGM pronađena je u moždanom tkivu. Pomenuto je već da se njegova sinteza odvija preko enzima ADC koji je smešten na spoljašnjoj membrani mitohondrija (Reis i Regunathan, 2000). Klonirana

humana ADC kodira protein od 460 amino kiselina koji pokazuje 48 % sličnosti sa ornitin dekarboksilazom (ODC), ali nema ODC enzimsku aktivnost (Zhu i sar., 2004).

Agmatin se pakuje u sinaptičke vezikule neurona iz kojih se oslobađa nakon depolarizacije aksonskog terminala (Reis i Regunathan, 2000; Reis i sar., 1998). Efekti AGM u mozgu uključuju antikonvulzivna (Su i sar., 2004; Riazi i sar., 2005), antineurotoksična (Zhu i sar., 2006; Gilad i sar., 2005; Wang i sar., 2006) i antidepresivna (Halaris i Piletz, 2003; Aricioglu i Regunathan, 2005) dejstva.

Biosinteza AGM preko dekarboksilacije arginina je u konkurenciji sa osnovnim putevima metabolisanja arginina, koji uključuju ciklus ureje, sintezu poliamina i sintezu NO, kao i sintezu proteina (Satriano, 2004).

Degradacija AGM vrši se hidrolizom (reakcija je katalizovana agmatinazom) na ureju i putrescin, koji je prekursor u biosintezi poliamina i γ -aminobuterne kiseline (GABA) (Molderings i Haenisch, 2012). Metabolisanje AGM vrši se uglavnom u perifernim tkivima putem oksidacije katalizovane diamino oksidazom (DAO) u agmatin aldehyd, koji se prevodi preko aldehyd dehidrogenaze u guanidinobutirat i sekretuje se preko bubrega (Lortie i sar., 1996).

Metabolički putevi koji su zavisni od dostupnosti arginina veoma su bitni u reakcijama ćelije na različite stresne stimuluse, što je od značaja u patofiziološkim uslovima kao što su rast, inflamacija, traumatski stres ili povreda (Satriano, 2004; Wu i sar., 2009). Oni mogu da naruše dobro regulisani pul arginina za različite metaboličke puteve u ćeliji (Satriano, 2004).

17.2. Agmatinergička transmisija

Studije koje su koristile specifično antitelo na AGM pokazale su njegovu regionalnu distribuciju i potvrdile da glijalne, endokrine i endotelne ćelije u mozgu sadrže AGM (Wang i sar., 1995; Regunathan i sar., 1996). Ovi podaci govore o novom "agmatinergičkom transmisionom sistemu".

Koncentracija AGM u mozgu odgovara koncentraciji drugih neurotransmitera (Stanacevic i sar., 2007).

Enzim ADC je lokalizovan uglavnom u astrocitima, što obezbeđuje skladištenje AGM (Tabor i Tabor, 1984).

Mehanizam delovanja AGM posredovan je njegovim:

1. Afinitetom za različite receptore koji deluju preko ligand-zavisnih kanala – ovi receptori uključuju holinergičke nikotinske, serotonergičke 5-HT₃ i NMDA receptorske kanale (Olmos i sar., 1999; Askalany i sar., 2005; Molderings i sar., 1996), imidazolinskih receptora (Piletz i sar., 2003; Wu i sar., 2005; Wu i sar., 2006) i α_2 -adrenergičkih receptora (Piletz i sar., 1995);
2. Oslobađanjem kateholamina – AGM olakšava oslobađanje kateholamina iz medulocita srži nadbubrega, insulina iz pankreasnih β -ćelija i gonadotropin-oslobađajućeg hormona (LHRH) iz

hipotalamusa *in vitro* i *in vivo* (Kalra i sar., 1995). Obrnuto, AGM inhibira oslobađanje noradrenalina iz presinaptičkih nervnih završetaka i snižava ekstracelularne nivoe glutamata nakon oštećenja izazvanog pentilentetrazolom u mozgu pacova (Feng i sar., 2005);

3. Modulatornim efektima na NOS – raniji radovi ukazuju na malu inhibitornu aktivnost AGM na NOS (Chabrier i sar., 1999), dok studije Demady i saradnika iz 2001. godine pokazuju da je AGM ireverzibilni inaktivator nNOS (Demady i sar., 2001).

Potencijal modulatornog delovanja AGM značajno se povećava zbog činjenice da AGM može istovremeno da aktivira različite klase receptora na jednom neuronu.

17.3. Terapijski efekti agmatina

Terapijski efekti AGM mogu se svrstati u nekoliko pravaca:

1. Neuroprotekcija – AGM smanjuje gubitak neurona izazvan ekscitotoksinima (Olmos i sar., 1999) ili ishemijom (Feng i sar., 2002; Gilad i Gilad, 2000), što se objašnjava sposobnošću AGM da inhibira iNOS, odnosno blokira NMDA receptore i/ili voltažno-zavisne Ca²⁺ kanale;

2. Kontrola bola – u eksperimentalnim uslovima AGM ublažava bol (Fairbanks i sar., 2000; Onal i sar., 2003);

3. Modifikacija zavisnosti od opijata – u eksperimentalnim uslovima AGM kompletno prekida zavisnost od morfina kod pacova (Wei i sar., 2005), dok kod miševa pokazuje suprotne efekte (Tahsili-Fahadan i sar., 2006). Takođe, AGM utiče na slabljenje svih znakova apstencijalnog sindroma 72 h nakon davanja morfina kod pacova (Arıcıoglu-Kartal i Uzbay, 1997) i miševa (Li i sar., 1999), pri čemu nisu opisani bilo kakvi neželjeni efekti ponašanja kod ovih životinja;

4. Bolesti povezane sa stresom – AGM je korišćen u eksperimentalnim studijama kao antidepresivni (Zomkowski i sar., 2002) i anksiolitički (Lavinsky i sar., 2003) agens.

II Radna hipoteza

Mehanizmi toksičnog delovanja hlorpromazina su još uvek nedovoljno poznati, a o supstancama koje bi eventualno ispoljile zaštitu od njih zna se još manje. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su potencijalni protektivni efekti agmatina u zaštiti od oksidativnog stresa izazvanog hlorpromazinom u *Wistar* pacova kao eksperimentalnih životinja. Stoga je bilo potrebno dokazati da se u osnovi toksičnih efekata hlorpromazina nalazi oksidativni stres, a da su njihovi pokazatelji bili u korelaciji sa morfološkim promenama tkiva jetre i mozga. U skladu sa tim ispitano je i da li davanje agmatina kod jednokratne i višekratne primene visokih doza hlorpromazina utiče na oksidativno oštećenje i antioksidativni sistem zaštite organizma pacova.

Kod jednokratne i višekratne primene toksičnih doza hlorpromazina u pacova može se očekivati nagli poremećaj ravnoteže antioksidativnog sistema zaštite. Stoga su postavljene sledeće hipoteze:

1. Agmatin će redukovati oksidativni stres nakon jednokratne i višekratne intraperitonealne (*i.p.*) primene toksičnih doza hlorpromazina u plazmi i tkivu jetre i selektivno osetljivim strukturama mozga pacova (kori prednjeg mozga, strijatumu i hipokampusu);
2. Agmatin će smanjiti fokalno nakupljanje makrofaga u pomenutim organima i dodatno sprečiti oštećenja izazvana ovim tipom reakcije organizma na hemijsku noksu.

III Ciljevi istraživanja

U cilju rasvetljavanja mehanizama toksičnosti hlorpromazina, kao i potencijalno zaštitnog efekta agmatina kada se primeni neposredno nakon davanja hlorpromazina, a na osnovu izloženih hipoteza, ciljevi ovih istraživanja bili su:

1. Da se izazove akutno i subakutno trovanje pacova soja *Wistar i.p.* primenom hlorpromazina;
2. Da se na osnovu promene oksido-reduktivnih parametara u plazmi, kao i tkivu jetre i mozga (kora prednjeg mozga, strijatum, hipokampus) pacova proceni uključenost slobodnih radikala u mehanizam toksičnog delovanja hlorpromazina;
3. Da se izvrši evaluacija protektivnog efekta agmatina praćenjem biohemijskih parametara izazvanih oksidativnim stresom u plazmi i tkivu jetre i mozga pacova, kao i imunohistohemijskom analizom istih organa.

IV Materijal i metode

IV1. Eksperimentalne životinje

U istraživanje su bili uključeni odrasli mužjaci pacova *Wistar* soja, starosti 7 nedelja, prosečne TM 250 grama. Životinje su odgajane na Farmi za uzgoj laboratorijskih životinja VMA-Torlak, a zatim su prebačene i čuvane u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja VMA. Tokom rada sa životinjama poštovani su Etički principi rada na laboratorijskim životinjama Vojnomedicinske akademije u Beogradu, koji striktno poštuju pravila Direktive evropskog parlamenta o zaštiti životinja korišćenih za naučne svrhe 2010/63/EU od 22.09.2010. god.

Životinje su čuvane u vivarijumu, na temperaturi 22 ± 2 °C sa ciklusom svetlost/tama (12h/12h). U svakom kavezu bilo je smešteno po 5 životinja pre, odnosno po 2 životinje nakon primenjenog odgovarajućeg tretmana. Sve životinje su tokom eksperimenta boravile pod jednakim uslovima, sa slobodnim pristupom vodi iz plastičnih pojilica i hrani (LM2, hrana za pacove u peletiranom obliku, Veterinarski zavod, Subotica). Raspored životinja po eksperimentalnim grupama određivan je metodom slučajnog uzorka.

IV2. Eksperimentalni protokol

Pre početka eksperimenta životinje su bile 7 dana na prilagođavanju laboratorijskim uslovima u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja VMA. Kompletan eksperiment bio je podeljen u dva dela: akutno i subakutno trovanje. Korišćene doze HPZ (Largactil®, Galenika, Srbija) određene su na osnovu podataka iz literature (toksična doza 38,7 mg/kg *i.p.* i subtoksična doza 9,78 mg/kg *i.p.*) (Patel i sar., 2013). Doza AGM (75 mg/kg *i.p.*) određena je na osnovu prethodnih istraživanja na drugim modelima, koja su pokazala da ova doza ne izaziva promenu telesne mase i unos hrane kod pacova, niti bilo kakve druge klinički manifestne promene (Stevanovic i sar., 2013).

IV2.1. Akutno trovanje

U prvom delu eksperimenta životinje su primile jednokratno toksičnu dozu HPZ (38,7 mg/kg *i.p.*). U ovaj deo bile su uključene sledeće eksperimentalne grupe:

- **1. grupa: kontrola** – životinje su dobile fiziološki rastvor (1 ml/kg *i.p.*) (n = 30);
- **2. grupa: grupa HPZ** – životinje su dobile HPZ, a neposredno nakon toga fiziološki rastvor (1 ml/kg *i.p.*) (n = 30);
- **3. grupa: grupa HPZ+AGM** – životinje su dobile HPZ, a odmah zatim i AGM u dozi od 75 mg/kg *i.p.* (n = 30);
- **4. grupa: grupa AGM** – životinje su dobile fiziološki rastvor (1 ml/kg *i.p.*), a odmah nakon toga AGM u dozi od 75 mg/kg *i.p.* (n = 30).

Životinje su pre žrtvovanja dekapitacijom anestezirane Pentobarbiton-natrijumom u dozi od 0,04 g/kg TM *i.p.* Od ukupnog broja svih životinja, polovina iz svake eksperimentalne grupe (n = 15) žrtvovana je nakon 24 časa, dok su preostale životinje žrtvovane 48 sati nakon primenjenog tretmana.

IV2.2. Subakutno trovanje

U drugom delu eksperimenta životinje su višekratno primile subtoksičnu dozu HPZ (9,78 mg/kg/dan *i.p.*) tokom 15 dana (subakutno trovanje). U ovaj deo uključene su sledeće eksperimentalne grupe:

- **1. grupa: kontrola** – životinje su dobile fiziološki rastvor (1 ml/kg/dan *i.p.*) tokom 15 uzastopnih dana (n = 15);
- **2. grupa: grupa HPZ** – životinje su dobile HPZ, a neposredno nakon toga fiziološki rastvor (1 ml/kg/dan *i.p.*) tokom 15 uzastopnih dana (n = 15);
- **3. grupa: grupa HPZ+AGM** – životinje su dobile HPZ, a odmah zatim i AGM u dozi od 75 mg/kg/dan *i.p.* tokom 15 uzastopnih dana (n = 15);
- **4. grupa: grupa AGM** – životinje su dobile fiziološki rastvor (1 ml/kg *i.p.*), a odmah nakon toga AGM u dozi od 75 mg/kg/dan *i.p.* tokom 15 uzastopnih dana (n = 15).

Životinje iz ovih grupa su 15 dana nakon završetka odgovarajućeg tretmana uvedene u anesteziju (0,04 g/kg TM *i.p.* Pentobarbiton-natrijuma) i žrtvovane dekapitacijom.

I u akutnom i subakutnom trovanju, životinje su najpre uvedene u anesteziju, a odmah nakon toga im je vađena krv (*vena iliaca externa*) i iz uzoraka pune krvi pripremana plazma. Po 2-3 životinje iz svake eksperimentalne grupe perfundovano je sa 0,9 % fiziološkim rastvorom tokom 5 minuta, žrtvovano dekapitacijom i tkivo jetre i mozga je dalje pripremano za imunohistohemijsku analizu. Preostale životinje iz svake eksperimentalne grupe (n = 7) su odmah žrtvovane dekapitacijom i uzimani su odgovarajući organi (jetra i mozak) za merenje koncentracije leka, odnosno određivanje parametara oksidativnog stresa i AOS.

IV3. Određivanje koncentracije hlorpromazina

Koncentracija HPZ određivana je u jetri i mozgu životinja primenom visoko efikasne tečne hromatografije sa masenom detekcijom (HPLC MS/MS) (Heitzman, 1994).

IV3.1. Hemikalije i reagensi

U radu su korišćene komercijalno dostupne hemikalije i reagensi: metanol, HPLC čistoće i amonijum acetat (Merck, Darmstat, Germany); glacijalna sirćetna kiselina (Merck, Darmstat, Germany);

acetonitril HPLC čistoće (J.T. Backer, Deventer, Netherlands); analitički standard HPZ (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA; kat. br. C8138).

IV3.2. Priprema uzoraka tkiva

Priprema tkiva za analizu rađena je najpre usitnjavanjem jetre, odnosno mozga u kivetu za centrifugu (masa tkiva 1,0 g), zatim homogenizacijom na Ultra-Turraxu sa 4 mL kiselog acetonitrila, prebacivanjem u ultrazvučnu kadu 5 minuta i centrifugiranjem 10 minuta na 3 500 obrtaja/min. U supernatant je zatim dodato 6 mL 10 % rastvora NaCl. Prečišćavanje je rađeno na oktadecilsilika kolonicama (C-18), koje su aktivirane sa 5 mL metanola, pa zatim sa 5 mL vode u porcijama od po 1 mL. Posle isticanja poslednje kapi vode sa kolonice, propušten je uzorak brzinom od oko 1 mL/min. Kroz kolonice je zatim propušteno 1 mL 0,01 M sumporne kiseline, a zatim su kolonice osušene propuštanjem 2 mL vazduha. Eluiran je HPZ sa 6 mL smeše kiseli acetonitril : metanol = 50 : 50. Uparen je eluat do suva na azotnom uparivaču, a suvi ostatak rastvoren u 1 mL smeše kiseli acetonitril : metanol = 50 : 50.

IV3.3. Metoda HPLC MS/MS

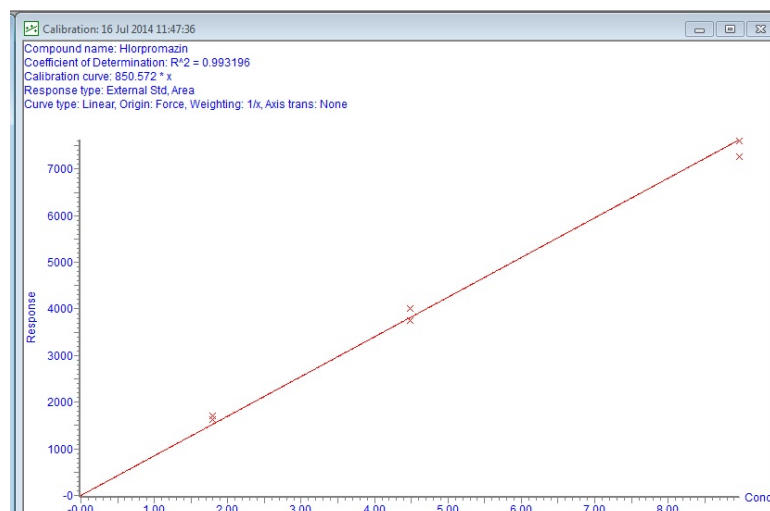
Metoda je rađena na HPLC MS/MS inoproizvođača *Waters* sa pumpom *acquity* i triplkvadropolnim detektorom (TQD). Hromatografski uslovi za HPLC MS/MS bili su sledeći: predkolona i kolona reverzno fazna C-18; 2,1 x 100 mm; 3,5 µm; temperatura 35 °C, mobilna faza A- 0,1 % HCOOH u vodi : B-metanol. Gradijent: 0 min - 5 min 95 % A, 5 min - 6 min 30 % A, 6 min – 7 min 0 % A, 7 min-13 min 95 % A, a protok mobilne faze je bio 0,4 mL/min. Maseni detektor u pozitivnom ESI modu: protonizovani molekulski jon: m/z 319,3 → 86, 319,3 → 245,9 za HPZ. Napon na kapilari iznosio je 3,5 kV.

IV3.4 Priprema uzoraka analitičkih standarda za kalibracionu krivu i uzoraka za kontrolu kvaliteta (validacija)

Osnovni rastvor HPZ pripremljen je u metanolu, u koncentraciji 1 g/L. Radni rastvori standarda dobijeni su razblaživanjem osnovnog standarda u mobilnoj fazi.

Kalibracione krive HPZ dobijene su izračunavanjem faktora iz odnosa površina hromatografskih pikova. Jednačine prave izračunate su primenom linearne regresione analize.

Izračunavanje koncentracije HPZ rađeno je na osnovu jednačine kalibracione krive koja je dobijena nakon analize uzoraka tkiva jetre i mozga opterećenih standardnim rastvorom HPZ i internog standarda acepromazina (*Slika IV1*).



Slika IV1. Kalibraciona kriva za HPZ

IV4. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u plazmi i homogenatima tkiva

Za procenu LPO pri akutnom i subakutnom trovanju HPZ određivana je koncentracija TBARS, dok je za praćenje uloge NO u ispoljavanju toksičnih efekata HPZ, merena nitrata i nitrita ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) u plazmi i homogenatima tkiva jetre i mozga. Takođe, u plazmi je određivan i sadržaj ukupnih SH grupa, dok je u homogenatima tkiva merena koncentracija ukupnog glutaciona. Pored toga, u homogenatima tkiva određivana je i proizvodnja $\text{O}_2^{\cdot -}$, kao i aktivnost enzimskih antioksidanata - superoksid dizmutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GR).

IV4.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa u plazmi

Nakon akutnog i subakutnog trovanja, životinje su najpre uvedene u anesteziju, a odmah zatim im je vađena krv (*vena iliaca externa*) i iz uzoraka pune krvi pripremana plazma za odgovarajuće analize. U odgovarajuće epruvete sa 100 μL 0,005 mol/L EDTA i 50 μL heparina uzeto je 5 mL krvi i centrifugirano 15 minuta na 3000 obrtaja/minuti.

IV4.1.1. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina (TBA)-reagujućih supstanci (TBARS) u plazmi

Reakcija malondialdehida (MDA) sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) u plazmi dovodi do stvaranja kompleksnih jedinjenja bleđožute boje čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski (Girotti i sar., 1991).

Reakciona smeša TBA reagensa sastojala se od 15 % trihlorsirćetne kiseline, 0,375 % tiobarbiturne kiseline i 0,25 mol/L hlorovodonične kiseline. Prvo je 200 μL uzorka i 400 μL TBA reagensa zagrevano na 95 °C tokom 5 minuta, a onda su nakon hlađenja uzorci centrifugirani 1 minut na

3000 x g. Po 300 μL supernatanta razliveno je u ploču i pri mernoj talasnoj dužini od 492 nm i referentnoj talasnoj dužini od 650 nm na ELISA spektrofotometru očitana je vrednost apsorbancije. Koncentracija TBARS izražavana je u $\mu\text{mol MDA/L}$ plazme.

IV4.1.2. Određivanje sadržaja nitrata i nitrita (NO_2+NO_3) u plazmi

Nitrati i nitriti nastaju oksidacijom endogeno stvorenog azot monoksida, tako da se njihova koncentracija u fiziološkim tečnostima uzima kao indikator stvaranja NO. Najčešće korišćena metoda za određivanje koncentracije NO_2+NO_3 je metoda kojom Griss-ov reagens sa nitritima stvara purpurnu azo boju, pa je moguće na osnovu intenziteta stvorene boje, spektrofotometrijski odrediti koncentraciju nitrita. Pošto Griss-ov reagens ne reaguje sa nitratima, a kako su oni u biološkim tečnostima kvantitativno dominantniji u odnosu na nitrite, neophodno je nitrate elementarnim kadmijumom redukovati do nitrita (Navarro-González, 1998).

Za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije NO_2+NO_3 koristi se reakcija između sulfanilne kiseline (Griess I reagens) i nitritnog jona u jako kiseljoj sredini, pri čemu ovako stvoreno diazonijum-jedinjenje reaguje pri pH 2,0-2,5 sa α -naftilaminom (Griess II reagens) stvarajući azo-jedinjenje crvenkasto ljubičaste boje, čija je apsorbancija merena na 492 nm.

Deproteinizacija uzoraka plazme vršena je dodavanjem 300 μL uzorka u epruvete za centrifugiranje, zatim 260 μL ZnSO_4 (75 mM/L) i 360 μL NaOH (55 mmol/L). Nakon 10 minuta završena je precipitacija proteina, pa su uzorci centrifugirani 15 minuta na 8 000 obrtaja/min. Granulirani elementarni kadmijum (veličine od 100 mesh-a) čuvan je u 0,1 mol rastvoru sulfatne kiseline gde je zaštićen i stabilan najmanje devet meseci. Granule kadmijuma aktivirane su u 5 mmol/L rastvoru CuSO_4 u glicin-NaOH puferu (15 g glicina rastvoreno u 600 mL dejonizovane vode, pH 9,7) u toku 5 minuta, tako da je plava boja kompleksnog jedinjenja bakra postepeno izgubila na intenzitetu. Reakcija redukcije nitrata elementarnim kadmijumom izvođena je u epruvetama sa ravnim dnom zapremine 10 mL.

Nakon centrifugiranja uzeto je 300 μL supernatanta i dodato 105 μL glicin-NaOH pufera. U slepu probu je umesto uzorka dodato 300 μL dejonizovane vode. Radni standardi nitrata dobijeni su razblaživanjem osnovnog 0,1 mol rastvora NaNO_3 , koji je pripremljen rastvaranjem odgovarajuće količine soli u 10 mmol/L rastvoru natrijum tetraborata $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, koncentracije 10 mmol/L. Rastvor nitrata (0,1 mol) stabilan je najmanje devet meseci na sobnoj temperaturi, dok se radni standardi dobijeni razblaženjem osnovnog standarda moraju spravljati svakodnevno. U sve analize su dodate po 2 aktivirane granule kadmijuma, koje su za 15 minuta na sobnoj temperaturi izvršile redukcija nitrata. Zatim je iz svake epruvete uzeto po 100 μL rastvora i preneto na ploče ELISA spektrofotometra. Radi izvođenja bojene reakcije, svakoj probi dodato je po 100 μL Griess I (0,346 mol/L sulfanilne kiseline) i 100 μL Griess II (2,1 mmol/L α -naftilamina) reagensa. Nakon 30 minuta je pri mernoj talasnoj dužini od 492 nm i

referentnoj talasnoj dužini od 650 nm na ELISA spektrofotometru očitana vrednost apsorbancije standarda i uzoraka prema slepoj probi. Konstruisana je standardna kriva i iz jednačine dobijene kalibracione krive izračunat je sadržaj NO_2+NO_3 u uzorku, koji je izražen u $\mu\text{mol/L}$ plazme.

IV4.1.3. Određivanje sadržaja ukupnih sulfhidrilnih (SH) grupa u plazmi

Ukupni sadržaj SH grupa u plazmi određivan je Elmanovom metodom i analiza je urađena u roku od dva dana nakon uzimanja krvi životinjama, jer se uzorci plazme mogu čuvati najviše 15 dana na temperaturi od $-80\text{ }^\circ\text{C}$ (Ellman, 1959). Takođe, odmrzuta plazma je centrifugirana neposredno pre analize radi precipitacije lipidnih agregata ili agregata tiol siromašnih lipoproteina.

Ova metoda zasniva se na reakciji 2,2-dinitro-5,5-ditio-benzoeve kiseline (DTNB) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini pri pH 9,0, pri čemu se stvara jedan mol p-nitrofenol anjona po jednom molu tiola. Pošto je ovaj anjon u baznoj sredini jako žuto obojen, merenje njegove apsorbancije vršeno je na 412 nm. U 0,05 mL uzorka dodato je 0,9 mL pufera (0,2 mol/L K_2HPO_4 , 2 mmol/L EDTA, pH 9,0) i 0,02 mL DTNB (0,01 mol/L DTNB rastvoren u 50 mmol/L fosfatnog pufera, pH 7,0). U slepu probu je u 0,95 mL pufera dodato 0,02 mL DTNB. Uzorci su nakon mešanja na vorteksu inkubirani 25 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je apsorbancija čitana na 412 nm prema slepoj probi. Koncentracija ukupnog sadržaja SH grupa u plazmi izračunata je preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta p-nitrofenola na 412 nm, koji za date uslove ima vrednost od $13\ 600\ \text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Koncentracija ukupnih SH grupa izražena je u $\mu\text{M SH/L}$ plazme.

IV4.2. Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u homogenatima tkiva jetre i mozga (kora prednjeg mozga, strijatum, hipokampus)

IV4.2.1. Priprema homogenata tkiva

Odmah nakon uvođenja u anesteziju, životinje su žrtvovane dekapitacijom i tkivo jetre i mozga zamrzavano je u tečnom azotu i ostavljeno na $-70\text{ }^\circ\text{C}$ za dalju analizu. Nakon nepotpunog odmrzavanja najpre je izdvajan deo jetre, a zatim je izvađen i mozak, uklanjane su meke moždanice, moždano stablo i mali mozak i brzim postupkom na ledu ($0-4\text{ }^\circ\text{C}$) izdvajane su strukture:

- kora prednjeg mozga
- strijatum
- hipokampus.

Priprema tkiva jetre i selektivno osetljivih struktura mozga za analize vršena je homogenizacijom (Schüett-biotec) na ledu, u hladnom puferizovanom saharoznom medijumu, u staklenom homogenizeru sa teflonskim tučkom na 800 obrtaja/min. Nakon 2 uzastopna centrifugiranja (Beckman J-21, rotor J-20) na 1000 g, u trajanju od 15 minuta na $+4\text{ }^\circ\text{C}$, odvojeni supernatant je sonifikovan (MSE, P631555) radi

liziranja membrana subcelularnih struktura i predstavlja neprečišćenu mitohondrijalnu frakciju (Gurd i sar., 1974). Dobijeni supernatant čuvan je na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ za dalje određivanje parametara oksidativnog stresa i AOS.

IV4.2.2. Određivanje koncentracije proteina u homogenatima tkiva

Parametri oksidativnog stresa, kao i AOS, izražavani su na mg proteina, tako da je pre svih merenja u homogenatima tkiva najpre određen sadržaj proteina metodom po Lowryju (Lowry i sar., 1951). Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji peptidnih veza i jona bakra u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa sa aromatičnim amino kiselinama (tirozin i triptofan) u polipeptidnim lancima. Kao standard korišćen je kristalizovani serumski albumin govečeta. U reakciji nastaje kompleksno jedinjenje plave boje, čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji proteina. Prvo je $10\text{ }\mu\text{L}$ uzorka i do 1 mL reakcione smeše: 2 mL $0,5\%$ CuSO_4 i do 100 mL Stock Lowry reagensa (10 g Na_2CO_3 , 10 mL 5 mol/L NaOH , 100 mg K-Na tartarata i H_2O do 500 mL) inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi. Slepa proba (1 mL reakcione smeše) i standardi ($10, 20, 30, 40, 50\text{ }\mu\text{L}$ BSA - *bovini serum albumin*, poznate koncentracija proteina 1 mg/mL , uz dodatak reakcione smeše do 1 mL) su takođe 10 minuta inkubirani na sobnoj temperaturi. Zatim je u sve analize (uzorci, slepa proba, standardi) dodato po $100\text{ }\mu\text{L}$ Follin-reagensa i ponovo je vršena inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi. Intenzitet plave boje meren je spektrofotometrijski na 575 nm . Koncentracija proteina u uzorku izražavana se u $\mu\text{g/mL}$ homogenata tkiva.

IV4.2.3. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina (TBA)-reagujućih supstanci (TBARS) u homogenatima tkiva

Malondialdehid (MDA) reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) u homogenatima tkiva stvarajući obojeni kompleks jako žute boje čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski na $492\text{-}650\text{ nm}$ (Girotti i sar., 1991).

Reakcionu smešu TBA reagensa čine 15% trihlorsirćetna kiselina, $0,375\%$ tiobarbiturna kiselina i $0,25\text{ mol/L}$ hlorovodonične kiseline. $200\text{ }\mu\text{L}$ homogenata i $400\text{ }\mu\text{L}$ TBA reagensa zagrevano je na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 5 minuta, ohlađeno i centrifugirano 1 minut na 3000 x g , nakon čega je po $300\text{ }\mu\text{L}$ supernatanta razliveno u ploču. Vrednost apsorbancije očitana je na ELISA spektrofotometru pri mernoj talasnoj dužini od 492 nm i referentnoj talasnoj dužini od 650 nm . Koncentracija TBARS izražena je u nmol MDA/mg proteina.

IV4.2.4. Određivanje sadržaja nitrata i nitrita (NO_2+NO_3) u homogenatima tkiva

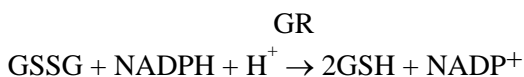
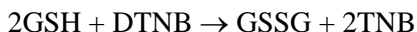
Kao i u plazmi, koncentracija NO_2+NO_3 je u homogenatima tkiva određivana Griessovom metodom po proceduri Navarro-González (1998). Pošto Griessov reagens ne reaguje sa nitratima, neophodno je pre kolorimetrijske reakcije, nitrate redukovati do nitrita.

Griess I reagens (sulfanilna kiselina) i nitritni jon u jako kiseloj sredini stvaraju diazonijum-jedinjenje, koje reaguje sa Griess II reagensom (α -naftilamin) pri pH 2,0-2,5 formirajući azo-jedinjenje crvenkasto ljubičaste boje, čija je izmerena apsorbancija na 492 nm korišćena za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije NO_2+NO_3 u homogenatima tkiva.

Homogenati tkiva su deproteinizovani dodavanjem 75 mM/L $ZnSO_4$ u zapremini od 29 μ L i 96,25 mmol/L NaOH u zapremini od 35 μ L u 300 μ L uzorka. Nakon 10 minuta završena je precipitacija proteina, a uzorci su centrifugirani 15 minuta na 8 000 obrtaja/min. Granule kadmijuma su aktivirane držanjem par minuta u 5 mmol/L rastvoru $CuSO_4$ u glicin-NaOH puferu, dok plava boja bakra nije postepeno izbledela. U sve analize: 1. Slepa proba (150 μ L vode + 27 μ L glicin-NaOH pufera), 2. Standardi (5-50 μ mol/L $NaNO_3$ u 10 mmol/L $Na_2B_4O_7$ + voda do 150 μ L + 27 μ L glicin-NaOH pufera), 3. Uzorci (150 μ L supernatanta + 27 μ L glicin-NaOH pufera) dodata je po jedna aktivirana granula kadmijuma i sve je ostavljeno 15 minuta na sobnoj temperaturi, da bi se efikasno izvršila redukcija nitrata. Zatim je iz svake epruvete uzeto po 100 μ L rastvora i preneto na ploče ELISA spektrofotometra, nakon čega je svakoj probi dodato po 100 μ L 0,346 mol/L sulfanilne kiseline (Griess I) i 100 μ L 2,1 mmol/L α -naftilamina (Griess II) i posle 30 minuta je pri talasnoj dužini od 492/650 nm na ELISA spektrofotometru očitana vrednost apsorbancije standarda i uzoraka prema slepoj probi. Konstruisana je standardna kriva i iz jednačine dobijene kalibracione krive izračunata je koncentracija NO_2+NO_3 u uzorku, koji je izražena u nmol/mg proteina.

IV4.2.5. Određivanje koncentracije ukupnog glutaciona

Za određivanje koncentracije ukupnog glutaciona korišćena je DTNB-GSSG reciklirajuća metoda koja je veoma senzitivna za određivanje ukupnog glutaciona ($GSH + 1/2GSSG$, u GSH ekvivalentima), jer kombinuje kolorimetrijsku reakciju DTNB sa specifičnošću GR, prema sledećim reakcijama:



Nivo stvaranja 5-tio-2-nitrobenzoične kiseline (TNB), koji je proporcionalan ukupnoj koncentraciji glutaciona, prati se spektrofotometrijski na 412 nm tokom 6 min (Anderson, 1986).

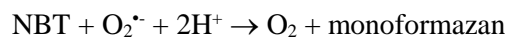
U reakcionu smešu koja se sastoji od 700 μL radnog pufera (211×10^{-6} g NADH u 0,143 mol Na-fosfatnom puferu, pH 7,5, 6,3 mmol EDTA), 100 μL DTNB (6 mmol u 0,143 mol Na-fosfatnom puferu, pH 7,5, 6,3 mmol EDTA) i 175 μL vode, dodato je 25 μL uzorka. Reakcija je započeta dodavanjem 10 μL GR (266 IJ/mL 0,143 mol Na-fosfatnog pufera, pH 7,5, 6,3 mmol EDTA). Kao standard korišćen je GSSG (50 mmol GSSG), od koga su pravljeni odgovarajuća razblaženja. Urađena je standardna kriva u rasponu od 0,2-1 nmol/25 $\times 10^{-6}$ mL (8-40 nmol/mL). U datom opsegu koncentracija ostvarena je linearnost standardne krive, a na osnovu jednačine te prave izračunat je sadržaj ukupnog glutationa. Ukupni glutation izražavan je u nmol/mg proteina.

IV4.2.6. Stvaranje superoksidnog anjon radikala ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Redukcija nitroblu tetrazolijuma (NBT) do nitroblu-formazana koristi se kao mera stvaranja $\text{O}_2^{\cdot-}$ u hemijskim i biološkim sistemima (Auclair i sar., 1985).

Redukcija NBTa odvija se u dva koraka:

- kao nepotpuna redukcija do monoformazana:



- kao kompletna redukcija NBT-hlorida do diformazana:



U oksidovanoj formi NBT je žuta supstanca rastvorljiva u vodi, dok je njegova redukcija u diformazan praćena promenom u intenzivnu plavu boju i smanjenjem rastvorljivosti. U puferizovanom vodenom rastvoru bliskom neutralnom pH, molarni ekstinkcioni koeficijent pri talasnoj dužini od 550 nm iznosi za monoformazan 15 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a za diformazan 30 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. U vodenim rastvorima reakcije koje stvaraju $\text{O}_2^{\cdot-}$ dovode do nepotpune redukcije NBT do monoformazana.

$\text{O}_2^{\cdot-}$ - zavisna redukcija NBT odvija se do monoformazana. Reakciona smeša je sadržala 1 mmol NBT (rastvorenog u 0,05 mol fosfatnom puferu, pH 8,6 sa 0,1 mmol EDTA) i 0,1 mg/mL želatina, koji NBT-formazan održava u rastvoru. Rastvor NBT je jedan sat bio izložen dejstvu azota pod pritiskom, što je imalo za cilj da smanji napon kiseonika u medijumu. Reakcija je otpočinjala dodavanjem 0,05 mL uzorka u 1 mL reakcione smeše, a promena ekstinkcije praćena je u toku 5 minuta na talasnoj dužini 550 nm. Stvaranje $\text{O}_2^{\cdot-}$ izražavano je kao μmol redukovanog NBT/min/mg proteina.

IV4.2.7. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD)

Aktivnost ukupne SOD u homogenatima tkiva zasniva se na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini na pH 10,2. Enzim SOD katalizuje reakciju neutralisanja $O_2^{\cdot-}$:



i na taj način uklanja $O_2^{\cdot-}$ čime inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina.

Aktivnost ukupne SOD određivana je kinetički, kao promena apsorbancije u vremenu (10 minuta) na talasnoj dužini od 480 nm (Sun i Zigman, 1978). Reakciona smeša za određivanje aktivnosti ukupne SOD sadržala je 50 μ L uzorka (za slepu probu uzimano je 50 μ L vode), 2,85 mL Na-bikarbonatnog pufera (50 mmol/L Na-bikarbonatni puffer pH 10,2 sa 1 mmol/L EDTA) i 100 μ L adrenalina. Reakcija je praćena kinetički i otpočinjala je dodavanjem adrenalina, kada je reakciona smeša inkubirana 6 minuta na 25 °C, a promena apsorbancije čitana je na 480 nm u vremenskom rasponu od 5-8 minuta, tj. periodu u kome je reakcija linearna. Jedinica aktivnosti SOD definiše se kao količina enzima koja dovodi do 50 % inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance u minuti. Aktivnost ukupne SOD u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

IV4.2.8. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost CAT određivana je spektrofotometrijskom metodom. Amonijum molibdat formira žuti kompleks sa H_2O_2 i pogodan je za merenje kako serumskih, tako i aktivnosti CAT u tkivu (Góth, 1991). 0,1 mL uzorka je najpre inkubirano 1 minut sa 0,5 mL 65 μ M H_2O_2 u Na-K fosfatnom puferu, pH 7,2. Kontrolna reakcija je pripremljena sa 0,1 mL Na-K fosfatnog pufera, pH 7,2 i 0,5 mL 65 μ M H_2O_2 . Reakcija je zaustavljena dodavanjem 0,5 mL 32,4 mmol amonijum molibdata u uzorke i kontrole. Absorbanca između žućkastog molibdata i H_2O_2 kompleksa u odnosu na blank čita se na 405 nm. Jedinica aktivnosti CAT definiše se kao broj μ molova H_2O_2 redukovanih u minuti (μ mol H_2O_2 /min). Aktivnost ovog enzima u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

IV4.2.9. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)

Ransel kit za određivanje GPx (Randox Laboratories Ltd.) korišćen je za indirektno merenje aktivnosti GPx (Randox, 1996). Princip metode zasniva se na redukciji organskih peroksida, pri čemu se stvara GSSG preko citoplazmatske GPx, koji se vraća u redukovano stanje sa iskorišćavanjem NADPH u reakciji koju katalizuje enzim GR. Oksidacija NADPH u $NADP^+$ povezana je sa promenom, odnosno smanjenjem apsorbancije na 340 nm, što se određuje spektrofotometrijski i predstavlja meru aktivnosti GPx u vezanoj reakciji u kojoj učestvuje i GR. Jedinica enzimske aktivnosti GPx definiše se kao broj

μmolova oksidovanog NADPH u minuti (μmol NADPH/min), a aktivnost GPx u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

IV4.2.10. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR)

Princip metode za određivanje aktivnosti GR zasniva se na sposobnosti GR da katalizuje reakciju redukcije GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH do NADP⁺. U 0,2 mL 1 mM NADH u 200 mM Tris Hepes puferu, pH 7,2 sa 1 mM EGTA dodato je 0,03 mL uzorka i 0,03 mL 4 mM GSSG. Sve je inkubirano 15 minuta na 37 °C, a zatim je dodato 0,1 mL 0,1 M HCl i 1 mL 6 M NaOH i samo u kontrolu 0,03 mL 4 mM GSSG. Od ukupne zapremine, 0,3 mL je razliveno u ploču i čitano na fluorimetru na λ_{Ex}-360 nm, λ_{Em}-460 nm. Fluorescencija ili fosforescencija je apsorpcija svetlosti od strane molekula u jednom delu spektra, koja je praćena emitovanjem svetlosti u opsegu većih talasnih dužina (manjih energija) (Freifelder, 1976). Fluorimetrijski metod je u mnogim slučajevima osetljiviji i ima niz prednosti u odnosu nad spektrofotometrijskim, između ostalog i što je za registrovanje parametara fluorescencije potrebna manja količina supstance. Pošto flavinska jedinjenja jako fluoresciraju u oksidovanom obliku, a gube fluorescenciju u redukovanom obliku, dok NAD i NADP ne fluoresciraju u oksidovanom obliku, ali imaju plavu fluorescenciju u redukovanom obliku, ovaj osetljivi metod se može koristiti za praćenje toka enzimskih oksidoredukcionih reakcija. Kao standard u reakciji korišćen je 100 mmol NAD⁺, od koga su pravljena odgovarajuća razblaženja. Jedinica aktivnosti enzima GR definiše se kao broj μmolova oksidovanog NADPH u minuti (μmol NADPH). Aktivnost ovog enzima u ispitivanim uzorcima predstavljena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

IV5. Imunohistohemijske analize

S obzirom da promene koje se javljaju kod primene HPZ dovode do aktivacije makrofaga, kao i do reaktivne astroglioze, to ukazuje da histološka demonstracija njihove aktivacije može poslužiti kao veoma osetljiv biološki marker. Imunoreaktivnost makrofaga, astrocita, mikroglije i brojnih citoplazmatskih proteina zasniva se na njihovom imunohistohemijском markiranju specifičnim antitelima. U našem istraživanju, upotreba određenih antitela za imunohistohemijскую karakterizaciju makrofaga i astrocita, imala je za cilj da ispita dodatno širenje oštećenja ćelije na modelu akutnog i subakutnog trovanja HPZ.

U istraživanju su iz svake eksperimentalne grupe po 2-3 životinje najpre perfundovane sa 0.9 % fiziološkim rastvorom u zapremini od 50 mL i trajanju od 5 minuta, a zatim žrtvovane dekapitacijom. Organi (jetra i mozak) su najpre uronjeni u 4 % PFA i dalje u cilju krioprotekcije prošli kroz seriju rastvora saharoze, koncentracija 10 % - 30 % (30 % saharoza: 30 g saharoze u 100 mL 0,2 mol fosfatnog pufera pH 7,4, koji je napravljen u odnosu 4 (0,2 mol NaH₂PO₄ x H₂O) : 1 (0,2 mol Na₂HPO₄ x 2H₂O).

Tkiva su zatim držana u izopentanu par minuta i zamrznuta na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje imunohistohemijske analize (Dalmau i sar., 2003). Od imunohistohemijskih tehnika korišćena je metoda imunoperoxidaze, koja u našem istraživanju uz upotrebu određenih antitela za imunohistohemijsku karakterizaciju makrofaga, odnosno astroglije, može ukazati da histološka demonstracija njihove aktivacije može poslužiti kao veoma osetljiv biološki marker.

Kriostatski preseći tkiva pravljani su na klasičnom kriotomu (Leica CM 1850) na temperaturi od $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$, debljine $20\text{ }\mu\text{m}$. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, mikroskopske pločice čuvane su na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do testiranja.

U našem istraživanju primenjeno je imunohistohemijsko markiranje specifičnim mišjim monoklonskim ED1, anti-CD68 antitelom (razblaženje 1:100, Abcam, Cambridge, UK) koje prepoznaje antigen prikazan na membrani lizozoma makrofaga (Kawai i sar. 1998) i zečjim poliklonskim antitelom koje markira GFAP (razblaženje 1:500, Dako, Denmark), koji je specifični marker astrocita (Stevanovic i sar., 2013).

Kriostatski preseći pacovskih tkiva su nakon odmrzavanja ispirani po 5 minuta u česmenkoj vodi i u TBS puferu ($0,5\text{ mol TRIS}$, $1,5\text{ mol NaCl}$, pH 7,6), nakon čega su inkubirani 20 minuta sa inaktivisanim normalnim serumom magarca. Pločice sa tkivnim presecima su zatim ostavljene 15 minuta u rastvoru metanola sa $1\text{ }\%$ H_2O_2 (blokiranje endogene peroksidazne reakcije), da bi se nakon ispiranja 5 minuta u TBS, narednih 60 minuta inkubirali sa primarnim antitelima u vlažnoj komori, na sobnoj temperaturi ili preko noći na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ovo vreme je bilo potrebno da bi se antitelo vezalo za antigen na površini ili u citoplazmi ćelije. Nakon ispiranja u TBS, pločice sa tkivnim presecima su inkubirane sekundarnim antitelom (α mišji Ig HRP ili α zečiji HRP) konjugovanim peroksidazom u razblaženju 1:250. Razblaženje je rađeno u TBS sa dodatkom $2\text{ }\%$ normalnog magarećeg seruma (NDS). Inkubacija je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi u vlažnoj komori, nakon čega su pločice ponovo isprane u TBS. Radi vizualizacije peroksidazne reakcije nanošen je supstrat (3'3 diaminobenzidin - DAB i $0,01\text{ }\%$ H_2O_2 u TBS) i inkubiran 10 minuta. Preseći su isprani 5 minuta u dejonizovanoj vodi i blago kontrastirani u hematoksilinu, nakon čega su montirani Kajzerovim glicerinsko-želatinskim gelom. Histološka analiza je vršena na svetlosnom mikroskopu.

IV6. Određivanje ekspresije proteina - Western blot analiza

IV6.1. Izolovanje tkiva i određivanje koncentracije ukupnih proteina

Tkiva jetre i mozga (kora prednjeg mozga, strijatum i hipokampus) homogenizovana su u 10 zapremina vrućeg ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) $1\text{ }\%$ SDS-a sa 20 zaveslaja (Harry i sar, 1996) i dobijeni uzorci su sonifikovani i do dalje analize čuvani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za određivanje koncentracije proteina u ovim uzorcima korišćena je metoda po Lowryju i saradnicima (1951). Ova metoda omogućava korišćenje uzoraka koji sadrže komponente membrana i lipoproteine bez prethodne solubilizacije ili ekstrakcije lipida. Svi koraci su rađeni na sobnoj temperaturi. U 890 μL dejonizovane vode dodato je 10 μL uzorka, čiju koncentraciju proteina određujemo, a zatim i 100 μL 1M NaOH. Nakon 10 minuta dodato je 2 mL reagensa C, a posle 15 minuta inkubacije dodato je i 300 μL *Folin-Chicalteau* reagensa (FC : dH₂O = 1 : 1). Posle 45 minuta inkubacije očitana je apsorbancija na spektrofotometru (Shimadzu UV-160) na 750 nm. Koncentracija uzoraka određena je iz standardne krive dobijene upotrebom poznatih koncentracija proteina BSA.

IV6.2. Elektroforeza proteina

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima u diskontinuiranom sistemu – SDS-PAGE (*engl. Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Korišćena je mini aparatura za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories).

Za detekciju proteina od interesa u ovom radu korišćeni su 7,5 % gel za razdvajanje i 4 % gel za koncentrovanje. Razdvajanje proteinskih traka se znatno povećava upotrebom gela za koncentrovanje (*stacking gel*), koji se nalazi iznad gela za razdvajanje (*resolving gel*). Razlika u pH i u sastavu ova dva gela dovodi do koncentrovanja uzoraka u usku traku pre separacije u gelu za razdvajanje. Na ovaj način je omogućen istovremeni ulazak proteina u gel za razdvajanje.

IV6.3. Priprema uzoraka proteina za SDS-PAGE

Pufer u kome se pripremaju uzorci proteina za SDS-PAGE označen je kao pufer za uzorke (2X *Laemmli Sample Buffer*). Uzorci su pripremljeni u 2X puferu u odnosu 1 : 1 (v/v) i denaturisani kuvanjem 5 minuta na 95 °C. Kao standard za molekularnu težinu korišćen je obojeni marker opsega od 10 do 170 kDa .

Količina proteina koja je nanošena na gel optimizovana je eksperimentalno za svaki protein preko krivih sa sukcesivnim razblaženjima proteina, a koncentracija primarnih antitela uzeta je po preporuci proizvođača. Kao optimalna količina proteina korišćena je ona koja se nalazila u linearnom opsegu krive zavisnosti intenziteta signala i količine nanesenih proteina.

U gelu za koncentrovanje napravljena su udubljenja u koja su sipani uzorci u finalnoj koncentraciji od 10 μg proteina. Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu pri konstantnom naponu od 120 V na ST.

IV6.4. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blotting)

Pošto su proteini elektroforetski razdvojeni prenešeni su sa poliakrilamidnog gela na PVDF membranu (Roche). Nakon završene elektroforeze gel za razdvajanje inkubiran je 15 minuta u puferu za transfer da bi se sprečilo njegovo skupljanje tokom transfera. Nitrocelulozna membrana aktivirana je u metanolu 15 sekundi, isprana u destilovanoj vodi 2 minuta, a zatim inkubirana 20 minuta u puferu za transfer.

Za transfer je korišćen sistem Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories). Metoda se zasniva na kretanju negativno naelektrisanih proteina ka pozitivnom polu u električnom polju. Tako proteini prelaze sa gela na nitroceluloznu membranu, koja se nalazi bliže anodi. Transfer proteina ide preko noći pri konstantnom naponu od 30 V na 4 °C.

Po završenom transferu membrane su obojene *Ponceau S* bojom radi vizuelizacije proteinskih traka i potvrde uspešnosti transfera.

IV6.5. Imunoblot analiza

Posle završenog transfera proteina, nitroceluloze su inkubirane u 5 % BSA u TBST-u, da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela. Nakon ispiranja (3 puta po 10 minuta u TBST), membrane su ostavljene u primarnom antitelu (razblaženo u TBST) preko noći na 4 °C. Posle ispiranja membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom obeleženim HRP. U ovoj metodi korišćeno je ED1 antitelo koje obeležava aktivisane makrofage i GFAP antitelo kao marker aktivacije astroglijalne reakcije.

Nakon ispiranja, membrane su izložene dejstvu luminola 2 minuta, ocedene i izložene autoradiografskom filmu (Kodak) osetljivom na plavu svetlost u trajanju od 1 do 20 minuta, u zavisnosti od korišćenog antitela. Filmovi su razvijeni i skenirani radi dalje analize dobijenih signala.

IV6.6. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet dobijenih signala kvantifikovan je denzitometrijski, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (ImageQuant 5.2). Vrednosti dobijene za ciljne proteine normalizovane su u odnosu na β -aktin, odnosno β -tubulin, kao kontrolu za nanetu količinu totalnih proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

IV7. Vrsta studije, veličina uzorka i statistička obrada rezultata

Tip studije prema kome je sprovedeno istraživanje u celini je eksperimentalna studija na životinjama *in vivo*.

Veličina uzorka izračunata je na osnovu očekivanih vrednosti parametara oksidativnog stresa u eksperimentalnim grupama. Studijski uzorak izračunat je uzimajući da je $\alpha = 0,05$, a snaga studije 0,8 za nezavisni t test, poredeći grupe među sobom (u oba smera), prema statističkom programu G*Power3,1. Studijski uzorak koji pretpostavlja utvrđivanje statistički značajne razlike (nezavisni t test ili *Mann-Whitney* test) između dve izmerene varijable omogućava snagu studije $\geq 80\%$.

Sve dobijene vrednosti su prezentovane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Nakon testiranja normalnosti raspodele varijabli po grupama, za utvrđivanje statističke značajnosti korišćeni su sledeći testovi: analiza varijanse (ANOVA) i nezavisni t test za obeležja sa normalnom raspodelom, kao i *Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney* testovi za neparametarska obeležja. Za testiranje zavisnosti između pojedinih varijabli korišćen je test linearne regresije uz utvrđivanje i testiranje *Pearson*-ovog koeficijenta korelacije. Za statističku obradu dobijenih rezultata korišćen je komercijalni programski paket SPSS verzija 13,0. Statistička značajnost određena je na $p < 0,05$.

V Rezultati

V1. Promene ponašanja *Wistar* pacova posle primene odgovarajućih supstanci (0,9 % fiziološki rastvor, HPZ, HPZ+AGM, AGM)

Sve eksperimentalne grupe životinja su aktivno praćene od trenutka aplikacije određenih supstanci do žrtvovanja. Promene ponašanja kod svih životinja ocenjuvane su posmatranjem i pregledom, zbog nedostatka testova za njihovu egzaktnu kvantifikaciju.

Kod kontrolnih životinja nije uočena bilo kakva promena ponašanja u toku trajanja eksperimenta.

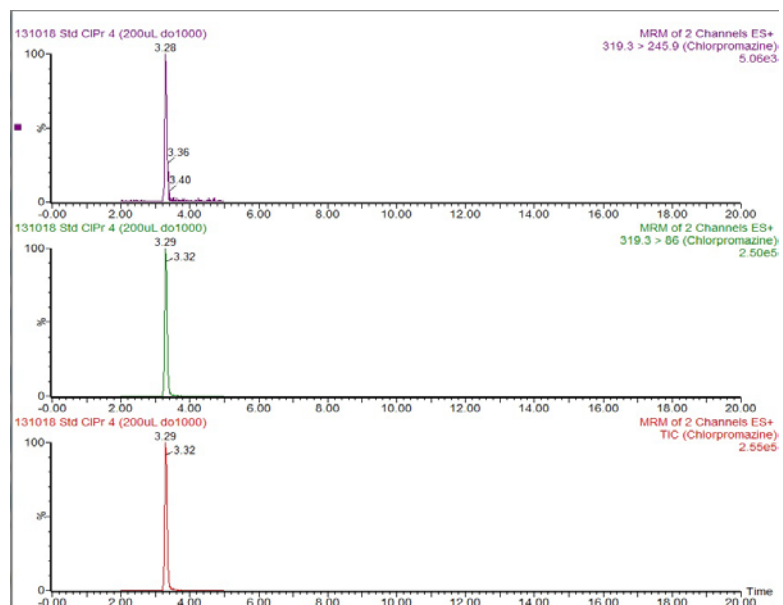
Životinje koje su dobile jednokratno toksičnu dozu HPZ bile su motorno usporene do termina žrtvovanja (24 h i 48 h). Ove životinje u prvih par sati bile su nesposobne da priđu hrani i vodi, nije primećena nakostrešenost dlake, kao ni somnolencija. Ovo stanje se vremenom postepeno popravilo, ali još uvek ne kao kod kontrolne grupe. Životinje koje su višekratno primile subtoksičnu dozu HPZ tokom 15 uzastopnih dana takođe su bile motorno usporene nakon primene leka i tokom daljeg ispitivanog perioda.

Kod životinja koje su dobile AGM nakon HPZ jednokratno, kao i višekratno u toku 15 uzastopnih dana nije registrovana usporenost u kretanju, niti bilo kakve promene u ponašanju u odnosu na kontrolnu grupu.

Takođe, kod životinja koje su dobile samo AGM jednokratno ili višekratno u toku 15 uzastopnih dana, vizuelno nisu uočene bilo kakve razlike u motorici i ponašanju u odnosu na kontrolu.

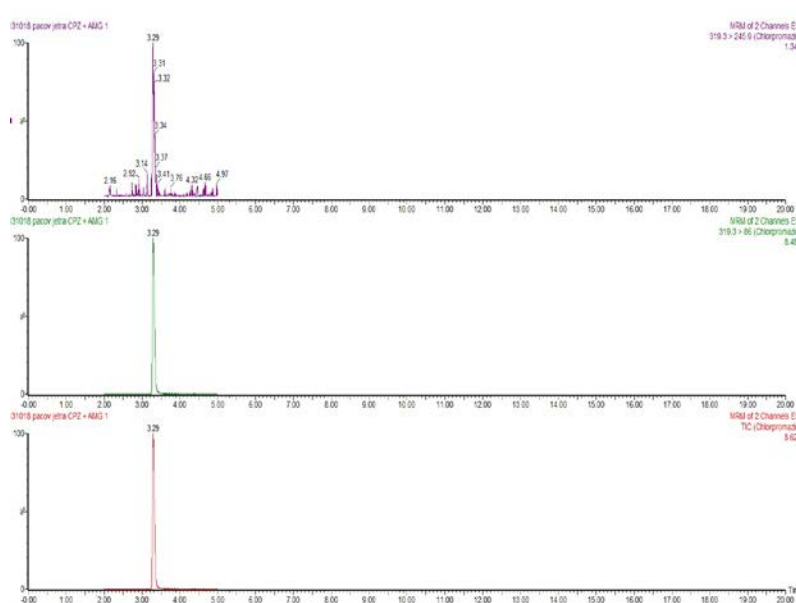
V2. Distribucija i akumulacija HPZ u jetri i mozgu pacova pri akutnom i subakutnom tretmanu

Za određivanje koncentracije HPZ u uzorcima tkiva jetre i mozga nakon akutnog (24 h, 48 h), odnosno subakutnog (15 dana) tretmana HPZ i/ili AGM korišćena je HPLC MS/MS metoda. Analiza uzoraka tkiva rađena je u pozitivnom ESI modu za jonske mase m/z 319,3 \rightarrow 86, 319,3 \rightarrow 245,9 za HPZ. Na *Slici VI*. prikazani su hromatogrami HPZ iz smeše standarda u mobilnoj fazi.

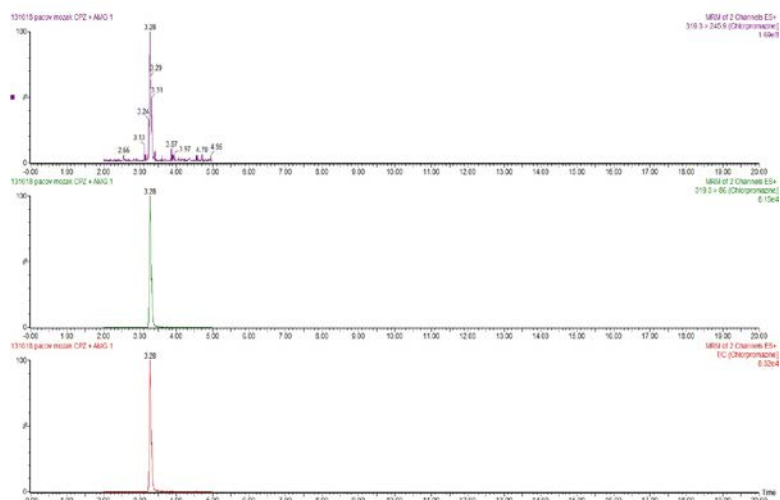


Slika V1. Hromatogram smeše standarda HPZ u mobilnoj fazi

Primera radi, prikazani su hromatogrami HPZ iz uzorka tkiva jetre (Slika V2) i mozga (Slika V3) životinja 24 h nakon akutne primene toksične doze HPZ (38,7 mg/kg *i.p.*).



Slika V2. Hromatogram uzorka jetre pacova 24 h nakon jednokratne *i.p.* primene HPZ



Slika V3. Hromatogram uzorka homogenata mozga pacova 24 h nakon jednokratne i.p. primene HPZ

Analizirani su uzorci tkiva jetre i mozga pacova nakon akutnog i subakutnog tretmana i sadržaj HPZ prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Koncentracija HPZ (ppm) u jetri i mozgu pacova nakon akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

	Vreme		
	24 h	48 h	15 dana
Jetra			
Kontrola	1,56 ± 0,65	1,56 ± 0,65	1,30 ± 0,60
HPZ	202,90 ± 98,43*	2,05 ± 1,79	4,70 ± 1,79*
HPZ+AGM	45,43 ± 35,11* [#]	1,02 ± 0,33	2,40 ± 1,11 [#]
AGM	1,20 ± 0,68 ^{#,°}	1,48 ± 0,80	1,35 ± 0,91 [#]
Mozak			
Kontrola	1,20 ± 0,61	1,20 ± 0,61	1,10 ± 0,27
HPZ	9,66 ± 2,52*	1,80 ± 0,91	2,82 ± 0,99*
HPZ+AGM	3,33 ± 5,14 [#]	1,26 ± 0,45	1,75 ± 0,65
AGM	1,42 ± 0,70 [#]	1,38 ± 0,68	0,96 ± 0,52 ^{#,°}

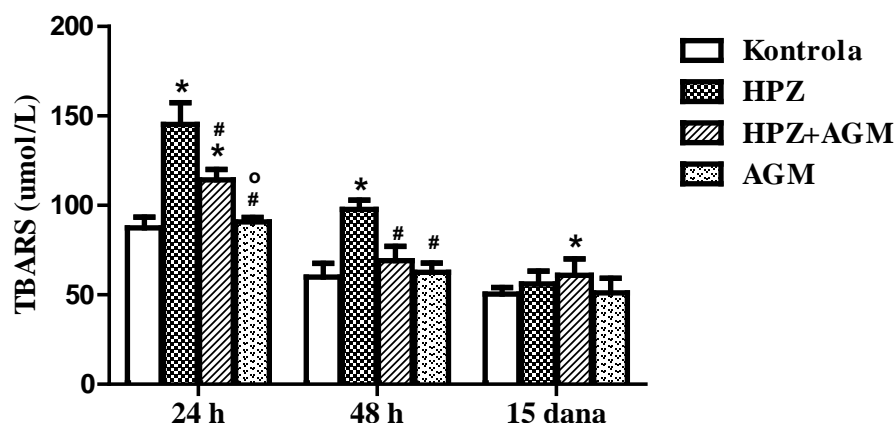
Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = p < 0,05).

V3. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite nakon akutnog i subakutnog tretmana

V3.1. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na sadržaj TBARS u plazmi i tkivu jetre i mozga

V3.1.1. Sadržaj TBARS u plazmi nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati merenja koncentracije TBARS u plazmi kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazani su na *Slici V4*. Jednokratna primena HPZ posle 24 h i 48 h dovodi do povećanja koncentracije TBARS u odnosu na kontrolnu grupu, dok kombinovano davanje HPZ sa AGM smanjuje koncentraciju TBARS u odnosu na HPZ grupu, ali je ona u terminu 24 h značajno veća od koncentracije TBARS u grupi životinja koje su dobile samo AGM. Subakutna primena HPZ sa AGM dovodi do povećanja koncentracije TBARS u plazmi u odnosu na kontrolu.

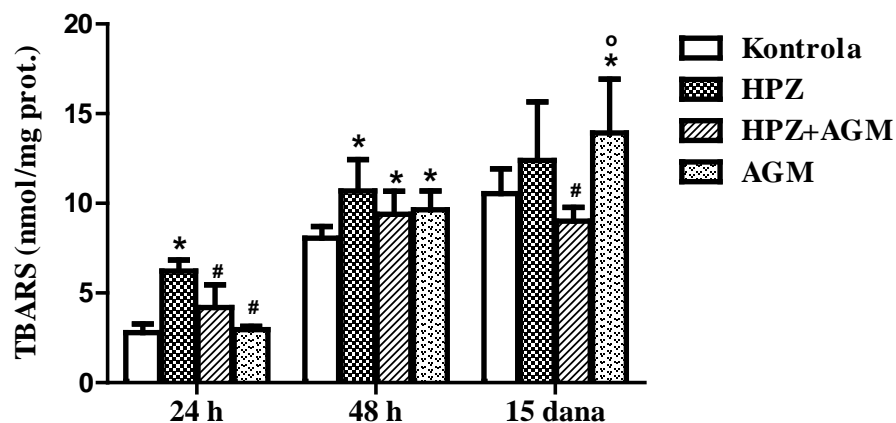


Slika V4. Sadržaj TBARS u plazmi 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (umol/L). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).*

V3.1.2. Sadržaj TBARS u jetri nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Koncentracija TBARS u jetri kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazana je na *Slici V5*. Jednokratna primena HPZ posle 24 h i 48 h povećava koncentraciju TBARS u odnosu na kontrolnu grupu životinja. U eksperimentalnoj grupi koja je dobila HPZ+AGM, kao i čist AGM smanjena je koncentracija TBARS u odnosu na HPZ grupu životinja posle 24 h, dok je u terminu 48 h ova koncentracija značajno veća od kontrolnih vrednosti. Davanje HPZ sa AGM uzastopno 15 dana smanjuje koncentraciju TBARS u odnosu na HPZ grupu, dok

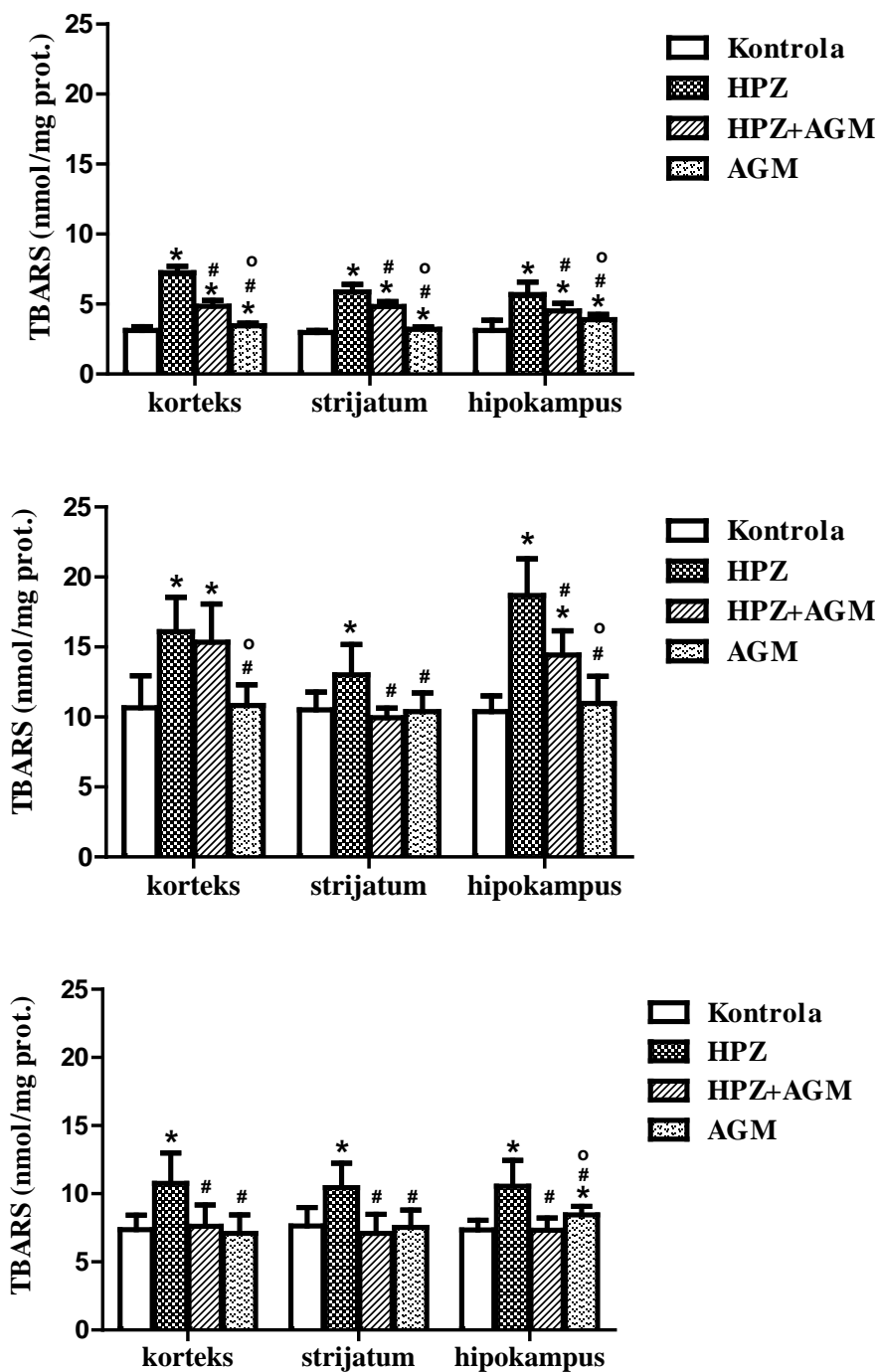
davanje samo AGM povećava koncentraciju TBARS u odnosu na kontrolu, kao i u odnosu na HPZ+AGM grupu.



Slika V5. Sadržaj TBARS u jetri 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (nmol/mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*,#,° = $p < 0,05$).

V3.1.3. Sadržaj TBARS u selektivno osetljivim strukturama mozga (korteks, strijatum, hipokampus) nakon akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati merenja koncentracije TBARS u moždanim strukturama kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana predstavljeni su za koru prednjeg mozga na Slici V6, za strijatum na Slici V7 i za hipokampus na Slici V8. Akutna i subakutna primena HPZ dovodi u svim ispitivanim moždanim strukturama do povećanja koncentracije TBARS u odnosu na kontrolnu grupu, koja se značajno smanjuje nakon davanja AGM uz HPZ (osim u korteksu 48 h nakon tretmana). U svim ispitivanim strukturama mozga je u terminu 24 h nakon akutnog tretmana (HPZ, HPZ+AGM, AGM) koncentracija TBARS značajno veća od kontrolnih vrednosti. U svim strukturama mozga 24 h i 48 h posle akutne, kao 15 dana posle subakutne primene AGM u istoj dozi, koncentracija TBARS je smanjena u odnosu na grupu životinja koje su dobile samo HPZ. Davanje čistog AGM smanjuje koncentraciju TBARS posle 24 h u svim strukturama mozga, posle 48 h u korteksu i hipokampusu, a posle 15 dana samo u hipokampusu, u odnosu na HPZ+AGM grupu.

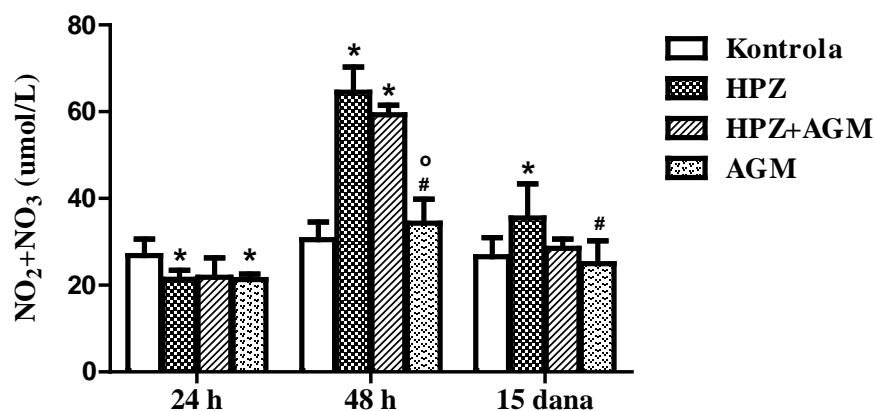


Slike V6-8. Sadržaj TBARS u moždanim strukturama 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (nmol/mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).

V3.2. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na koncentraciju NO_2+NO_3 u plazmi i tkivu jetre i mozga

V3.2.1. Koncentracija NO_2+NO_3 u plazmi nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Izmerene koncentracije NO_2+NO_3 u plazmi kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazane su na *Slici V9*. U terminu 24 h, koncentracija NO_2+NO_3 je značajno niža od kontrolne u grupi sa HPZ i grupi sa AGM. Međutim, 48 h od davanja HPZ, kao i HPZ sa AGM, koncentracija NO_2+NO_3 značajno raste u odnosu na kontrolu, dok je primena čistog AGM dovela do značajnog smanjenja koncentracije NO_2+NO_3 u odnosu na HPZ grupu i HPZ+AGM grupu životinja. Subakutno davanje HPZ takođe dovodi do povećanja koncentracije NO_2+NO_3 u odnosu na kontrolu, a davanje čistog AGM smanjuje koncentraciju NO_2+NO_3 u odnosu na HPZ eksperimentalnu grupu životinja.

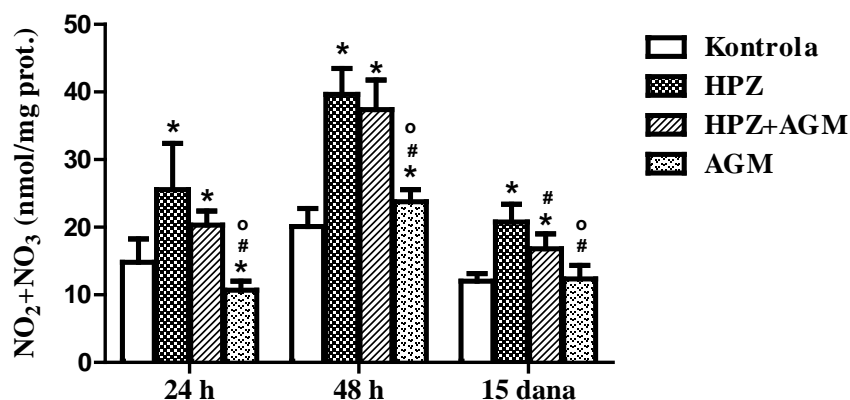


Slika V9. Koncentracija NO_2+NO_3 u plazmi 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana ($\mu\text{mol/L}$). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).*

V3.2.2. Koncentracija NO_2+NO_3 u jetri nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati merenja koncentracije NO_2+NO_3 u jetri kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana predstavljeni su na *Slici V10*. U svim eksperimentalnim grupama životinja (HPZ, HPZ+AGM, AGM) akutni i subakutni tretman u svim terminima dovodi do povećanja koncentracije NO_2+NO_3 u odnosu na kontrole (osim u terminu 15 dana nakon subakutnog davanja čistog AGM). Smanjena koncentracija NO_2+NO_3 u odnosu na HPZ grupu, registrovana je 24 h i 48 h posle akutnog davanja AGM, kao i 15 dana posle subakutnog davanja HPZ sa

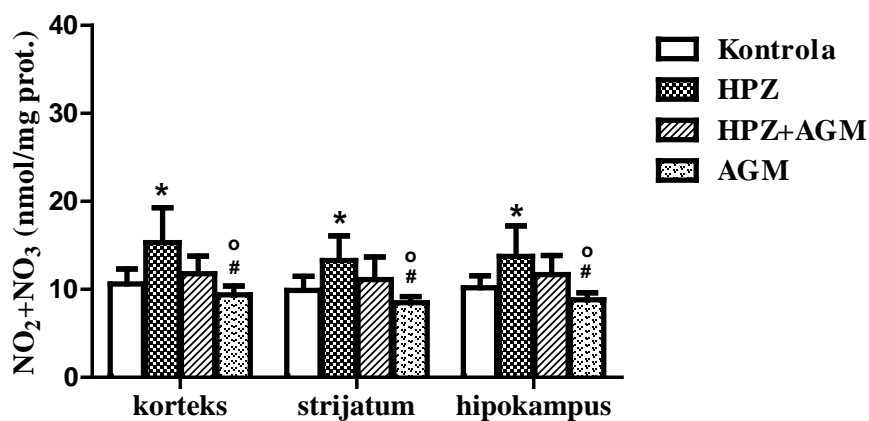
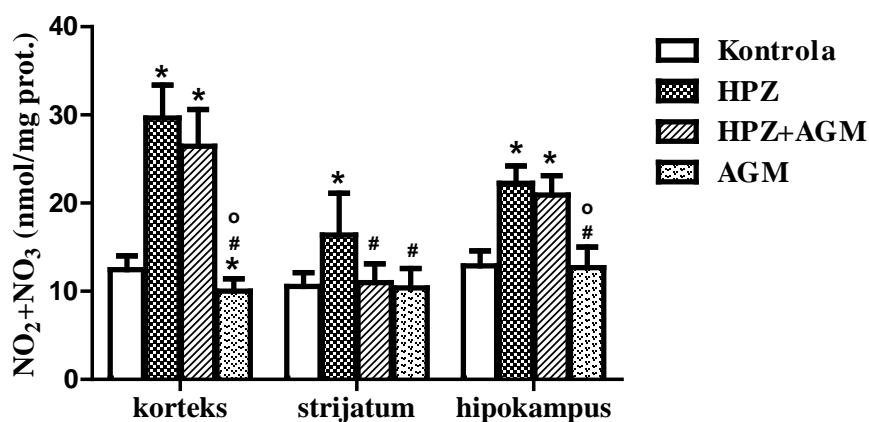
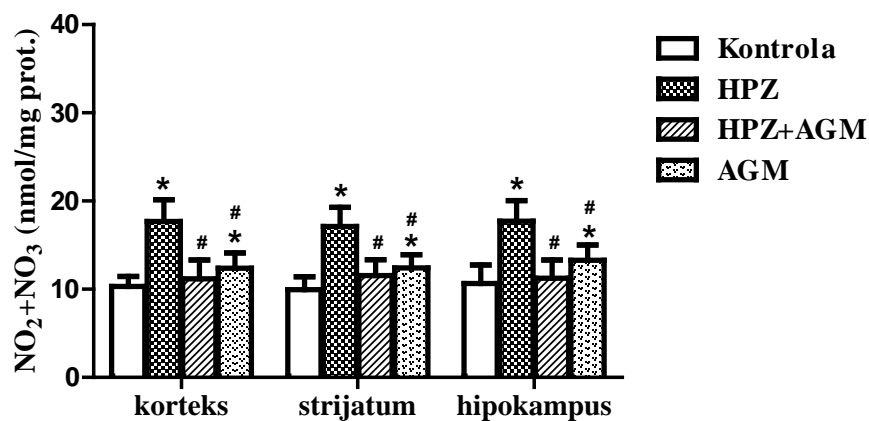
AGM i čistog AGM. U svim praćenim terminima, čist AGM smanjuje koncentraciju NO_2+NO_3 u jetri u odnosu na kombinovano davanje HPZ sa AGM.



Slika V10. Koncentracija NO_2+NO_3 u jetri 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (nmol/mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).

V3.2.3. Koncentracija NO_2+NO_3 u selektivno osetljivim strukturama mozga (korteks, strijatum, hipokampus) nakon akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Koncentracija NO_2+NO_3 u ispitivanim moždanim strukturama kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazana je za koru prednjeg mozga na Slici V11, za strijatum na Slici V12 i za hipokampus na Slici V13. Akutno i subakutno davanje HPZ povećava koncentraciju NO_2+NO_3 u svim ispitivanim moždanim strukturama u odnosu na kontrolne grupe. Međutim, davanje AGM posle HPZ uspešno je smanjilo koncentraciju NO_2+NO_3 u svim strukturama mozga posle 24 h, kao i u strijatumu posle 48 h, u odnosu na HPZ grupu. Primenom čistog AGM posle 24 h dobijena je povećana koncentracija NO_2+NO_3 u odnosu na kontrolu. U svim moždanim regionima je akutno (24 h, 48 h) i subakutno (15 dana) davanje AGM smanjilo koncentraciju NO_2+NO_3 u odnosu na HPZ eksperimentalnu grupu životinja. Ovo smanjenje je značajno niže i u odnosu na HPZ+AGM grupu u terminu 48 h od akutnog tretmana u korteksu i hipokampusu, kao i u terminu 15 dana od subakutnog tretmana u svim ispitivanim regionima mozga.

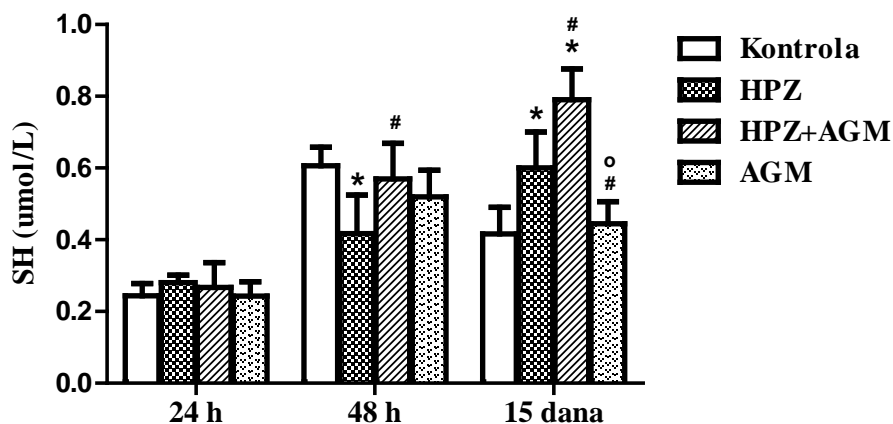


Slike VII-13. Koncentracija NO_2+NO_3 u moždanim strukturama 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (nmol/mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*,#,° = $p < 0,05$).

V3.3. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na sadržaj SH grupa u plazmi

V3.3.1. Sadržaj SH grupa u plazmi nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati sprovedene studije merenja sadržaja SH grupa u plazmi kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazani su na Slici VI4. U terminu 48 h posle jednokratnog davanja HPZ, sadržaj SH grupa bio je značajno niži od kontrolnih vrednosti, dok su primenom HPZ sa AGM dobijene značajno veće vrednosti u odnosu na HPZ grupu u ovom vremenskom terminu. Posle 15 dana od subakutnog davanja čistog HPZ i HPZ sa AGM raste sadržaj SH grupa u odnosu na kontrole. U odnosu na HPZ grupu životinja, subakutni tretman povećava sadržaj SH grupa u HPZ+AGM grupi, dok smanjuje njihov sadržaj u AGM grupi (registrovano smanjenje u ovoj grupi je značajno manje i u odnosu na HPZ+AGM grupu životinja).



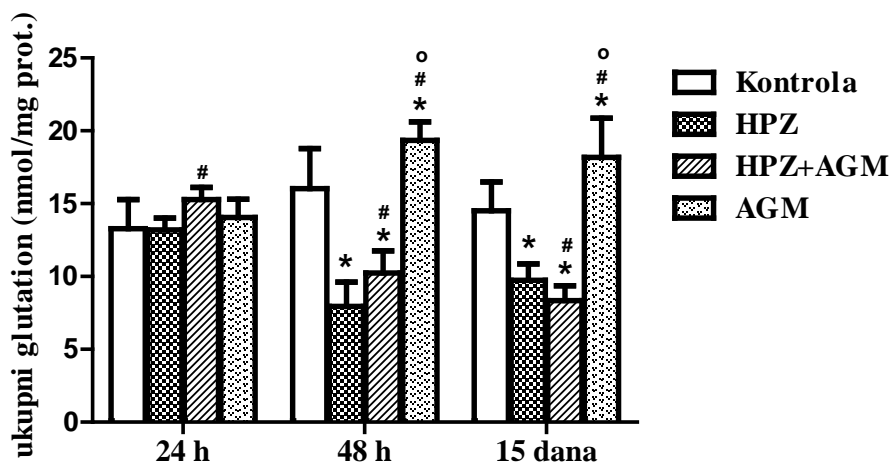
Slika VI4. Sadržaj SH grupa u plazmi 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana ($\mu\text{mol/L}$). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).

V3.4. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na sadržaj ukupnog glutaciona u tkivu jetre i mozga

V3.4.1. Sadržaj ukupnog glutaciona u jetri nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati izmerene koncentracije ukupnog glutaciona u jetri kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazani su na Slici VI5. U eksperimentalnim grupama životinja koje su dobile samo HPZ, kao i HPZ sa AGM, došlo je do značajnog smanjenja koncentracije ukupnog glutaciona posle 48 h i 15 dana od odgovarajućeg tretmana u odnosu na kontrolne grupe životinja. Akutno davanje AGM posle HPZ povećava sadržaj ukupnog glutaciona posle

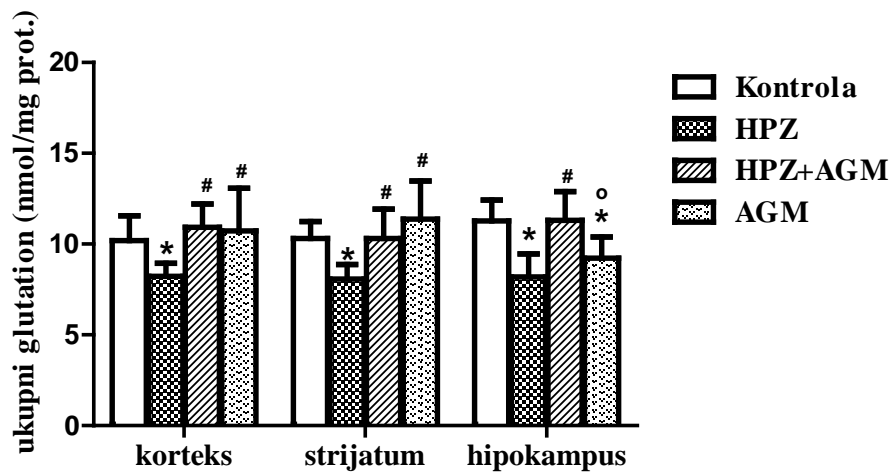
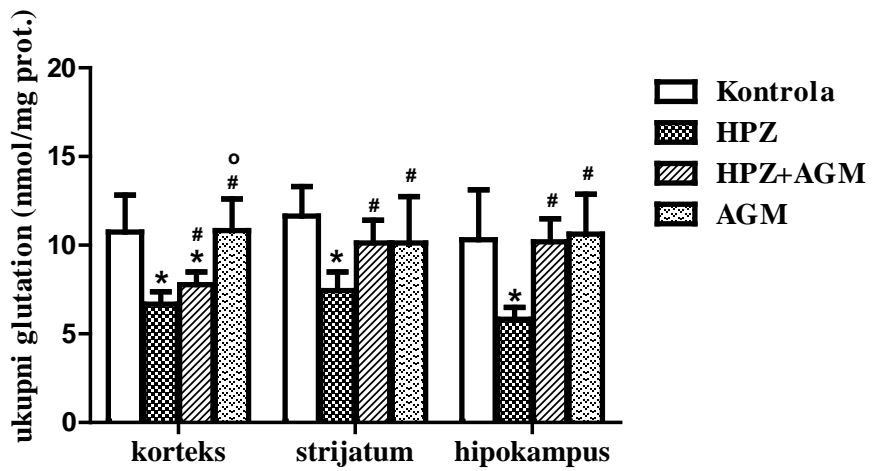
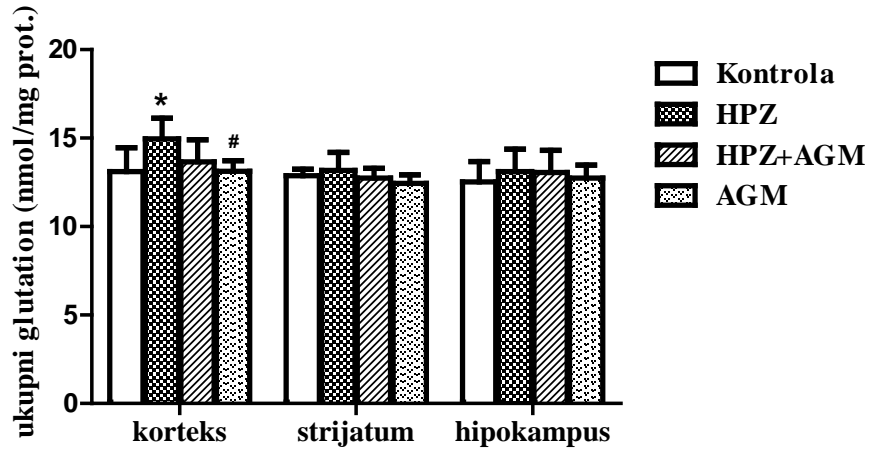
24 h i 48 h, dok subakutni tretman smanjuje koncentraciju ukupnog glutaciona posle 15 dana u odnosu na HPZ grupu. U grupi životinja koje su dobile HPZ sa AGM registrovane su značajno niže koncentracije ukupnog glutaciona posle 48 h i 15 dana u odnosu na kontrolne grupe, dok je primenom čistog AGM došlo do višestrukog povećanja sadržaja ukupnog glutaciona u odnosu na kontrolnu grupu, HPZ grupu i HPZ+AGM grupu životinja.



Slika V15. Sadržaj ukupnog glutaciona u jetri 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (nmol/mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*,#,° = $p < 0,05$).

V3.4.2. Sadržaj ukupnog glutaciona u selektivno osetljivim strukturama mozga (korteks, strijatum, hipokampus) nakon akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati merenja sadržaja ukupnog glutaciona u selektivno osetljivim regionima mozga kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana predstavljani su za koru prednjeg mozga na Slici V16, za strijatum na Slici V17 i za hipokampus na Slici V18. U kori prednjeg mozga je u terminu 24 h pronađen povećan sadržaj ukupnog glutaciona u HPZ grupi u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u AGM grupi došlo do smanjenja koncentracije ukupnog glutaciona u odnosu na HPZ grupu. U terminu 48 h posle akutnog i 15 dana nakon subakutnog davanja HPZ u svim moždanim regionima smanjena je koncentracija ukupnog glutaciona u odnosu na kontrolu, dok kombinovano davanje HPZ sa AGM vraća vrednosti na kontrolne (osim u kori mozga posle 48 h). Davanje čistog AGM u ovim vremenskim terminima povećava koncentraciju ukupnog glutaciona u odnosu na HPZ grupu u svim regionima mozga, osim u hipokampusu 15 dana posle tretmana, gde je izmereno smanjenje sadržaja ukupnog glutaciona u odnosu na kontrolu i HPZ+AGM grupu životinja.



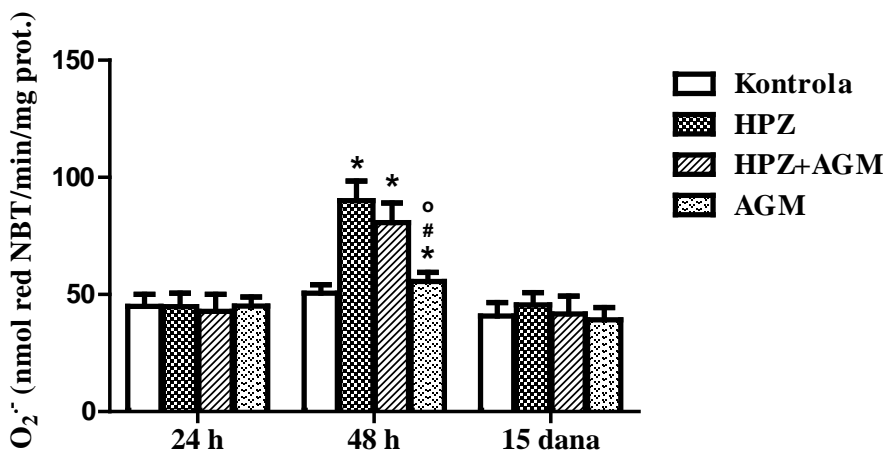
Slike V16-18. Sadržaj ukupnog glutationa u moždanim strukturama 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (nmol/mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD. Simboli označavaju

statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*,#,° = $p < 0,05$).

V3.5. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u tkivu jetre i mozga

V3.5.1. Stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u jetri nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u jetri kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana predstavljeno je na *Slici V19*. Studija pokazuje da su značajne promene registrovane samo u terminu 48 h od odgovarajućeg akutnog tretmana, tako da je povećano stvaranje $O_2^{\cdot-}$ izmereno u svim eksperimentalnim grupama životinja u odnosu na kontrole. Davanje čistog AGM smanjilo je proizvodnju $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na grupe životinja koje su dobile samo HPZ i HPZ sa AGM.

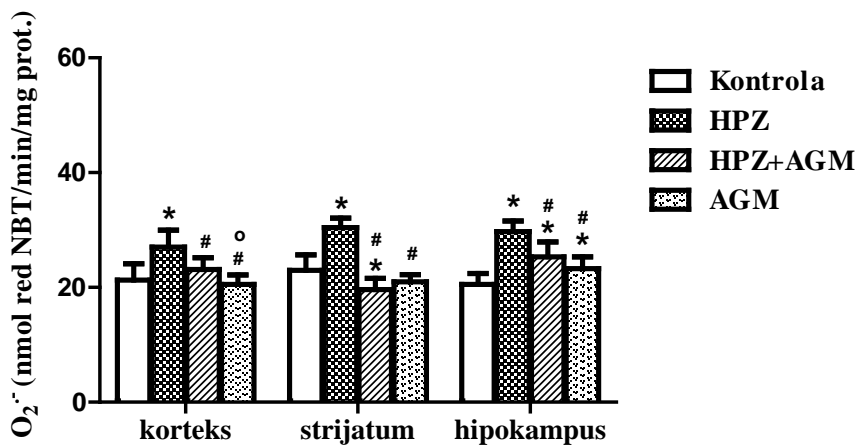
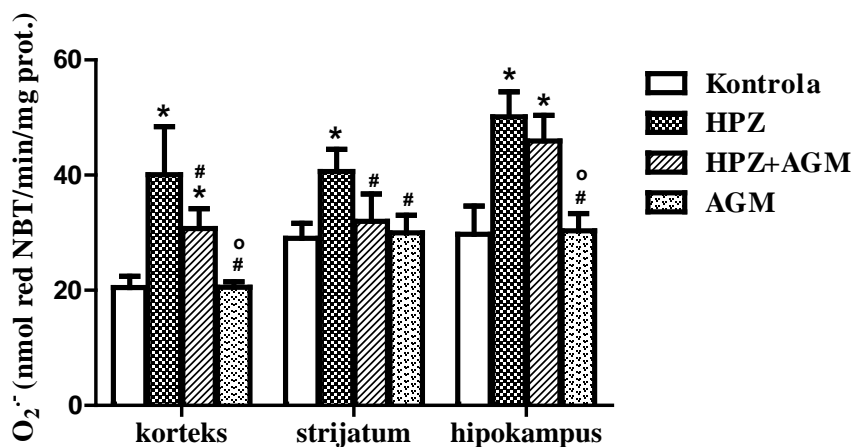
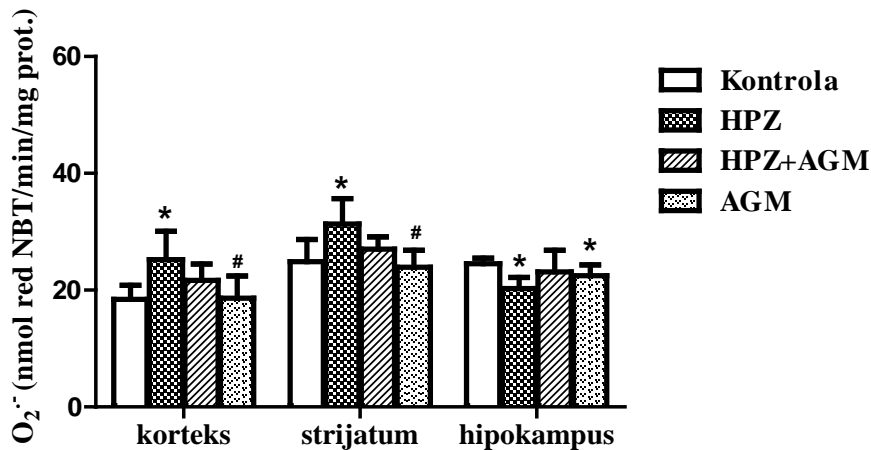


Slika V19. Stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u jetri 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (nmol red NBT/min/mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*,#,° = $p < 0,05$).*

V3.5.2. Stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u selektivno osetljivim strukturama mozga (korteks, strijatum, hipokampus) nakon akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati merenja proizvodnje $O_2^{\cdot-}$ u selektivno osetljivim regionima mozga kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana predstavljeni su za koru prednjeg mozga na *Slici V20*, za strijatum na *Slici V21* i za hipokampus na *Slici V22*. Akutna i subakutna primena HPZ u svim vremenskim terminima dovodi do povećanog stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u svim selektivno osetljivim strukturama mozga u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe (osim u hipokampusu posle 24 h od tretmana, kada je registrovano smanjeno stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na kontrolu). Kombinovano davanje HPZ sa AGM značajno smanjuje stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u korteksu i strijatumu posle 48 h, kao i u svim moždanim regionima posle 15 dana od tretmana u odnosu na HPZ grupu. U grupi životinja koje su dobile samo AGM smanjeno je stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u korteksu i hipokampusu posle 48 h, kao i u kori

prednjeg mozga posle 15 dana, u odnosu na HPZ+AGM eksperimentalnu grupu životinja. Smanjena proizvodnja $O_2^{\cdot-}$ kod životinja tretiranih samo AGM registrovana je u korteksu i strijatumu posle 24 h i u svim strukturama mozga posle 48 h i 15 dana, u odnosu na HPZ grupu životinja.



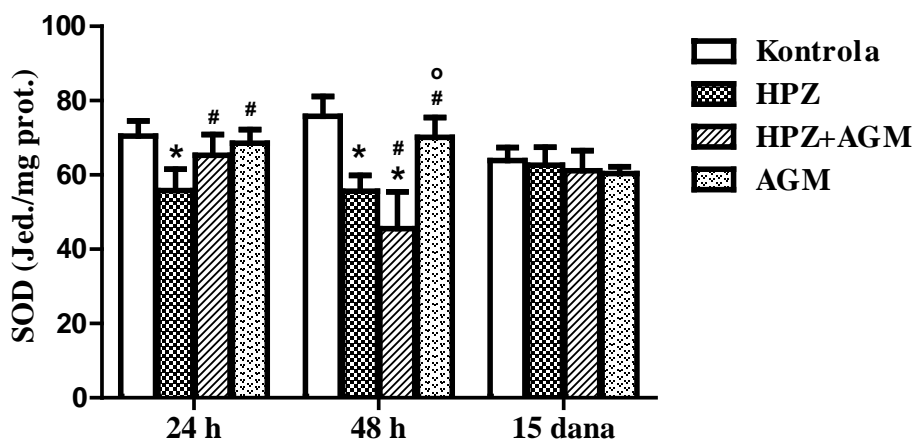
Slike V20-22. Stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u moždanim strukturama 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (nmol red NBT/min/mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju

statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).

V3.6. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na aktivnost SOD u tkivu jetre i mozga

V3.6.1. Aktivnost SOD u jetri nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati merenja aktivnosti ukupne SOD u jetri kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazani su na *Slici V23*. Najveće promene registrovane su nakon akutne primene odgovarajućih supstanci, tako da je smanjena aktivnost enzima pronađena u oba termina (24 h i 48 h) nakon davanja HPZ u odnosu na kontrole. Kada se nakon HPZ životinjama aplikuje i AGM dolazi do povećanja aktivnosti SOD posle 24 h, odnosno do smanjenja aktivnosti enzima posle 48 h od tretmana, u odnosu na grupu pacova koji su dobili samo HPZ. Čist AGM je posle jednokratnog davanja u oba termina doveo do povećanja aktivnosti SOD u odnosu na HPZ grupu životinja, a nakon 48 h je ovo povećanje značajno veće i od HPZ+AGM grupe.

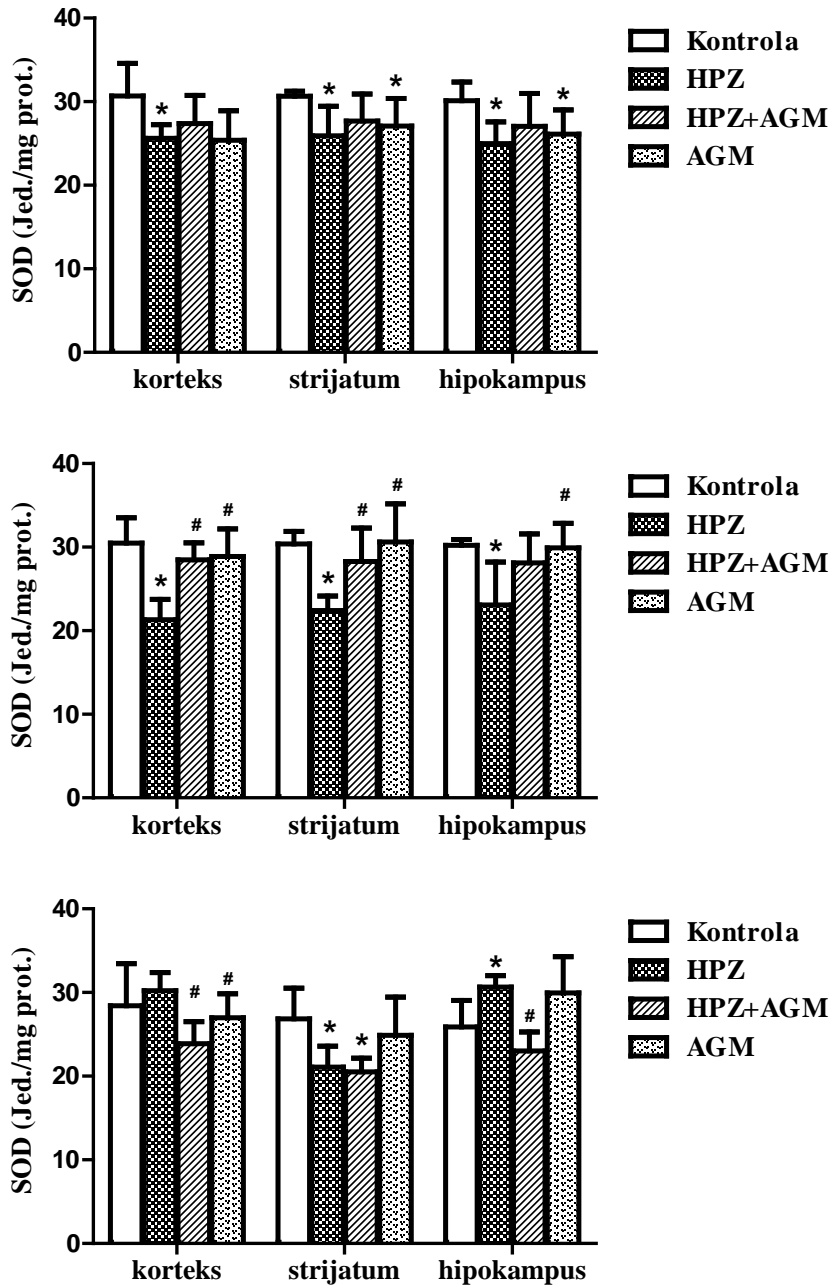


Slika V23. Aktivnost SOD u jetri 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (Jed./mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).*

V3.6.2. Aktivnost SOD u selektivno osetljivim strukturama mozga (korteks, strijatum, hipokampus) nakon akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati određivanja aktivnosti SOD u ispitivanim strukturama mozga kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana predstavljeni su za koru prednjeg mozga na *Slici V24*, za strijatum na *Slici V25* i za hipokampus na *Slici V26*. Akutno davanje HPZ posle 24 h i 48 h dovodi do smanjenja aktivnosti SOD u svim moždanim regionima u odnosu na kontrole. Davanje AGM posle HPZ povećava aktivnost enzima samo u korteksu i strijatumu 48 h posle tretmana u odnosu na HPZ grupu. Kod životinja koje su dobile samo AGM posle 24 h

zmanjena je aktivnost SOD u strijatumu i hipokampusu u odnosu na kontrolu, dok je nakon 48 h povećana aktivnost enzima registrovana u svim moždanim regionima u odnosu na HPZ grupu. Subakutna primena HPZ posle 15 dana smanjuje aktivnost SOD u strijatumu, dok povećava aktivnost enzima u hipokampusu u odnosu na odgovarajuće kontrole. Davanja HPZ sa AGM dovelo je do smanjenja aktivnosti SOD posle subakutne primene u korteksu i hipokampusu u odnosu na HPZ grupu.



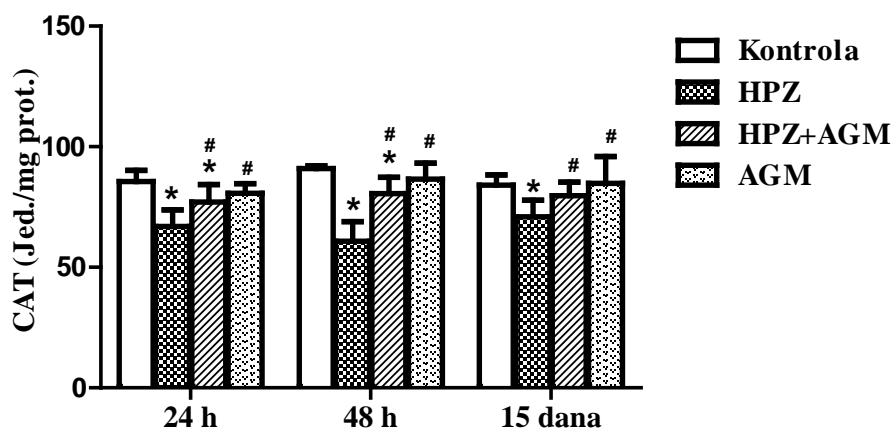
Slike V24-26. Aktivnost SOD u moždanim strukturama 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (Jed./mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu

razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*,#,° = $p < 0,05$).

V3.7. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na aktivnost CAT u tkivu jetre i mozga

V3.7.1. Aktivnost CAT u jetri nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Aktivnost CAT u jetri kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazana je na Slici V27. U svim ispitivanim terminima je aktivnost enzima značajno niža posle davanja HPZ i HPZ+AGM u odnosu na kontrolne vrednosti (osim u HPZ+AGM grupi posle 15 dana). Kombinovano davanje HPZ i AGM, kao i davanje čistog AGM povećava aktivnost enzima u odnosu na HPZ grupu u svim terminima koji su praćeni.

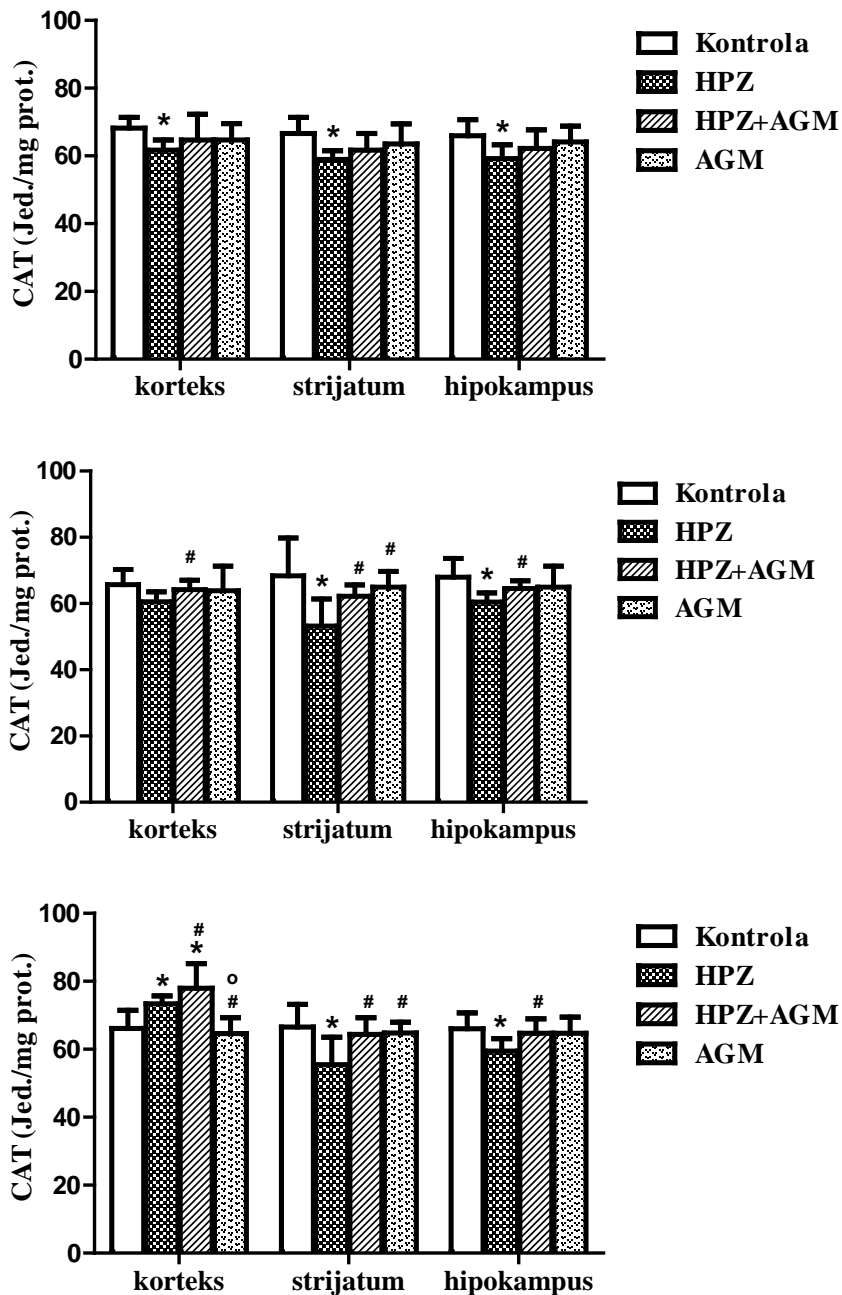


Slika V27. Aktivnost CAT u jetri 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (Jed./mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*,#,° = $p < 0,05$).

V3.7.2. Aktivnost CAT u selektivno osetljivim strukturama mozga (korteks, strijatum, hipokampus) nakon akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati određivanja aktivnosti CAT u moždanim strukturama kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana predstavljeni su za koru prednjeg mozga na Slici V28, za strijatum na Slici V29 i za hipokampus na Slici V30. Akutno davanje HPZ smanjuje aktivnost CAT u svim regionima mozga u odnosu na kontrole (osim u korteksu posle 48 h). U terminu 48 h od akutnog davanja AGM nakon HPZ, aktivnost CAT se u svim moždanim strukturama vraća na kontrolne vrednosti, koje su značajno veće u odnosu na HPZ grupu životinja. Ovaj trend povećanja aktivnosti enzima u HPZ+AGM grupi održava se u svim moždanim regionima i 15 dana nakon

subakutnog tretmana u odnosu na HPZ grupu životinja. Subakutna primena HPZ posle 15 dana u korteksu povećava, dok u strijatumu i hipokampusu smanjuje aktivnost CAT u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe.

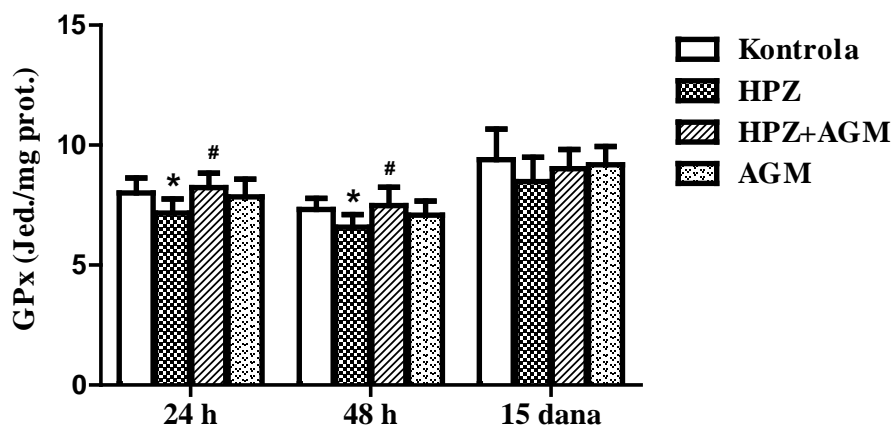


Slike V28-30. Aktivnost CAT u moždanim strukturama 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (Jed./mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).

V3.8. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na aktivnost GPx u tkivu jetre i mozga

V3.8.1. Aktivnost GPx u jetri nakon akutnog (24 h, 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

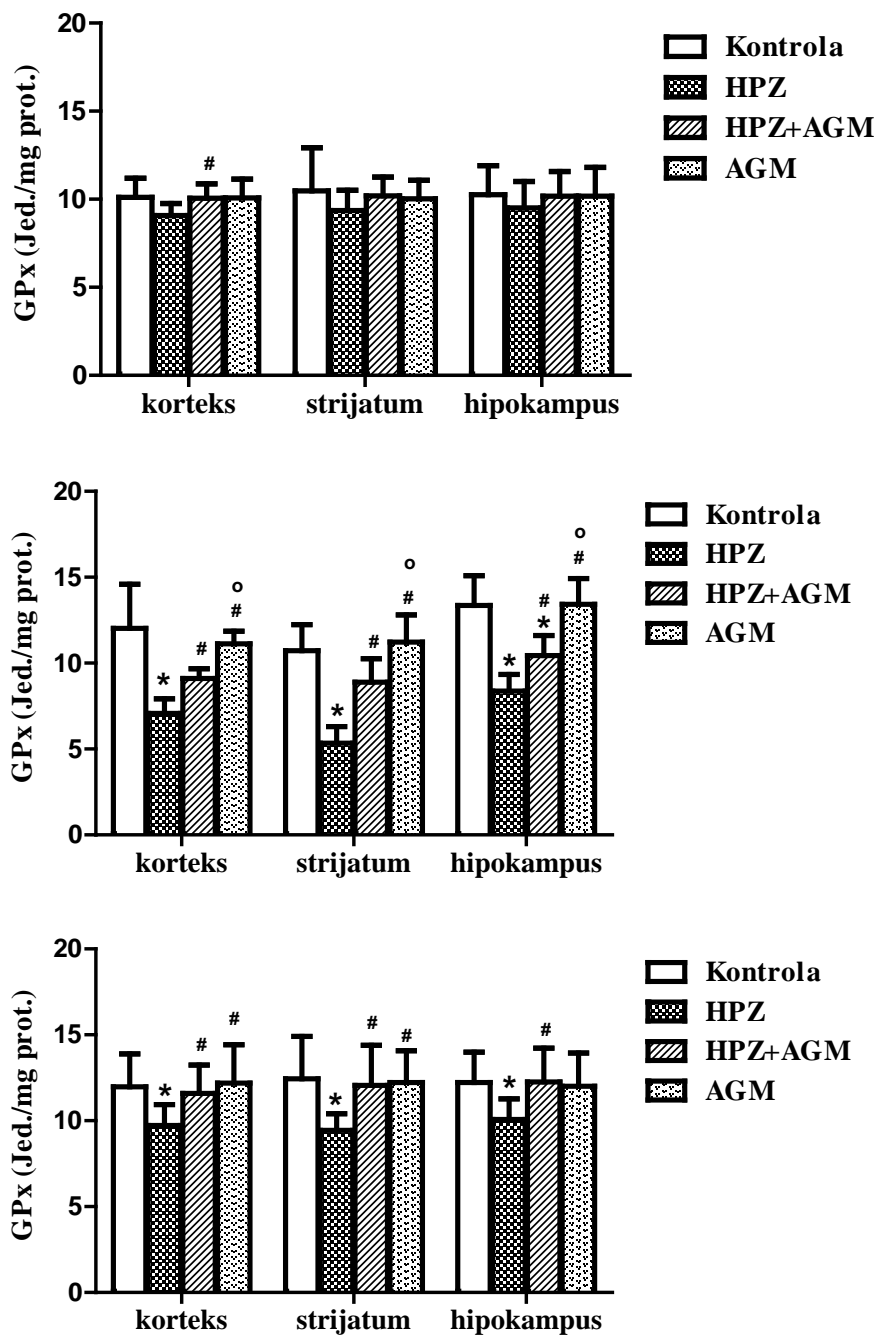
Rezultati određivanja aktivnosti GPx u jetri kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana predstavljeni su na *Slici V31*. Promene registrovane u aktivnosti GPx u jetri dešavaju se samo kod akutnog tretmana, kada je u oba termina (24 h, 48 h) posle davanja HPZ aktivnost enzima smanjena, dok primena AGM uz HPZ vraća vrednosti na kontrolne.



Slika V31. Aktivnost GPx u jetri 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (Jed./mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).

V3.8.2. Aktivnost GPx u selektivno osetljivim strukturama mozga (korteks, strijatum, hipokampus) nakon akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Aktivnost GPx u ispitivanim moždanim strukturama kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazana je za koru prednjeg mozga na *Slici V32*, za strijatum na *Slici V33* i za hipokampus na *Slici V34*. Studija pokazuje značajno smanjenje aktivnosti GPx u svim ispitivanim strukturama mozga 48 h i 15 dana od davanja HPZ u odnosu na odgovarajuće kontrole. U ovim vremenskim terminima je kombinovano davanje HPZ sa AGM vratilo vrednosti enzima na kontrolne u svim moždanim regionima. Davanje čistog AGM dovodi do povećanja aktivnosti enzima u odnosu na HPZ grupu i HPZ+AGM grupu životinja 48 h posle tretmana u svim strukturama mozga, dok je posle 15 dana došlo do povećanja aktivnost enzima samo u korteksu i strijatumu u odnosu na HPZ grupu životinja.

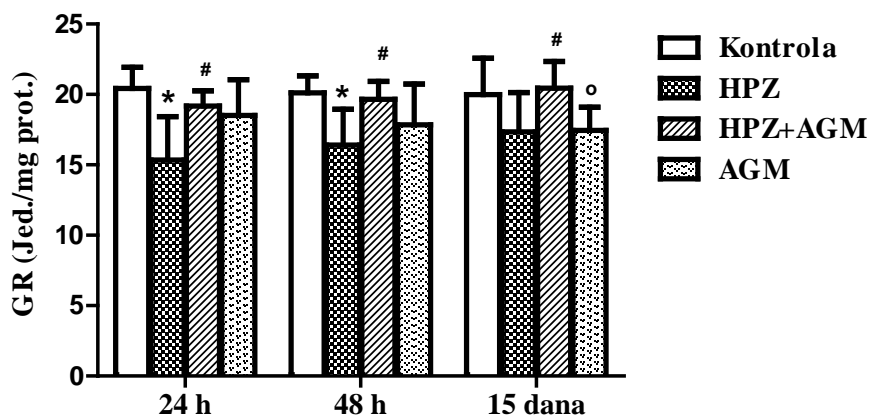


Slike V32-34. Aktivnost GPx u moždanim strukturama 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (Jed./mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*,#,° = $p < 0,05$).

V3.9. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na aktivnost GR u tkivu jetre i mozga

V3.9.1. Aktivnost GR u jetri nakon akutnog (24h, 48h) i subakutnog (15 dana) tretmana

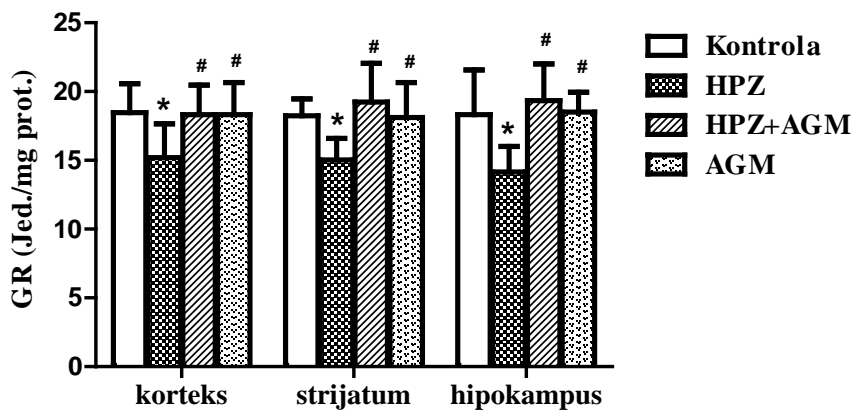
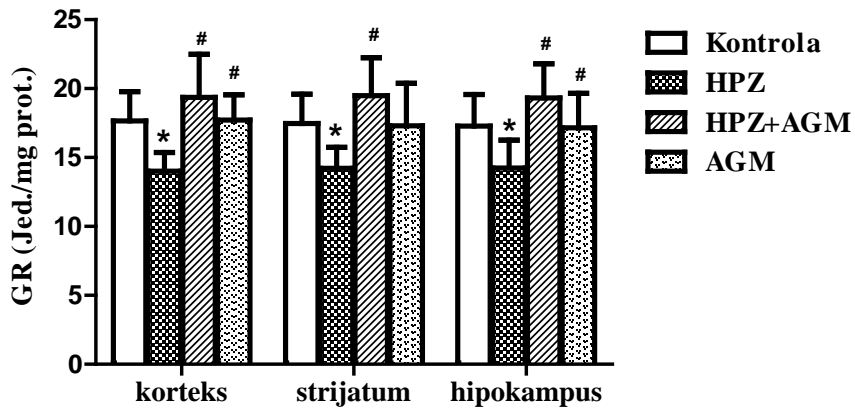
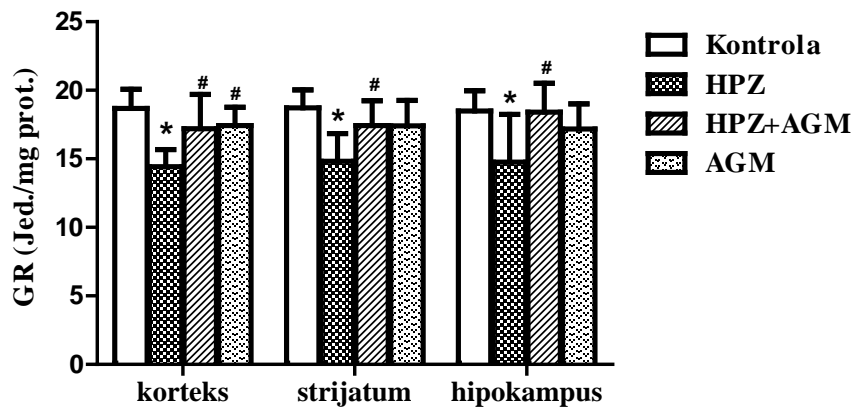
Rezultati aktivnosti GR u jetri kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana prikazani su na *Slici V35*. Aktivnost GR smanjena je posle akutnog davanja HPZ (24 h i 48 h), dok davanje AGM posle HPZ vraća aktivnost enzima na kontrolne vrednosti, kako posle akutnog, tako i nakon subakutnog tretmana.



Slika V35. Aktivnost GR u jetri 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (Jed./mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).

V3.9.2. Aktivnost GR u selektivno osetljivim strukturama mozga (korteks, strijatum, hipokampus) nakon akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana

Rezultati aktivnosti GR u ispitivanim strukturama mozga kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa nakon akutnog i subakutnog tretmana predstavljeni su za koru prednjeg mozga na *Slici V36*, za strijatum na *Slici V37* i za hipokampus na *Slici V38*. U svim ispitivanim selektivno osetljivim strukturama mozga akutno i subakutno davanje HPZ smanjuje aktivnost GR, koje se vraća na kontrolni nivo posle davanja AGM uz HPZ. Primena samo AGM značajno povećava aktivnost enzima u korteksu posle 24 h, korteksu i hipokampusu posle 48 h, kao i svim moždanim regionima (korteks, strijatum, hipokampus) posle 15 dana od tretmana u odnosu na HPZ grupu životinja.



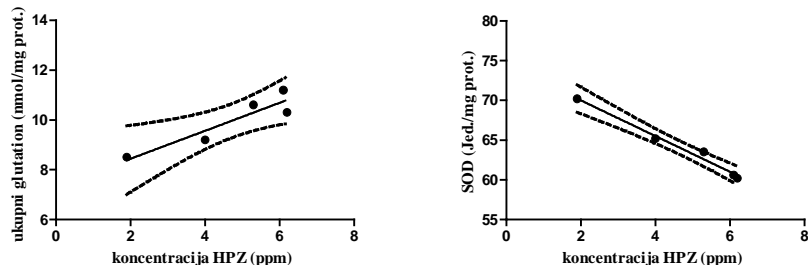
Slike V36-38. Aktivnost GR u moždanim strukturama 24 h i 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana (Jed./mg prot.). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD. Simboli označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu (*), grupu životinja koja je dobila HPZ (#), kao i razliku između grupe koja je dobila samo HPZ u odnosu na grupu koja je dobila HPZ+AGM (°). (*, #, ° = $p < 0,05$).

V4. Primena Pearsonove parametarske korelativne analize u jetri i mozgu pacova nakon akutnog i subakutnog davanja HPZ

V4.1. Korelacije između koncentracije HPZ i parametara oksidativnog stresa/AOS u jetri kod akutne i subakutne primene HPZ

Poređenjem promena koncentracije HPZ i parametara oksidativnog stresa izvedeno je primenom parametarske Pearsonove korelacije. Dobijeni rezultati u jetri prikazani su na Slikama V39 i V40.

Pearsonova korelacija pokazala je da u jetri 15 dana nakon subakutne primene HPZ postoji pozitivna korelacija između koncentracije HPZ i sadržaja ukupnog glutaciona (Slika V39; $r = 0,9240$; $p < 0,05$), odnosno negativna korelacija između koncentracije HPZ i aktivnosti SOD (Slika V40; $r = -0,9917$; $p < 0,001$).



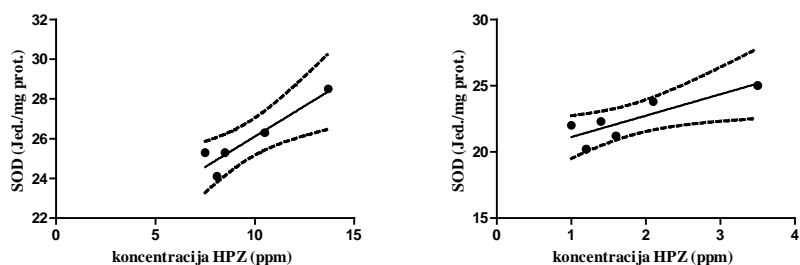
Slike V39-40. Korelacija između koncentracije HPZ (ppm) i koncentracije ukupnog glutaciona (nmol/mg prot.) (39), odnosno aktivnosti SOD (Jed./mg prot.) (40) u jetri 15 dana nakon subakutnog davanja HPZ.

V4.2. Korelacije između koncentracije HPZ i parametara oksidativnog stresa/AOS u mozgu kod akutne i subakutne primene HPZ

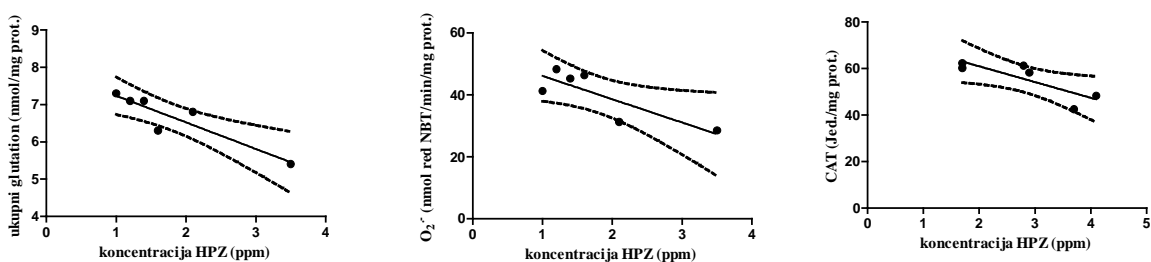
Parametarska Pearsonova korelacija primenjena je između koncentracije HPZ i parametara oksidativnog stresa. Dobijeni rezultati u selektivno osetljivim strukturama mozga prikazani su na Slikama V41-45.

Paralelno sa povećanjem koncentracije HPZ, povećava se i aktivnost SOD u kori prednjeg mozga nakon 24 h (Slika V41; $r = 0,9395$; $p < 0,05$) i u strijatumu životinja 48 h nakon davanja HPZ (Slika V42; $r = 0,8490$; $p < 0,05$).

Korelativna analiza pokazala je negativnu korelaciju između koncentracije HPZ i sadržaja ukupnog glutaciona (Slika V43; $r = -0,9158$), odnosno stvaranja O_2^{\bullet} u kori mozga 48 h od akutne (Slika V44; $r = -0,8271$), kao i između koncentracije HPZ i aktivnosti CAT u strijatumu životinja nakon 15 dana od subakutne (Slika V45; $r = -0,8304$) primene HPZ. Između ovih parametara postoji negativna korelacija ($p < 0,05$).



Slike V41-42. Korelacija između koncentracije HPZ (ppm) i aktivnosti SOD (Jed./mg prot.) u korteksu 24 h (41) i strijatumu 48 h (42) posle akutne primene HPZ.



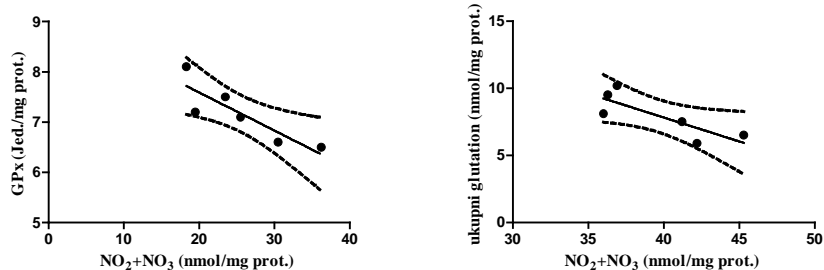
Slike V43-45. Korelacija između koncentracije HPZ (ppm) i različitih parametara oksidativnog stresa/AOS [sadržaja ukupnog glutaciona (nmol/mg prot.) (43) i stvaranja $O_2^{\cdot-}$ (nmol red NBT/min/mg prot.) (44) u korteksu posle 48 h, kao i aktivnosti CAT (Jed./mg prot.) u strijatumu posle 15 dana (45)] nakon davanja HPZ.

V4.3. Korelacije između različitih parametara oksidativnog stresa/AOS u jetri kod akutne i subakutne primene HPZ

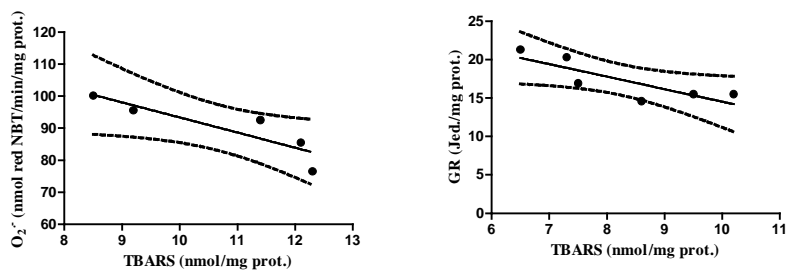
Primenom parametarske Pearsonove korelacije ispitali smo vezu između različitih parametara oksidativnog stresa i AOS pri akutnom i subakutnom davanju HPZ. Dobijeni rezultati za jetru prikazani su na Slikama V46-51.

Ispitivanjem veze između koncentracije NO_2+NO_3 i aktivnosti GPx Pearsonovom parametarskom korelacijom dobijena je negativna korelacija u jetri 24 h nakon davanja HPZ (Slika V46; $r = -0,8717$; $p < 0,05$). U istom organu je u terminu 48 h nakon akutne primene HPZ takođe uočena negativna korelacija između koncentracije NO_2+NO_3 i sadržaja ukupnog glutaciona (Slika V47; $r = -0,8152$; $p < 0,05$), odnosno koncentracije TBARS i stvaranja $O_2^{\cdot-}$ (Slika V48; $r = -0,8832$; $p < 0,05$).

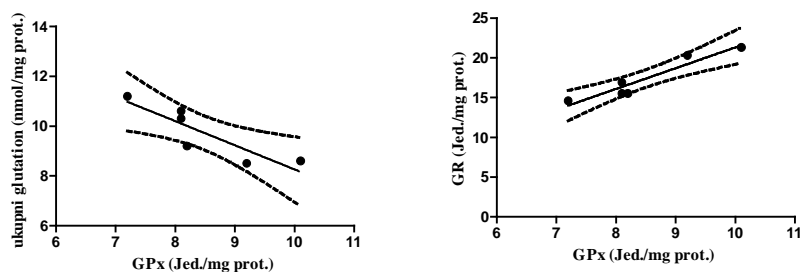
Pearsonovom korelacijom dobijeno je da je u jetri životinja 15 dana nakon davanja HPZ koncentracija TBARS u negativnoj korelaciji sa aktivnošću GR (Slika V49; $r = -0,8237$; $p < 0,05$), kao i aktivnost GPx sa sadržajem ukupnog glutaciona (Slika V50; $r = -0,8764$; $p < 0,05$), dok je u pozitivnoj korelaciji aktivnost GPx sa aktivnošću GR (Slika V51; $r = 0,9492$; $p < 0,01$).



Slike V46-47. Korelacija između koncentracije NO₂+NO₃ (nmol/mg prot.) i različitih parametara AOS u jetri [aktivnosti GPx (Jed./mg prot.) posle 24 h (46), odnosno sadržaja ukupnog glutaciona (nmol/mg prot.) posle 48 h (47)] nakon akutnog davanja HPZ.



Slike V48-49. Korelacija između koncentracije TBARS (nmol/mg prot.) i različitih parametara oksidativnog stresa/AOS u jetri [stvaranja O₂⁻ (nmol red NBT/min/mg prot.) posle 48 h (48), odnosno aktivnosti GR (Jed./mg prot.) posle 15 dana (49)] nakon davanja HPZ.



Slike V50-51. Korelacija između aktivnosti GPx (Jed./mg prot.) i različitih parametara AOS u jetri [sadržaja ukupnog glutaciona (nmol/mg prot.) (50), odnosno aktivnosti GR (Jed./mg prot.) (51)] 15 dana nakon subakutnog davanja HPZ.

V4.4. Korelacije između različitih parametara oksidativnog stresa/AOS u mozgu kod akutne i subakutne primene HPZ

Veza između različitih parametara oksidativnog stresa i AOS pri akutnom i subakutnom davanju HPZ u selektivno osetljivim moždanim strukturama pacova ispitana je primenom Pearsonove korelacije i prikazana na *Slikama V52-65*.

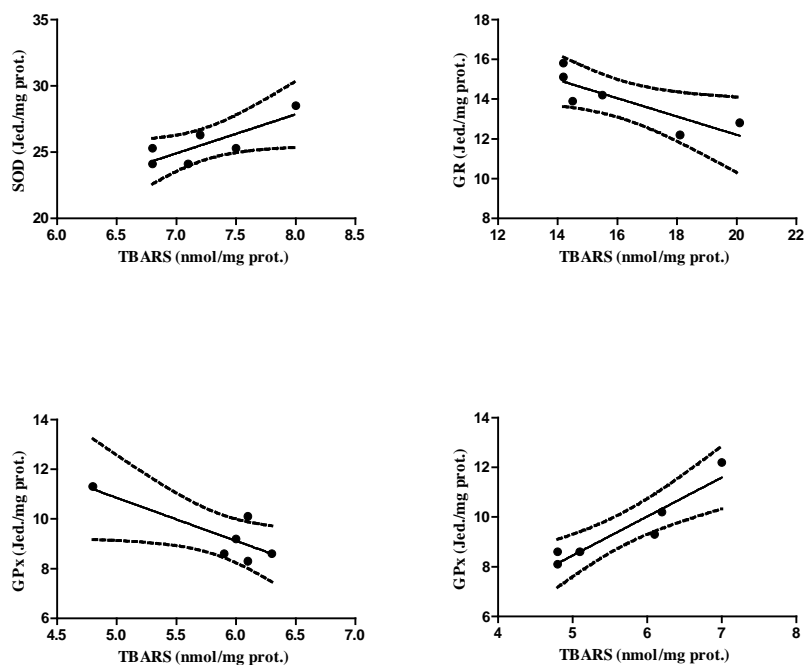
Korelativna analiza pokazala je da je koncentracija TBARS u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću SOD u korteksu (*Slika V52*; $r = 0,8197$; $p < 0,05$), kao i aktivnošću GPx u hipokampusu (*Slika V55*; $r = 0,9377$; $p < 0,01$) 24 h nakon akutne primene HPZ. Negativna korelacija postoji između koncentracije TBARS i aktivnosti GR (*Slika V53*; $r = -0,8338$; $p < 0,05$) u korteksu 48 h nakon davanja HPZ, kao i aktivnošću GPx u strijatumu (*Slika V54*; $r = -0,8127$; $p < 0,05$) 24 h posle primene HPZ.

Paralelno sa povećanim stvaranjem O_2^* , povećava se i aktivnost CAT u strijatumu 24 h nakon akutnog davanja HPZ (*Slika V56*; $r = 0,9197$; $p < 0,05$), dok se aktivnost GPx smanjuje u kori prednjeg mozga životinja 15 dana nakon subakutne primene HPZ (*Slika V57*; $r = -0,9373$; $p < 0,01$).

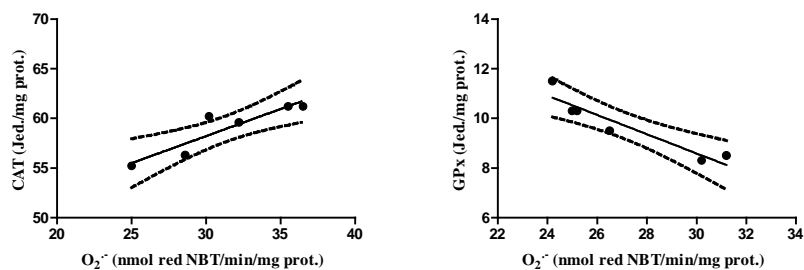
Pearsonovom korelacijom dobijeno je da je koncentracija NO_2+NO_3 u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem ukupnog glutaciona u korteksu (*Slika V58*; $r = 0,8515$; $p < 0,05$), kao i sa aktivnošću SOD u hipokampusu (*Slika V59*; $r = 0,9167$; $p < 0,05$) 48 h posle akutne primene HPZ, dok je u negativnoj korelaciji sa aktivnošću CAT u strijatumu (*Slika V60*; $r = -0,8691$; $p < 0,05$) 15 dana nakon subakutne primene HPZ.

Pearsonovom korelacionom analizom uočena je pozitivna korelacija između sadržaja ukupnog glutaciona i aktivnosti GPx u strijatumu 48 h nakon davanja HPZ (*Slika V61*; $r = 0,8159$; $p < 0,05$).

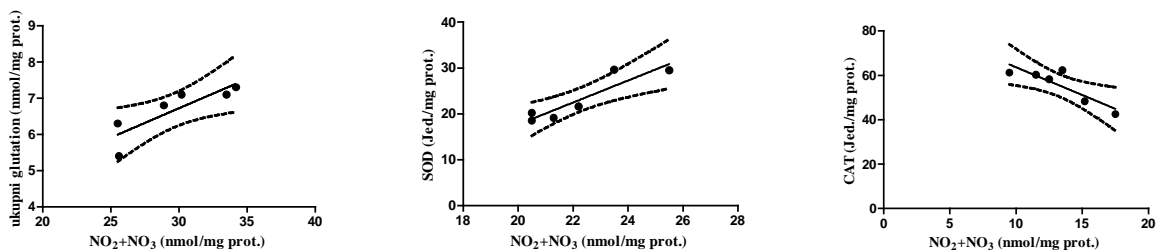
Korelativna analiza pokazala je da je koncentracija SOD u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću CAT u korteksu (*Slika V62*; $r = 0,8924$; $p < 0,05$) i hipokampusu (*Slika V63*; $r = 0,8400$; $p < 0,05$) 48 h posle akutnog davanja HPZ, dok je u negativnoj korelaciji sa aktivnošću GPx u strijatumu (*Slika V64*; $r = -0,8641$; $p < 0,05$) 48 h posle akutnog davanja HPZ i aktivnošću CAT u korteksu (*Slika V65*; $r = -0,9090$; $p < 0,05$) 15 dana nakon subakutnog davanja HPZ.



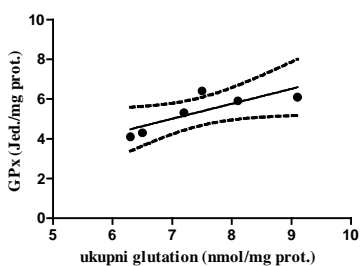
Slike V52-55. Korelacija između koncentracije TBARS (nmol/mg prot.) i različitih parametara AOS u mozgu [aktivnosti SOD (Jed./mg prot.) u korteksu posle 24 h (52), aktivnosti GR (Jed./mg prot.) u korteksu posle 48 h (53), kao i aktivnosti GPx (Jed./mg prot.) u strijatumu (54) i hipokampusu (55) posle 24 h] od akutne primene HPZ.



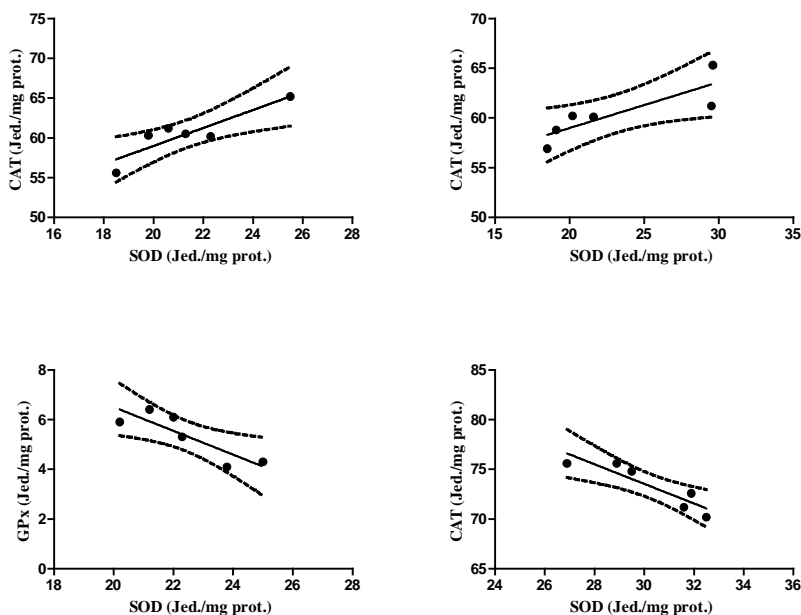
Slike V56-57. Korelacija između proizvodnje $O_2^{\bullet-}$ (nmol red NBT/min/mg prot.) i različitih parametara AOS u mozgu [aktivnosti CAT (Jed./mg prot.) u strijatumu posle 24 h (56), odnosno aktivnosti GPx (Jed./mg prot.) u korteksu posle 15 dana (57)] od davanja HPZ.



Slike V58-60. Korelacija između koncentracije NO₂+NO₃ (nmol/mg prot.) i različitih parametara AOS u mozgu [sadržaja ukupnog glutationa (nmol/mg prot.) u korteksu (58) i aktivnosti SOD (Jed./mg prot.) u hipokampusu (59) posle 48 h, odnosno aktivnosti CAT (Jed./mg prot.) u strijatumu (60) posle 15 dana] od davanja HPZ.



Slika V61. Korelacija između koncentracije ukupnog glutationa (nmol/mg prot.) i aktivnosti GPx (Jed./mg prot.) u strijatumu posle 48 h od akutne primene HPZ.

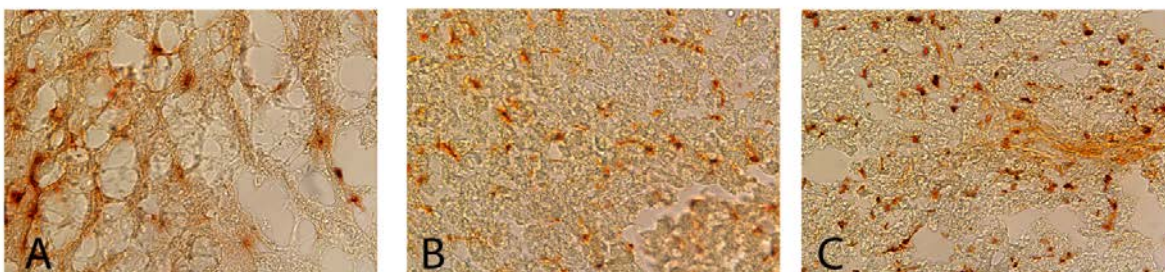


Slike V62-65. Korelacija između aktivnosti SOD (Jed./mg prot.) i različitih parametara AOS u mozgu [aktivnosti CAT (Jed./mg prot.) u korteksu (62) i hipokampusu (63) posle 48 h od akutnog, odnosno u korteksu (65) posle 15 dana od subakutnog davanja HPZ, kao i aktivnosti GPx (Jed./mg prot.) u strijatumu (64) 48 h od akutne primene HPZ].

V5. Efekat HPZ na imunomorfološke promene u jetri i mozgu Wistar pacova

V5.1. Ekspresija ED1 molekula u jetri pacova

Imunohistohemijska reakcija sa ED1 monoklonskim antitelom u jetri kod kontrolne grupe i eksperimentalnih grupa nakon akutnog davanja HPZ prikazana je na *Slici V66*. Ekspresija ED1 molekula u jetri kontrolnih životinja bila je veoma diskretna (+/-). Kod životinja koje su jednokratno dobile HPZ nakon 48 h registrovana je jača pozitivnost (++) ED1 molekula, u odnosu na grupu životinja koje su žrtvovane 24 h nakon dobijanja HPZ (+).



Slika V66. Imunohistohemijsko bojenje jetre pacova primenom ED1 monoklonskog antitela u kontroli (A), 24 h nakon primene HPZ (B) i 48 h nakon davanja HPZ (C). Uvećanje x 40. Podaci su statistički upoređeni između grupa korišćenjem Studentovog t-testa ($p < 0,05$).

V5.2. Ekspresija GFAP u mozgu pacova

Imunohistohemijske promene nakon bojenja mozga pacova sa GFAP poliklonskim antitelom kod kontrolne i eksperimentalnih grupa koje su akutno dobile HPZ prikazane su na *Slici V67*. Ekspresija GFAP molekula u kontrolnoj grupi bila je umerenog intenziteta (+). U pojedinim zonama mozga zapažena je povećana imunoreaktivnost glijalnih ćelija, u smislu povećanja broja GFAP pozitivnih ćelija i intenziteta imunohistohemijske reakcije 24 h (++) i 48 h (+) nakon akutnog davanja HPZ. Astrociti u kontroli i eksperimentalnoj grupi 24 h nakon davanja HPZ bili su fibroznog tipa sa dugim nastavcima i malim telom, dok su astrociti u grupi životinja 48 h nakon davanja HPZ reaktivnog, protoplazmatičnog tipa sa malim nastavcima i velikim telom ćelije.

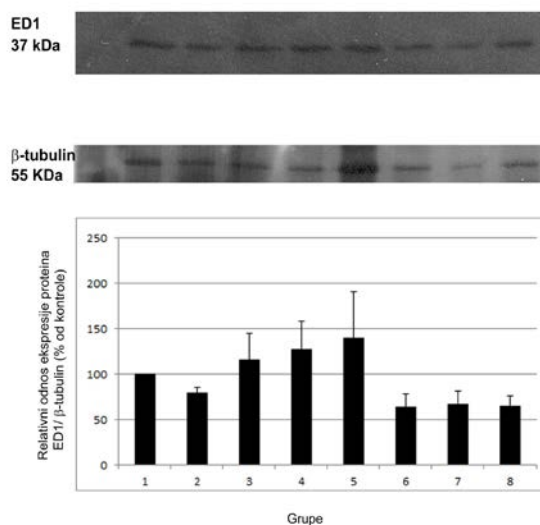


Slika V67. Imunohistohemijsko bojenje mozga pacova primenom GFAP monoklonskog antitela u kontroli (A), 24 h nakon primene HPZ (B) i 48 h nakon davanja HPZ (C). Uvećanje x 40. Podaci su statistički upoređeni između grupa korišćenjem Studentovog t-testa ($p < 0,05$).

V6. Western blot analiza

V6.1. Elektroforetski profil ED1 molekula

Elektroforetski profil ED1 molekula u jetri 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa životinja prikazan je na Slici V68. Konstatovane razlike u profilu ED1 molekula najizraženije su u grupama sa AGM 48 h posle akutnog tretmana (HPZ+AGM i AGM), kao i u kontrolnoj grupi životinja koja je subakutno 15 dana dobijala 0,9 % fiziološki rastvor.

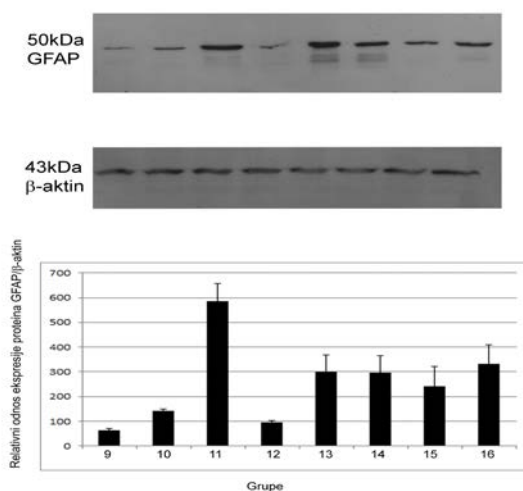


Slika V68. Elektroforetski profil ED1 u jetri kod sledećih grupa životinja: kontrola posle 48 h (1), HPZ posle 48 h (2), HPZ+AGM posle 48 h (3), AGM posle 48 h (4), kontrola posle 15 dana (5), HPZ posle 15 dana (6), HPZ+AGM posle 15 dana (7) i AGM posle 15 dana (8) nakon tretmana. Podaci su statistički upoređeni između grupa korišćenjem Studentovog t-testa ($p < 0,05$).

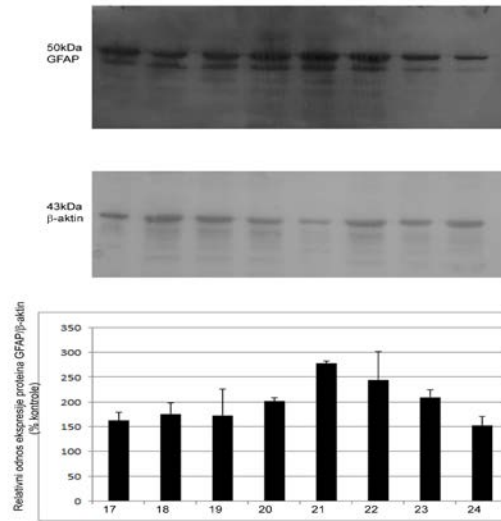
V6.2. Elektroforetski profil GFAP molekula

Elektroforetski profili GFAP molekula u selektivno osetljivim strukturama mozga 48 h nakon akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana kod kontrolnih i eksperimentalnih (HPZ, HPZ+AGM, AGM) grupa životinja predstavljeni su za koru prednjeg mozga na *Slici V69*, za strijatum na *Slici V70* i za hipokampus na *Slici V71*. Elektroforetski profili GFAP molekula u selektivno osetljivim moždanim regionima najizraženiji su u korteksu eksperimentalne grupe životinja 48 h nakon jednokratne primene HPZ sa AGM. Dobijeni elektroforetski nalaz GFAP molekula u kori prednjeg mozga ispitivanih grupa daje prikaz jasnih tkivnih razlika u profilu ovog molekula.

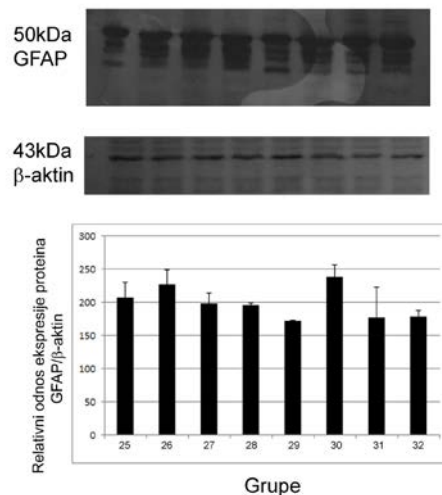
Međutim, na osnovu dobijenih elektroforetskih profila u strijatumu i hipokampusu nisu konstatovane razlike u broju traka kod kontrolnih i eksperimentalnih grupa životinja, 48 h posle akutnog i 15 dana nakon subakutnog tretmana, tako da elektroforetski nalaz GFAP molekula u ovim moždanim strukturama ne daje prikaz jasnih tkivnih i interspecijskih razlika u profilu molekula za obeležavanje astrocita.



Slika V69. Elektroforetski profil GFAP u kori prednjeg mozga kod sledećih grupa životinja: kontrola posle 48 h (9), HPZ posle 48 h (10), HPZ+AGM posle 48 h (11), AGM posle 48 h (12), kontrola posle 15 dana (13), HPZ posle 15 dana (14), HPZ+AGM posle 15 dana (15) i AGM posle 15 dana (16) nakon tretmana. Podaci su statistički upoređeni između grupa korišćenjem Studentovog *t*-testa ($p < 0,05$).



Slika V70. Elektroforetski profil GFAP u strijatumu kod sledećih grupa životinja: kontrola posle 48 h (17), HPZ posle 48 h (18), HPZ+AGM posle 48 h (19), AGM posle 48 h (20), kontrola posle 15 dana (21), HPZ posle 15 dana (22), HPZ+AGM posle 15 dana (23) i AGM posle 15 dana (24) nakon tretmana. Podaci su statistički upoređeni između grupa korišćenjem Studentovog t-testa ($p < 0,05$).



Slika V71. Elektroforetski profil GFAP u hipokampusu kod sledećih grupa životinja: kontrola posle 48 h (25), HPZ posle 48 h (26), HPZ+AGM posle 48 h (27), AGM posle 48 h (28), kontrola posle 15 dana (29), HPZ posle 15 dana (30), HPZ+AGM posle 15 dana (31) i AGM posle 15 dana (32) nakon tretmana. Podaci su statistički upoređeni između grupa korišćenjem Studentovog t-testa ($p < 0,05$).

VI Diskusija

VII. Distribucija i akumulacija HPZ u jetri i mozgu pacova nakon akutnog i subakutnog tretmana

Poznato je da davanje HPZ jednokratno, kao i višekratno u dužem vremenskom periodu, dovodi do njegove akumulacije u ćelijama i tkivima, a time i u organizmu (Reineke i sar., 2013). Većina eksperimentalnih studija pokazuje da akumulacija i distribucija HPZ po tkivima prvenstveno zavisi od primenjene doze i dužine trajanja tretmana, ali su od značaja i drugi faktori, kao što su hemijski oblik u kome se aplikuje HPZ, put unošenja, pol, starost i vrsta eksperimentalne životinje (Daniel i sar., 1992; Radenović i Kartelija, 2004).

Rezultati ove studije pokazuju da primena pojedinačne toksične doze HPZ od 38,7 mg/kg *i.p.*, kao i davanje HPZ tokom 15 dana u dozi od 9,78 mg/kg *i.p.* izaziva značajan porast koncentracije ovog leka nakon 24 h ($p < 0,01$), 48 h (nema statističku značajnost) i 15 dana ($p < 0,01$), kako u jetri, tako i u mozgu pacova u poređenju sa kontrolnim vrednostima (*Tabela 1*). U jetri pacova došlo je do većeg porasta nivoa HPZ u odnosu na mozak, što potvrđuje dosadašnja saznanja da se najveća količina HPZ deponuje u ovom organu, koji je i najznačajniji za ispoljavanje njegovog štetnog dejstva (Couée i Tipton, 1990).

Posle jednokratnog aplikovanja toksične doze leka praćene su promene sadržaja HPZ u organima u funkciji vremena i utvrđeno je da je nivo HPZ u jetri i mozgu najviši posle 24 h, nakon čega opada kako posle 48 h od akutne primene, tako i nakon 15 dana posle subakutnog davanja leka. Kao što je i očekivano, svakodnevno davanje HPZ u trajanju od 15 dana dovelo je do povećanja njegovog sadržaja u jetri, tako da je na kraju eksperimenta koncentracija HPZ u jetri bila trostruko veća nego u kontrolnoj grupi. Takođe, u ovoj eksperimentalnoj grupi životinja korelativna analiza pokazala je da između koncentracije HPZ postoji pozitivna korelacija u odnosu na koncentraciju ukupnog glutaciona (*Slika V39*), odnosno negativna korelacija u odnosu na aktivnost SOD (*Slika V40*).

Akutno i subakutno davanje AGM sa HPZ u svim ispitivanim terminima, značajno smanjuje koncentraciju HPZ u oba organa u odnosu na životinje koje su dobile samo HPZ, što pokazuje da prisustvo AGM smanjuje i odlaže resorpciju HPZ. Takođe, primena AGM uz HPZ dovodi do smanjene distribucije HPZ po kompartmanima.

U cilju rasvetljavanja mehanizama toksičnosti HPZ, od posebnog značaja je preraspodela ovog leka između jetre i mozga (Hatanaka i sar., 1988). Dobijeni podaci pokazuju da je koncentracija HPZ pri jednokratnom i subakutnom davanju HPZ od 15 dana značajno veća u jetri nego u mozgu, što se može objasniti podatkom da se nakon apsorpcije najveća količina HPZ nalazi u jetri gde indukuje sintezu MT, a zatim se transportuje do mozga. Korelativna analiza između koncentracije leka i parametara oksidativnog stresa/AOS u mozgu 48 h posle davanja HPZ pokazala je pozitivnu korelaciju između koncentracije HPZ i aktivnosti SOD u korteksu (*Slika V41*) i u strijatumu (*Slika V42*). Negativna korelacija postoji između

koncentracije HPZ i sadržaja ukupnog glutationa (*Slika V43*), kao i stvaranja $O_2^{\cdot-}$ (*Slika V44*) u korteksu 48 h posle davanja HPZ, odnosno između koncentracije HPZ i aktivnosti CAT u strijatumu 15 dana nakon primene HPZ.

VI2. Oksidativni stres nakon akutnog i subakutnog tretmana

Molekularni procesi koji pokreću povećanje stabilnih koncentracija RVK dovode do gubitka energije i smrti ćelije, koji mogu oštetiti organe i njihovu funkciju. U patogenezi trovanja učestvuju RVK i očigledno je da su biohemijske promene u tkivu jetre pod velikim uticajem oscilatornog oksidativnog stanja, naročito mitohondrije i peroksizomi koji su direktno povezani sa oksidativnim oštećenjem.

Pošto je oksidativno oštećenje pronađeno u svim ispitivanim tkivima, uključujući i plazmu, to znači da se dešava sistemski, na nivou celog organizma, što može biti uzrokovano bilo ekskrecijom oksidanata i/ili drugim stimulišućim faktorima na ćelijski metabolizam (sekrecija faktora rasta, interleukina ili reakcija pokrenutih stresom kao odgovor organizma na oštećenje).

VI2.1. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na sadržaj TBARS u plazmi i tkivu jetre i mozga

Efekti HPZ na jetru i mozak se danas u velikom broju ispitivanja dovode u vezu sa nastankom RVK i RVA. Ipak, najviše nalaza postoji o oksidativnom oštećenju lipida, odnosno LPO.

VI2.1.1. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ na oksidativno oštećenje lipida

Rezultati ove studije pokazuju da nakon akutne *i.p.* primene HPZ u dozi od 38,7 mg/kg dolazi do povećanja sadržaja TBARS, kako u plazmi, tako i u tkivu jetre i selektivno osetljivim strukturama mozga. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima, u kojima su drugi autori konstatovali da u jetri i mozgu eksperimentalnih životinja nakon primene HPZ dolazi do oštećenja membrana kroz proces LPO (Naidu i sar., 2002; Eghbal i sar., 2004; Pillai i sar., 2007; Sulaiman i sar., 2006).

Za razliku od plazme, gde je najveće povećanje TBARS registrovano 24 h nakon davanja HPZ (*Slika V4*), naša ispitivanja su pokazala da je u jetri najveće povećanje TBARS izmereno u terminu 48 h nakon akutnog davanja HPZ u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika V5*). Osim toga, u radu je dobijeno da je pri akutnoj primeni HPZ, LPO izraženija u jetri u odnosu na mozak, što se može objasniti znatno većim sadržajem HPZ koji je registrovan u jetri (*Tabela 1*). Na taj način ovi rezultati su pokazali da pri akutnom davanju HPZ prvenstveno dolazi do oštećenja jetre i to kroz proces koji obuhvata oksidativnu modifikaciju lipida. Takođe, treba istaći da je u terminu 48 h od akutne primene HPZ, u jetri registrovan značajno veći porast TBARS u odnosu na 24 h posle istog tretmana, u odnosu na kontrolnu grupu. Ovi rezultati pokazuju da do povećanog stvaranja SR, a time i oksidativnih oštećenja lipida dolazi tek posle izvesnog vremena od davanja HPZ. Korelativna analiza pokazala je negativnu korelaciju između

koncentracije TBARS i stvaranja $O_2^{\cdot-}$ (*Slika V48*) posle 48 h, odnosno aktivnosti GR posle 15 dana od primene HPZ (*Slika V49*). Za oksidativno oštećenje lipida u jetri pacova nakon primene HPZ, osim stvaranja RVK i RVA, odgovorna je i narušena ravnoteža komponenata AOS. Međutim, rezultati iz literature pokazuju da primena HPZ inhibira NADPH-indukovanu mikrozomalnu LPO (Khatua i Bhattacharyya, 2001). Drugi autori objašnjavaju da je inhibicija LPO u prisustvu HPZ rezultat uklanjanja SR (HO^{\cdot} i ROO^{\cdot}), donora elektrona i reakcija transfera vodonika (Choudhary i sar., 1998). Naši rezultati pokazuju da subakutna primena HPZ nije dovela do promene koncentracije TBARS nakon 15 dana u plazmi (*Slika V4*), kao ni u jetri (*Slika V5*), u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Moždane strukture su naročito osetljive na oksidativno oštećenje lipida. U prvom terminu nakon akutne primene HPZ (24 h) registrovali smo povećanje koncentracije TBARS u svim selektivno osetljivim strukturama mozga pacova u odnosu na kontrolne grupe životinja (*Slika V6*). Korelativna analiza pokazala je da je u ovom terminu povećanje koncentracije TBARS praćeno povećanom aktivnošću SOD u kori prednjeg mozga (*Slika V52*), kao i smanjenom aktivnošću GPx u strijatumu (*Slika V54*) nakon davanja HPZ. Najveći porast koncentracije TBARS izmeren u kori prednjeg mozga i hipokampusu 48 h od akutnog davanja HPZ, u odnosu na kontrolu (*Slika V7*). U kori prednjeg mozga 48 h nakon davanja HPZ postoji negativna korelacija koncentracije TBARS sa aktivnošću GR (*Slika V53*). S obzirom da je oksidativni stres uključen u patogenezu različitih patoloških stanja nakon davanja različitih ksenobiotika, stepen LPO neuronskih membrana predstavlja indikator oksidativnog stresa koji dovodi do poremećaja funkcije neurona. Smatra se da ksenobiotici dovode do povećanja LPO, odnosno akroleina, koji predstavlja α , β nezasićeni aldehidni proizvod LPO i uzrokuje povećanje intracelularne koncentracije Ca^{2+} , koja dovodi do serije poznatih događaja na glutamatergičkoj sinapsi, koji ćeliju vode u smrt (Kelleher i sar. 2009).

Povećanje sadržaja TBARS registrovano je i u regionu strijatuma 24 h i 48 h od akutnog davanja, odnosno 15 dana nakon subakutne primene HPZ u odnosu na kontrole (*Slike V6-8*). Poznato je da je strijatum struktura najbogatija gvožđem, preko koga HPZ pokreće proces LPO. Takođe, veoma je visok metabolički obrt dopamina, pri čemu se generiše H_2O_2 . Dalje, dolazi do autooksidacije dopamina i proizvodnje $O_2^{\cdot-}$, čime se stvaraju uslovi za stvaranje OH^{\cdot} , koji je veoma agresivan i pokreće proces LPO (Kabuto i sar., 2007).

VI2.1.2. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ+AGM na oksidativno oštećenje lipida

Primena AGM sa HPZ značajno smanjuje koncentraciju TBARS u plazmi, kao i u tkivu jetre i mozga u odnosu na grupu sa HPZ nakon akutnog tretmana, što ukazuje da AGM ispoljava svoje protektivne efekte modulacijom aktivnosti enzimskih markera, LPO i povećanjem kapaciteta AOS.

Tretman sa AGM redukuje oksidativno oštećenje, verovatno sa kapacitetom da brzo i efikasno ukloni lipidne peroksil radikale pre nego oni napadnu membranske lipide (Dastan i sar., 2009).

Akutno davanje HPZ sa AGM nakon 24 h dovodi do značajnog smanjenja sadržaja TBARS u jetri, u odnosu na eksperimentalne životinje koje su dobile samo HPZ (*Slika V5*). Moguće je da do smanjenja LPO u jetri nakon davanja HPZ sa AGM dolazi usled aktivacije AOS sistema organizma. Među najznačajnijim komponentama AOS su MT, čija je sinteza u jetri povećana, pa se pretpostavlja da su ovi proteini sa visokim sadržajem SH grupa odgovorni za smanjenje LPO, jer su efikasni u neutralisanju SR (Fabisiak i sar., 1999). I naši rezultati o sadržaju ukupnih SH grupa govore u prilog ovom objašnjenju, jer u plazmi pacova 24 h posle davanja HPZ sa AGM, nismo registrovali promenjen ukupni sadržaj SH grupa (*Slika V14*), ali je izmeren statistički značajno snižen nivo TBARS, u odnosu na životinje koje su *i.p.* dobile samo HPZ (*Slika V4*). Osim MT, u odbrani ćelija i tkiva od oksidativnih oštećenja nakon davanja HPZ učestvuju i glutacion, što su potvrdile brojne studije (Naidu i sar., 2002; Sulaiman i sar., 2006). Davanje HPZ sa AGM posle 24 h ne dovodi samo do smanjenja TBARS u jetri, već i do povećanja ukupnog glutaciona (*Slika V15*) što može predstavljati jedan od protektivnih mehanizama delovanja AGM u odnosu na LPO.

Akutno i subakutno *i.p.* davanje AGM sa HPZ smanjuje sadržaj TBARS u svim ispitivanim strukturama mozga i svim praćenim vremenskim terminima (osim u korteksu posle 48 h), u odnosu na HPZ grupu životinja, što ukazuje na direktnu ulogu AGM u zaštiti ćelijske membrane, sa aspekta sprečavanja njenog oksidativnog oštećenja, čime se doprinosi održavanju redoks ravnoteže u ćeliji i sprečava ćelijska smrt (*Slike V6-8*).

Preko sekundarnih glasnika $O_2^{\cdot-}$ može učestvovati u inicijaciji i terminaciji procesa LPO. U grupi životinja koje su dobile HPZ sa AGM posle 24 h pronađen je u mozgu smanjeni sadržaj TBARS i nepromenjena koncentracija $O_2^{\cdot-}$ (*Slika V20*), u odnosu na HPZ grupu životinja. Dizmutacijom $O_2^{\cdot-}$ od strane SOD, može se povećati lanac reakcija LPO, što ukazuje da SOD ima dvojni efekat, tj. da pored protektivnog efekta može i podržati proces. Preko OH^{\cdot} posredno, H_2O_2 može dovesti do peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u ćelijskim membranama. S obzirom da je u ovom prvom terminu (24 h) nakon akutnog davanja HPZ sadržaj TBARS povećan, moguće je da je proces LPO posredovan preko H_2O_2 ili $ONOO^{\cdot}$. Povećanje sadržaja TBARS posle davanja HPZ očekivan je pokazatelj pokrenutih agresivnih, oksidativnih mehanizama, u odnosu na eksperimentalne grupe koje su, pored HPZ dobile i AGM, gde očigledno dolazi do supresije ovih procesa kroz aktivaciju AOS.

Rezultati, dalje, pokazuju da u kori prednjeg mozga posle 48 h od primene HPZ sa AGM, nema promene TBARS, u odnosu na HPZ grupu (*Slika V7*). Nepromenjen sadržaj TBARS nakon davanja AGM u ovom vremenskom terminu, može biti rezultat posebne zaštićenosti ovog regiona zbog najveće osetljivosti na promene uzrokovane trovanjem (Di Ciero Miranda i sar., 2000). Naime, poznato je da se u

korteksu nalaze NADPH-dijaforaza-pozitivni neuroni, koji su otporni na toksične efekte NO, što bi moglo da objasni i zaštićenost ovog regiona od procesa LPO. Ovi mehanizmi u ranijem terminu (24 h) nisu efikasni, a u periodu do 15 dana su iscrpljeni.

U regionu strijatuma, sadržaj TBARS je značajno snižen kako nakon akutnog (24 h i 48 h), tako i posle dvonedeljnog davanja HPZ sa AGM u odnosu na HPZ grupu (*Slike V6-8*). Dobijeni rezultati pokazuju da je AOS odbrana uspešno prekinula kaskadu procesa LPO u ovoj moždanoj strukturi. Pored toga, u strijatumu je, zbog vrlo intenzivnog metaboličkog obrta dopamina i najvećeg prisustva gvožđa, i najveća distribucija enzima AOS (Lin i sar., 2002).

VI2.1.3. Uticaj akutnog i subakutnog davanja AGM na oksidativno oštećenje lipida

U istraživanju je 24 h nakon akutne primene AGM izmereno povećanje sadržaja TBARS, u svim ispitivanim strukturama mozga (korteks, strijatum, hipokampus), u odnosu na kontrolne grupe životinja (*Slika V6*). Ovo povećanje sadržaja TBARS praćeno je i povećanom koncentracijom NO_2+NO_3 u svim strukturama mozga posle 24 h od davanja čistog AGM, u odnosu na kontrole (*Slika V11*). Za razliku od grupa životinja koje su uz AGM dobile i HPZ i kod kojih je registrovano smanjenje sadržaja TBARS u odnosu na HPZ grupu, kod životinja tretiranih samo AGM došlo je do povećanja pokazatelja indeksa LPO u svim selektivno osetljivim strukturama mozga u odnosu na kontrolu. Očigledno je da AGM pokazuje protektivne efekte u odnosu na ćelijsku membranu samo u prisustvu oksidativnog stresa, u ovom slučaju izazvanog HPZ. To bi ukazivalo da se aktivacija procesa peroksidacije kod primene AGM ne odvija preko NO, već preko drugog mogućeg puta, a to je formiranje OH^* , koji je jedini u stanju da pokrene ove mehanizme (Mattson i Pedersen, 1998).

VI2.2. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na koncentraciju NO_2+NO_3 u plazmi i tkivu jetre i mozga

VI2.2.1. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ na koncentraciju NO_2+NO_3

Za razliku od životinja koje su žrtvovane 48 h nakon akutne primene HPZ i životinja koje su žrtvovane 15 dana nakon subakutnog davanja HPZ (registrovan porast koncentracije NO_2+NO_3), u plazmi životinja 24 h nakon jednokratne primene HPZ izmereno je značajno smanjenje nivoa NO_2+NO_3 (*Slika V9*). Na osnovu činjenice da jedinjenja sa visokim sadržajem SH grupa, kao što su glutation i MT, štite od toksičnog dejstva reaktivnih vrsta azota formiranjem S-nitrozo-glutationa i S-nitrozilacijom tiol grupa MT, može se pretpostaviti da je u našem radu povećanje sadržaja ukupnih SH grupa (koje nije statistički značajno) 24 h nakon davanja HPZ (*Slika V14*), odgovorno za redukciju nivoa NO_2+NO_3 . Ovo bi mogao da predstavlja adaptivni mehanizam protiv toksičnog dejstva HPZ. Takođe, podaci ovog rada ukazuju da 15 dana nakon subakutnog davanja HPZ dolazi do smanjenja oksidativnog stresa, jer nisu dobijene izmenjene koncentracije TBARS u plazmi (*Slika V4*), što sugeriše na mehanizam u kome NO_2+NO_3

reaguju sa redoks aktivnim metalima gradeći kompleks poput nitrozil-gvožđa i onemogućavajući na taj način Fentonovu reakciju i direktno stvaranje SR (Robb i Connor, 2002).

Od svih kiseoničnih SR, najveću reaktivnost poseduje OH[•], ali zbog izuzetno kratkog vremena poluživota (nekoliko milisekundi), deluje samo na mestu stvaranja (Korbecki i sar., 2013). Sa druge strane, NO, koji u fiziološkim uslovima reguliše aktivnost enzima respiratornog lanca, u patološkim uslovima dovodi do snažne inhibicije ćelijske respiracije, gde u obliku ONOO⁻ izaziva toksičnost (Flint, 1995). Iako nije SR, njegova izražena stabilnost mu omogućava da difunduje do ciljnih ćelija na kojima ispoljava svoje toksične efekte, bilo direktnom reakcijom sa molekulima ili oksidativnim mehanizmima; učestvuje u oksidaciji SH grupa i olakšava stvaranje disulfidnih oblika, započinjući proces LPO i oštećenje membranskih struktura ćelije (Koppal i sar., 1999). Dalje, kao vrlo reaktivno jedinjenje, ONOO⁻ dovodi do udaljenih oksidativnih oštećenja proteina, lipida i DNK. U homogenatima tkiva jetre registrovano je povećanje koncentracije NO₂+NO₃ u svim ispitivanim terminima nakon akutnog i subakutnog davanja HPZ (*Slika V10*) u odnosu na kontrolnu grupu životinja, koje je čak dva puta veće od koncentracije NO₂+NO₃ izmerene u mozgu. U radu je pokazano da sa povećanjem koncentracije NO₂+NO₃ dolazi do oštećenja AOS sistema, što je potvrđeno za GPx posle 24 h (*Slika V46*) i ukupnog glutaciona posle 48 h (*Slika V47*) od davanja HPZ.

Poznato je da u različitim regionima mozga NO moduliše sinaptičku funkciju i, menjajući oslobađanje neurotransmitera sa presinaptičkih nervnih završetaka, utiče na Ca²⁺-zavisnu egzocitozu. Aktivacija NMDA receptora glutatomom, uzrokuje influks jona Ca²⁺, koji se vezuje za kalmodulin i aktivira NOS, koja konvertuje molekulski kiseonik i arginin u citrulin i NO, pri čemu NO zauzima značajno mesto u reakcijama koje posreduju kalmodulin i cGMP (de la Monte i sar., 2000). U neuronima i astrocitima, NO stimuliše sintezu cGMP (sekundarnog glasnika u perifernim tkivima), čime se omogućava prenos informacija posredovan receptorom za EAK (glutamat). To ukazuje da u CNS, cGMP nije sekundarni, već tercijerni glasnik (Neitz i sar., 2014).

Azot monoksid je slobodan kratkoživeći radikal koji sadrži nespareni elektron, sa vremenom poluživota 15-20 sekundi. On ima ograničeno delovanje na mestu nastanka, ili u njegovoj neposrednoj blizini. Oksiduje se u nitrite i nitrate ili se jedini sa O₂^{•-}, stvarajući drugi aktivni SR (ONOO⁻), sa daleko dužom stabilnošću kao anjon i, posledično, dužim toksičnim delovanjem (Di Girolamo i sar., 2003).

Pored napred navedenog, treba istaći da je NO reaktivan i da pokazuje neke efekte koji nisu vezani za aktivnost GC i cGMP. Među ovim efektima od značaja su mogućnost vezivanja za SH grupe enzima, remeteći njihovu biološku aktivnost i povećano stvaranje SR, koji su izuzetno štetni (Russel i sar., 1999).

U pokušaju da se odgovori na brojna pitanja neurotoksičnog ili neuroprotektivnog delovanja NO, polazi se od regulacije njegove sinteze, koja je veoma složena i kreće se u nekoliko pravaca. Jedan od njih

je negativna povratna veza između NO i hema NOS. Najznačajniji kontrolni mehanizam nivoa NO su metaloproteini sa kojima on stupa u direktnu reakciju. Takvi su oksihemoglobin i mioglobin, kao i SOD od koje, jednim delom, zavisi proces inaktivacije NO (Scandalios, 2005; Valko i sar., 2006; Radenović i Kartelija, 2004). Korelativna analiza pokazala je da sa povećanjem koncentracije NO, raste i aktivnost SOD u hipokampusu životinja 48 h nakon akutne primene HPZ (*Slika V59*). Neurotoksično ili neuroprotektivno dejstvo NO ostvaruje se regulacijom oslobađanja transmitera glutamata, čija je preterana količina veoma toksična za neurone. Poznato je da je glutamat glavni ekscitatorni transmiter u mozgu, kao i da skoro sve ćelije mozga imaju receptore za ovaj neurotransmiter. *In vitro* istraživanja pokazuju da naglo izlaganje neurona visokoj koncentraciji glutamata dovodi do smrti ćelija usled produžene aktivacije NMDA receptora (Wang i sar., 2006). Osnovni uzrok ove glutamatske toksičnosti je ulazak Ca^{2+} kroz NMDA-aktivirane kanale, dalja aktivacija proteaza i nastanak toksičnih RVK.

Povećana aktivnost mikroglije kontrolisana je citokinima i uzrokuje sekundarnu aktivaciju astrocita, što može da indukuje i povećano stvaranje NO. Pojačana cAMP signalizacija vrši inhibiciju oslobađanja TNF- α i IL-1 β iz mikroglije i inhibira oslobađanje RVK, ali ne i NO. U ovoj studiji, već 24 h nakon davanja HPZ u odnosu na kontrolnu grupu, izmereno je povećanje koncentracije NO_2+NO_3 u strijatumu, strukturi koja prima vlakna iz različitih izvora (*Slika V11*). Pored direktne veze hipokampusa sa korteksom, iz istih regiona kore velikog mozga postoji direktna komunikacija sa strijatumom preko kortikostrijatnih vlakana, što predstavlja neuroanatomsku osnovu širenja oštećenja (Marinković i sar., 1989). Za ovakve rane promene izazvane HPZ, moguće je da prolongirano povećanje cAMP utiče na ćelijsku diferencijaciju i pojačano preuzimanje ekstracelularnog glutamata (Schubert i sar., 2001).

Osnovna dešavanja odigravaju se u mitohondrijama, jer se oštećuje njihova respiratorna funkcija i time smanjuje stvaranje ATPa, što ima za posledicu i sniženje ćelijskog glutationa. Azot monoksid, koji pokazuje karakteristike SR, u mitohondrijama inhibira respiratorni lanac i sprečava ćeliju da se "odupre" oksidativnom stresu. U našem istraživanju su samo 24 h nakon davanja HPZ, brojne RVK ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2), stvorene univalentnom redukcijom kiseonika nastalog u mitohondrijama, odgovorne za prolongiranu povećanu koncentraciju NO_2+NO_3 , koja je registrovana i u regionu kore prednjeg mozga, kao i u hipokampusu, u odnosu na kontrolne životinje (*Slika V11*). Reaktivni kiseonični intermedijeri i NO mogu delovati kao fiziološki modulatori nekih mitohondrijskih funkcija, ali, nastali u preteranoj količini, mogu učestvovati i u njihovom oštećenju. Vodonik peroksid dovodi do oksidacije piridinskih nukleotida mitohondrija i stimuliše specifično oslobađanje Ca^{2+} iz intaktnih mitohondrija. Stimulacija stvaranja RVK u mitohondrijama praćena je i povećanim oslobađanjem i ponovnim preuzimanjem Ca^{2+} (Ca^{2+} "kruženje") u mitohondrije, što može indukovati apoptozu ili nekrozu. Nastali reaktivni kiseonični intermedijeri, modifikuju nukleinske kiseline, proteine i lipide u mitohondrijama. Pojačano oslobađanje glutamata i njegovo odloženo preuzimanje, aktivacija NMDA receptorskih mehanizama, pojačan influks

Na⁺, Cl⁻, vode i Ca²⁺, kao i produženo pražnjenje postsinaptičkih neurona, predstavljaju mehanizme koji su identifikovani kao indikatori selektivne regionalne osetljivosti neuronskih populacija (Blitzblau i sar., 1996).

Najveće povećanje koncentracije NO₂+NO₃ registrovano je 48 h nakon akutnog davanja HPZ u kori mozga u odnosu na kontrolu (*Slika V12*). U ovoj moždanoj strukturi u istom terminu (48 h) nakon akutne primene HPZ postoji pozitivna korelacija između koncentracije NO₂+NO₃ i sadržaja ukupnog glutaciona (*Slika V58*). Glutamat, kao ekscitatorni neurotransmiter, u najvećoj koncentraciji prisutan je u piramidnim neuronima neokorteksa, odakle kreću projekcije u brojne delove mozga. Jedna od glutamatergičkih projekcija je i kortikostrijatni put, koji je direktna komunikacija kore velikog mozga i strijatuma (Calabresi i sar., 2000). Povećanje nivoa NO₂+NO₃, upravo je registrovano i u strijatumu 48 h posle akutnog davanja HPZ u odnosu na kontrolne životinje. Takođe, u istom terminu povećana je koncentracija NO₂+NO₃ i u hipokampusu, što je u saglasnosti sa činjenicom da je hipokampus moždana struktura sa najgušćom distribucijom NMDA receptora, zbog čega se i ubraja u selektivno najosetljivije moždane regione. Već je pomenuto da je oštećenje vulnerabilnih struktura posredovano glutatomom, kao i da biohemijska događanja koja slede, najpre zahvataju one selektivne neuronske populacije koje imaju pogodnu biohemijsku organizaciju za nastanak i propagaciju ekscitotoksičnosti i oksidativnog stresa. U našem istraživanju, koncentracija NO₂+NO₃ je povećana 24 h i 48 h nakon davanja HPZ, u odnosu na kontrolne životinje, što bi ukazivalo na veliku brzinu događaja posredovanih glutatomom (*Slike V11,12*).

Povećanje koncentracije NO₂+NO₃ registrovano je i 15 dana nakon subakutnog davanja HPZ u svim regionima mozga u odnosu na kontrolu (*Slika V13*). Primarni mehanizam ovih promena je verovatno ekscitotoksičnost, koju pojačava NO, što sve zajedno pokreće oksidativni stres, vremenski prolongiran proces. U strijatumu životinja 15 dana nakon subakutne primene HPZ postoji pozitivna korelacija između koncentracije NO₂+NO₃ i aktivnosti CAT (*Slika V65*). Za aktivacijom glutamatnih receptora i intracelularnim nagomilavanjem Ca²⁺ sledi i oslobađanje arahidonske kiseline, čiju metaboličku kaskadu u sintezi prostaglandina i leukotrijena putem ciklooksigenaznog i lipoksigenaznog puta prati povećano oslobađanje RVK i smanjena aktivnost enzima AOS (Mosialou i sar., 1993). Naše istraživanje pokazalo je da je u strijatumu životinja 15 dana nakon davanja HPZ, povećanje koncentracije NO₂+NO₃ praćeno smanjenjem aktivnosti CAT (*Slika V60*).

Dok je izrazito povećanje NO₂+NO₃ registrovano u moždanim strukturama posle akutnog davanja HPZ u odnosu na kontrolu, koncentracija NO₂+NO₃ mnogo manje raste u grupi životinja koja je dobijala HPZ subakutno 15 dana. Ovi naši rezultati su u saglasnosti sa nalazima Tohgija i saradnika, koji su pokazali da je stvaranje ili oksidacija NO u mozgu povećana u ranom stadijumu bolesti, a sa vremenom se smanjuje, kako se povećava gubitak neurona (Tohgi i sar., 1998).

VI2.2.2. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ+AGM na koncentraciju NO₂+NO₃

Akutna primena HPZ sa AGM nije dovela do statistički značajnog smanjenja NO₂+NO₃ u jetri u odnosu na grupu životinja koje su dobile samo HPZ (*Slika V10*). Međutim, u homogenatima jetre nakon subakutnog davanja HPZ sa AGM dobijeno je značajno smanjenje koncentracije NO₂+NO₃ u odnosu na grupu koja je dobila samo HPZ. Na mestu oštećenja ćelija, tj. na mestu dešavanja ćelijske smrti, stvaraju se brojni citotoksični medijatori koji su direktno uključeni u patofiziološke mehanizme oštećenja samih ćelija jetre. Mehanizam sekundarne inflamacije može objasniti povećanje koncentracije NO₂+NO₃ u jetri posle akutnog i subakutnog davanja HPZ sa AGM u odnosu na kontrolnu grupu životinja, što je posledica mehanizma toksičnosti, uključujući i povećano stvaranje NO₂+NO₃ (Lores-Arnaiz i sar., 2004).

Mehanizam oštećenja pokrenut HPZ je aktivirana ekscitotoksičnost i sa njom povezani poremećaji u metabolizmu NO, koji ukoliko se stvara nekontrolisano može učestvovati u oštećenju okolnih neurona (Tong i Hamel, 2000). U našem radu, 24 h nakon akutne primene HPZ sa AGM došlo je do smanjenja koncentracije NO₂+NO₃, u regionu hipokampusa, u odnosu na grupu životinja koje su dobile samo HPZ (*Slika V11*). U ovom eksperimentalnom modelu, u ranom terminu, aplikovanje AGM dovelo je do supresije akumulacije NO₂+NO₃ i smanjilo oštećenje neurona posredovano NMDA recetorima. Dobijeni rezultati koji ukazuju na brojne kompleksne aferentne i eferentne veze hipokampusa sa ostalim ispitivanim selektivno osetljivim strukturama mozga, pružaju osnovu da AGM utiče na preživljavanje i oporavak neurona nakon oštećenja u regionu kore prednjeg mozga, kao i strijatumu (Iizuka i sar., 2010).

Važan faktor u patogenezi psihijatrijskih bolesti je oštećenje mitohondrijskog transportnog lanca elektrona (Hwang i sar., 2013). Azot monoksid i njegov toksični metabolit – ONOO⁻, inhibiraju mitohondrijski respiratorni lanac, što dovodi do insuficijentnog energetskeg stanja u ćeliji. Osetljivost različitih tipova ćelija na NO i ONOO⁻, prvenstveno je zavisna od koncentracije intraćelijskog glutationa, pri čemu su neuroni, za razliku od astrocita, naročito osetljivi na njihovo dejstvo. Nakon izlaganja citokinima, astrociti mogu povećati stvaranje NO, zbog *de novo* sinteze inducibilne forme NOS (Schubert i sar., 2001). Iako je pokazano da NO/ONOO⁻ ne utiče na preživljavanje astrocita, ovi molekuli mogu difundovati i uzrokovati oštećenje mitohondrija ili ćelijsku smrt drugih ćelija, kao što su neuroni (Bolaños i sar., 1995).

Pokazano je da je hronična aktivacija inflamatornih procesa u neuroglijii povezana sa hroničnim stvaranjem neuroaktivnih citokina i drugih proteina, koji dovode do oštećenja. U ovim kaskadnim procesima, IL-1 je ključni pokretač i koordinator događaja; on aktivira sintezu i oslobađanje brojnih inflamatornih i neuroaktivnih molekula. Jedan od njih je i S100 protein, koji uzrokuje disfunkciju neurona povećanjem intracelularne koncentracije Ca²⁺ (Lam i sar., 2001). Na ovaj način, aktivirana mikroglia dovodi do povećane ekspresije IL-1, a on dalje do amplifikacije i samo-propagacije citokinske kaskade.

Hronična propagacija ovog citokinskog kruga predstavlja mogući mehanizam progresije promena koje kulminiraju kada se ošteti dovoljan broj selektivno osetljivih neurona određene moždane strukture. Efekat akutnog davanja AGM sa HPZ posle 24 h i 48 h, dovodi do smanjenja koncentracije NO_2+NO_3 u regionu strijatuma, u odnosu na grupu koja je takođe akutno dobijala samo HPZ (*Slike VII,12*). Balans između inhibitornog delovanja NO na imunoregulatorne mehanizme i njegovih direktnih toksičnih efekata na ćelije CNS, uspostavlja se na različitim nivoima, što zavisi od različite kinetike stvaranja i ćelijskog izvora NO nakon davanja HPZ. Pretpostavlja se da NO poreklom iz ćelija mikroglije deluje, pre svega, oštećujuće, dok NO koga stvaraju astrociti, i koji sa mikroglijom čini osnovu glijalne inflamatorne reakcije, kasnije i u manjoj količini, deluje protektivno (Kowiański i sar., 2002).

VI2.2.3. Uticaj akutnog i subakutnog davanja AGM na koncentraciju NO_2+NO_3

Već je pomenuto da se ćelijska smrt i promene u morfologiji ćelije mogu redukovati inhibicijom prekomernog stvaranja NO. Pojedini rezultati pokazuju da, čak i u odsustvu ćelijske smrti, inflamatorni proces u koji su uključeni i metaboliti NO, utiče na osnovne funkcije samih ćelija, što predstavlja suštinsku komponentu povezanosti sa procesima oštećenja (Munch i sar., 2003).

U našem istraživanju, akutna primena AGM dovodi posle 24 h do smanjenja koncentracije NO_2+NO_3 u jetri u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika VI10*). U ovom prvom terminu (24 h) verovatno je došlo do inhibicije sinteze NO, nasuprot kasnijem terminu (48 h) od akutnog davanja AGM, u kome AGM ne može da spreči stvaranje NO u odnosu na kontrolu.

Međutim, u ispitivanim moždanim regionima (korteks, strijatum, hipokampus) subakutno davanje AGM nakon 15 dana dovelo je do značajnog smanjenja koncentracije NO_2+NO_3 kako u odnosu na grupu životinja koja je dobila samo HPZ, tako i na eksperimentalnu grupu sa HPZ+AGM (*Slika VI13*). Ovo smanjenje odgovara kontrolnim vrednostima za sve ispitivane strukture mozga. Već je pomenuto da se prekomerna sinteza NO, pokrenuta mehanizmima uključenim u neurotoksičnost glutamata ostvaruje povećanjem ekstracelularne koncentracije glutamata, prekomernom stimulacijom postsinaptičkih NMDA receptora, depolarizacijom, povećanjem intracelularne koncentracije Ca^{2+} , aktivacijom nNOS, posledičnom sintezom i oslobađanjem NO (koji brzo reaguje sa $\text{O}_2^{\cdot-}$) i formiranjem visoko toksičnog ONOO $^{\cdot-}$. Postoje podaci o uključenosti NO u oštećenje DNK, procesom deaminacije nukleotidnih baza i pokretanjem programirane ćelijske smrti (Dong i Dedon, 2006). Verovatno da AGM učestvuje u značajnoj neuroprotekciji u uslovima ekscitotoksičnog oštećenja selektivno osetljivih neuronskih populacija posredovanih NMDA-receptorima. U našem istraživanju je u svim ispitivanim regionima mozga koncentracija NO_2+NO_3 vraćena na nivo kontrolnih vrednosti nakon subakutnog davanja AGM, što potvrđuje njegova neuroprotektivna svojstva zasnovana na blokadi puta glutamat-NOS-NO (*Slika VI13*).

Poznato je da pokrenut oksidativni stres dovodi do povećanja aktivnosti Ca^{2+} -nezavisne NOS i indukuje ekspresiju iNOS u kortikalnim neuronima, što ima za posledicu povećano stvaranje nitrotirozina, nitriranog proizvoda ONOO^- , kao i akumulacije metabolita NO, NO^{2+} , NO^{3+} u kori velikog mozga. Ove promene dešavaju se paralelno sa oslobađanjem laktat dehidrogenaze i smanjenjem preuzimanja glutamata u sinaptozomima. Akutno davanje AGM nakon 48 h sprečilo je akumulaciju NO u korteksu, što je moglo da utiče na oslobađanje laktat dehidrogenaze i povećano preuzimanje glutamata (*Slika VI2*). Registrovano smanjenje koncentracije NO_2+NO_3 je u ovoj moždanoj strukturi značajno manje od izmerene koncentracije NO_2+NO_3 u kontroli. Ovi rezultati pokazuju da je prekomerno stvaranje NO_2+NO_3 jedan od mehanizama kojim HPZ indukuje stanje stresa, a da AGM ima neuroprotektivnu ulogu u ovoj situaciji.

VI2.3. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na sadržaj ukupnih SH grupa u plazmi

VI2.3.1. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ na sadržaj ukupnih SH grupa

Na istim eksperimentalnim životinjama pratili smo istovremeno koncentraciju ukupnog glutaciona u tkivima i sadržaj ukupnih SH grupa u plazmi, jer je poznato da izlaganje toksinima izaziva povećanu sintezu proteina sa visokim sadržajem SH grupa, među kojima se po svom značaju izdvajaju MT. Ovi proteini niske molekulske mase igraju važnu ulogu u zaštiti od toksičnih efekata različitih ksenobiotika, jer neutrališu SR čije je stvaranje povećano nakon izlaganja toksinima (Klaassen i sar., 1999 i 2009).

Prema našim istraživanjima produženo *i.p.* davanje HPZ dovodi do povećanja ukupnog sadržaja SH grupa u plazmi pacova posle dve nedelje tretmana, u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika VI4*). Iako je uočen porast sadržaja SH grupa, konstatuje se i nepromenjen sadržaj TBARS u plazmi 15 dana nakon primene HPZ (*Slika V4*), što ide u prilog objašnjenju da MT štite od toksičnih efekata HPZ i neutralisanjem RVK i RVA.

Hlorpromazin dovodi do oksidativnog oštećenja tako što remeti balans između prooksidanata i antioksidanata, jer on ima veoma visok afinitet za SH grupe u glutationu, koji bi mogao uticati na održavanje tiol-disulfidnog balansa (Yamanaka i sar., 1991). Zbog toga akutno davanje HPZ posle 48 h dovodi do značajnog povećanja TBARS u plazmi (*Slika V4*) u različitim organima, uključujući i jetru (*Slika V5*) i mozak (*Slika V7*). Ovo povećanje može biti rezultat izmerenog niskog sadržaja SH grupa (*Slika VI4*) i smanjene aktivnosti enzima AOS opisanih u ovom istraživanju 48 h nakon akutnog davanja HPZ.

VI2.3.2. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ+AGM na sadržaj ukupnih SH grupa

Protektivni mehanizam AGM može biti rezultat njegove aktivnosti kao skupljača SR. Takođe, AGM može efikasno da blokira trošenje tiola (Battaglia i sar., 2007).

Davanje AGM u uslovima akutnog trovanja HPZ, dovodi do značajnog povećanja SH grupa u plazmi životinja u terminu 48 h od tretmana, u odnosu na HPZ-grupu životinja (*Slika V14*). Ako se uporede koncentracije ukupnih SH grupa između HPZ+AGM i HPZ grupe uočavaju se znatno više vrednosti u plazmi pacova koji su uz HPZ dobijali i AGM. Subakutno davanje HPZ sa AGM je takođe dovelo do porasta SH grupa u plazmi nakon 15 dana u odnosu na HPZ-grupu i kontrolnu grupu životinja.

VI2.3.3. Uticaj akutnog i subakutnog davanja AGM na sadržaj ukupnih SH grupa

Sadržaj ukupnih SH grupa je na nivou kontrola u plazmi pacova nakon akutnog davanja AGM (24 h i 48 h), kao i 15 dana nakon subakutne primene AGM (*Slika V14*). Generalno, sadržaj ukupnih SH grupa u plazmi pokazuje sistemski odgovor organizma koji je na našem eksperimentalnom modelu u nivou kontrolnih vrednosti posmatrano kroz različite termine nakon akutnog i subakutnog protektivnog davanja AGM.

VI2.4. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na sadržaj ukupnog glutaciona u tkivu jetre i mozga

VI2.4.1. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ na sadržaj ukupnog glutaciona

Među indirektnim mehanizmima oksidativnih oštećenja tkiva nakon jednokratne i višekratne primene HPZ, značajno mesto pripada dejstvu ovog leka na enzimske i neenzimske komponente AOS. Efekat HPZ na SOD, CAT, GPx, kao i neenzimske antioksidante, poput glutaciona, razlikuje se u zavisnosti od primenjene doze, puta unošenja leka, i dužine izlaganja ovom leku. Inhibitorni uticaj HPZ na sistem AOS organizma ima veliki udeo u oksidativnim oštećenjima biomolekula, ali, takođe, i povećanje aktivnosti enzima i sadržaja neenzimskih antioksidanata, koje se posebno uočava nakon dugotrajne primene HPZ ima bitan uticaj u odbrani od oštećenja ćelija i tkiva izazvanih SR nakon davanja HPZ.

Uloga glutaciona u zaštiti ćelija od toksičnih dejstava SR i drugih komponenata sa elektrofilnim svojstvima ogleda se u njegovom antioksidativnom dejstvu, jer neutrališe RVK unutar ćelije direktno ili preko ciklusa GPx/glutacion (Lopert i Patel, 2014). Naša studija pokazala je da između koncentracije ukupnog glutaciona i aktivnosti GPx postoji negativna korelacija u jetri posle 15 dana od davanja HPZ (*Slika V50*), odnosno pozitivna korelacija u strijatumu 48 h nakon primene HPZ (*Slika V61*). Imajući u vidu antioksidativni potencijal glutaciona, imali smo za cilj da ispitamo ulogu ovog neenzimskog antioksidanta u uslovima kratkotrajne i dugotrajne primene HPZ. Korelativnom analizom dobili smo da sa povećanjem koncentracije HPZ dolazi do smanjenja sadržaja ukupnog glutaciona u kori prednjeg mozga životinja 48 h nakon davanja HPZ (*Slika V43*).

Nivo glutaciona u različitim organima određen je dinamikom međuorganske preraspodele glutaciona i njegovih intermedijera (Bannai i sar., 1991). Ekskretovanje glutaciona iz ćelija različitih

organa, a posebno jetre, dovodi do toga da je koncentracija glutaciona u intersticijumu visoka, čak veća od njegove koncentracije u plazmi (Anderson i sar., 1980). Ekskrecijom glutaciona u perifernu krv omogućeno je ponovno korišćenje prekursora za njihovu sintezu. S obzirom da je jetra značajan izvor glutaciona za druga periferna tkiva, intenzivan metabolizam ksenobiotika u ovom organu, koji dovodi do smanjenja koncentracije glutaciona, rezultira i opadanjem koncentracije glutaciona u drugim perifernim tkivima (Lilić i sar., 2007). U našem eksperimentu, registrovano je značajno smanjenje koncentracije ukupnog glutaciona 48 h posle akutnog davanja HPZ u jetri pacova, u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika V15*).

Takođe, rezultati ovog rada pokazuju i da višekratna primena HPZ ima inhibitorni uticaj na sadržaj ukupnog glutaciona u jetri pacova. Subakutno davanje HPZ dovodi do smanjenja ukupnog glutaciona u jetri nakon 15 dana u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Ovi rezultati su u skladu sa istraživačkim grupama iz drugih laboratorija, koje su pokazale sniženu koncentraciju glutaciona, što dovodi do povećanja oksidativnog stresa u ovom organu (Naidu i sar., 2002; Sulaiman i sar., 2006). Generalno je prihvaćeno mišljenje da subakutna primena HPZ dovodi do smanjenja nivoa glutaciona zbog utroška glutaciona u reakciji GPx kada se neutrališu SR nastali pri dužem izlaganju ovom ksenobiotiku.

Ključnu ulogu u ekscitotoksičnim mehanizmima neuronske smrti čine energetski deficit i oksidativni stres. Intracelularno povećano stvaranje SR predstavlja potencijalni toksični insult, koji može dovesti do disfunkcije membrane, oštećenja DNK i inaktivacije proteina. U ovom slučaju, metabolizam glutaciona je glavni mehanizam zaštite ćelija od agenasa stvorenih oksidativnim stresom (Lopresti i sar., 2014).

Reaktivni kiseonični intermedijeri koji mogu uzrokovati oksidativno oštećenje, stvoreni u fiziološkim vrednostima, služe i kao signalni glasnici u brojnim ćelijskim putevima, od citokin-receptor interakcija do aktivacije transkripcionih faktora (Kanzaki i sar., 2013). Stvoreni u višku, SR dovode do oksidativnog oštećenja biomolekula, što može nastati i kod insuficijentne AOS. Redoks stanje ćelija određeno je koncentracijom GSH, a glavni donori redukcionih ekvivalenata su NADH i NADPH, što je opet u vezi sa stanjem unutarćelijskog metabolizma (Rusić-Stojiljković, 1998).

Protektivni efekti glutaciona ostvaruju se na više načina:

- direktnim uklanjanjem radikala kroz mehanizme zavisne od vitamina E;
- uklanjanjem produkata LPO, što je katalizovano enzimom GPx;
- održavanjem tiol-disulfidnog statusa proteina (zaštita SH grupa proteina od oksidativnog oštećenja) i
- delujući kao esencijalna komponenta u reparaciji oksidativnog oštećenja.

Već je ukazano na višestruku ulogu glutaciona u nervnom sistemu, koja podrazumeva ulogu "skupljača" SR, redoks modulatora aktivnosti jonotropnih receptora, kao i ulogu mogućeg

neurotransmitera i neuromodulatora (Banerjee i sar., 1993). Veoma je važno održavanje visokog unutarćelijskog odnosa GSH/GSSG, posebno sa aspekta oksidativnog stresa, što se postiže već pomenutim, kompleksnim homeostatskim mehanizmima. U našem istraživanju nije registrovana promena koncentracije ukupnog glutaciona u regionu strijatuma i hipokampusa 24 h nakon davanja HPZ u odnosu na kontrolu (*Slika VI6*). Dobijeni rezultati ukazuju na sniženje GSH/GSSG odnosa, odnosno na insuficijentnu regeneraciju redukovane forme GSH, uslovljenu prevagom oksidativnih mehanizama. Oksidovani oblik ovog tripeptida, glutation disulfid – GSSG, pokazuje toksično dejstvo (Barrameda-Medina i sar., 2014). Glutacion disulfid može stvarati mešovite disulfide sa enzimima koji sadrže tiolnu grupu. Poznato je da homeostatski mehanizam koji održava stalan odnos GSH/GSSG unutar ćelije uključuje i transportni sistem u membrani, kojim se višak GSSG izbacuje iz ćelije. U nekim tkivima, ekstruzioni kapacitet ćelija za GSSG određuje njihovu osetljivost na oksidativni stres (Adamson i sar., 1996).

U istom terminu (24 h) nakon akutnog trovanja HPZ registrovano je povećanje nivoa ukupnog glutaciona u kori prednjeg mozga, što je, uzevši u obzir njegovo antioksidativno dejstvo, verovatno rezultat aktivacije protektivnih mehanizama moždanog tkiva u ovim uslovima. U *in vitro* eksperimentima pod drugim eksperimentalnim uslovima, uočeno je dozno- i vremenski- zavisno povećanje glutaciona, kao i da se porast sinteze glutaciona nalazi u uskoj vezi sa povećanjem nivoa ATP koji je pored γ -glutamil-cisteina, glicina i magnezijuma, neophodan za njegovu sintezu (Chin i Templeton, 1993; Fotakis i sar., 2005). Ispitivanja u kojima su merene iRNK i DNK γ -GCS, ključnog enzima u sintezi glutaciona, pokazala su da povećanje ekspresije ovog enzima može biti odgovorno za povećanje sadržaja glutaciona (Hatcher i sar., 1995). I podaci iz literature, kao i rezultati našeg rada, saglasni su oko značajnosti uloge glutaciona u prvoj liniji odbrane od toksičnosti indukovane HPZ.

Već je pomenuto da visoko reaktivni, oksidovani anjon peroksinitrit, ONOO^- , nastaje u reakciji O_2^- sa NO. Oštećenje membranskih proteina kortikalnih neurona i GS, uzrokovani su preko ONOO^- , koji menja konformaciju proteina, inaktivira GS i dovodi do smrti neurona. Glutacion, koji ima veliki antioksidativni kapacitet i sadrži tirole uspešno uklanja štetne efekte ONOO^- (Koppal i sar., 1999). U našem radu povećana koncentracija ukupnog glutaciona registrovana u kori prednjeg mozga 24 h nakon akutnog davanja HPZ u odnosu na kontrolnu grupu, ukazuje na aktivaciju antioksidativnih mehanizama i pokazuje da u ovoj moždanoj strukturi glutacion deluje protektivno u odnosu na toksične efekte ONOO^- . Povećanje koncentracije ukupnog glutaciona u kori prednjeg mozga 24 h nakon davanja HPZ u odnosu na kontrolnu grupu odgovara rezultatima Yao i saradnika koji su na pacijentima sa shizofrenijom pokazali da antipsihotici blokiraju dopaminske receptore i posledično dovode do povećanja nivoa glutaciona (Yao i sar., 2006).

Sa druge strane, 48 h nakon akutnog davanja HPZ u svim selektivno osetljivim strukturama mozga registrovano je statistički značajno smanjenje sadržaja ukupnog glutaciona, u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika V17*). Ove promene u mozgu značajno su niže od onih koje smo registrovali u jetri istih životinja (*Slika V15*). Smanjenje koncentracije ukupnog glutaciona u ovom organu može se objasniti povećanom aktivnošću γ -glutamyltranspeptidaze, enzima koji je lokalizovan na spoljašnjoj površini ćelije gde vrši razgradnju ekstracelularnog glutaciona do aminokiselina koje ulaze u njegov sastav (Carvalho i sar., 2002). Prema drugom objašnjenju, smanjenje sadržaja glutaciona nastaje usled povećane LPO u ovom organu, koju prati nedostatak NADPH neophodan za aktivnost GR i transformaciju oksidovane u redukovanu formu glutaciona (Deneke, 2000).

Glutation je veoma bitan pokazatelj sposobnosti ćelije da održi svoje oksido-reduktivno stanje na odgovarajućem nivou. Regulacija sinteze glutaciona odvija se mehanizmom negativne povratne sprege, koju ostvaruje sintetisani glutacion kompeticijom sa glutamatom za glutaminsko mesto vezivanja za γ -GCS. U odsustvu inhibicije γ -GCS preko glutaciona, dolazi do povećanja njene aktivnosti (čak 4-5 puta), a pri deficitu glutaciona, dolazi do pojačane sinteze iRNK za γ -GCS, što dovodi do povećane sinteze ovog enzima i povećanja sinteze redukovanog GSH. Tiolska grupa cisteinske komponente tripeptida glutaciona može predavati elektrone, zbog čega je i najreaktivnija i najbitnija za njegovu funkciju (Hogg, 1999).

Svakako da snižena koncentracija glutaciona ima prioritetni značaj u preživljavanju neurona, jer glutacion odražava integritet funkcije mitohondrija u neuronima i time energetski status. Oksidativni stres i smanjenje mitohondrijske funkcije prethode fragmentaciji DNK i predstavljaju rani događaj u procesima apoptoze indukovane smanjenjem odnosa redukovani/ukupni glutacion. Medijatori nastali iz kaskadnih reakcija koje oštećuju mozak nakon primene različitih ksenobiotika, formirane su na osnovu tesnih interakcija između kritičnih patogenih faktora, koji uključuju oksidativno oštećenje, poremećenu homeostazu Ca^{2+} i metaboličku insuficijenciju (Mršulja i Kostić, 1994).

Poznato je da NO pokazuje inhibitorne efekte na mitohondrijsku respiraciju. Nakon izlaganja NO, glutacion reaguje sa NO^- i formira hidrosilamin i GSSG, dok sa NO^+ stvara S-nitrosoglutation (Hughes, 1999). Međutim, $ONOO^-$ takođe reaguje sa glutacionom preko jedno- ili dvo-elektronskog procesa, u zavisnosti od fiziološkog pH i koncentracije glutaciona (Quijano i sar., 1997). Intracelularna koncentracija glutaciona je kritični faktor koji određuje osetljivost NO i njegovih derivata (Bolaños i sar., 1996). U fiziološkim uslovima, NO i njegovi metaboliti reaguju sa različitim tiol jedinjenjima i formiraju nestabilne komplekse, čime se reguliše inhibitorna funkcija (Kharitonov i sar., 1995; Heales i Bolaños, 2002). Mi smo registrovali povećanje koncentracije NO posle davanja HPZ, što pokazuje aktivno učešće NO u mehanizmu trovanja. Pošto je reakcija NO sa slobodnim tiolima u kompeticiji sa istim supstratom kao što je glutacion za razlaganje H_2O_2 preko GPx, prekomerno stvaranje NO može uticati na smanjenje koncentracije glutaciona u ovim eksperimentalnim uslovima. Izgleda da je u našim eksperimentalnim

uslovima termin 48 h od davanja HPZ bio kritičan, jer je u ovom terminu istovremeno u svim moždanim strukturama izmereno povećanje koncentracije NO_2+NO_3 (*Slika V12*) i smanjenje sadržaja ukupnog glutaciona (*Slika V17*) u odnosu na kontrole.

Subakutna primena antipsihotika takođe je povezana sa razvojem oksidativnog stresa, kao posledica povećanog stvaranja SR sa jedne strane, odnosno redukovano kapaciteta AOS sa druge strane. Trovanje redukuje rezervu tiola u ćeliji i menja glutacion/GPx sadržaj u svim ispitivanim strukturama mozga pacova 15 dana nakon subakutne primene HPZ (*Slika V18*). Ovi rezultati mogu se objasniti velikom potrošnjom glutaciona u konjugaciji i/ili njegovim uključivanjem u neutralizaciju SR stvorenih nakon trovanja HPZ.

Glutacion ima veoma važnu ulogu u zaštiti ćelija od oksidativnog oštećenja, koje može biti indukovano oksidacijom dopamina. Grima i saradnici su pokazali da kod pacijenata sa shizofrenijom deficit glutaciona može biti povezan sa oksidovanim stresom indukovanim dopaminom (Grima i sar., 2003).

VI2.4.2. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ+AGM na sadržaj ukupnog glutaciona

U jetri pacova je akutna primena AGM posle HPZ u terminima 24 h i 48 h dovela do povećanja koncentracije ukupnog glutaciona u odnosu na HPZ grupu životinja (*Slika V15*). Potencijal sinteze glutaciona je verovatno jedan od načina kako se tkivo jetre štiti od oksidativnih oštećenja.

U terminu 15 dana nakon subakutne primene HPZ+AGM u jetri pacova registrovano je smanjenje koncentracije ukupnog glutaciona, u odnosu na grupu koja je dobila samo HPZ. Uz snižen nivo ukupnog glutaciona, istovremeno je registrovano i smanjenje sadržaja TBARS (*Slika V5*). Dobijeni rezultati pokazuju da u ovom terminu AGM pokazuje protektivni efekat u jetri, jer je smanjenje TBARS praćeno istovremenim iscrpljenjem antioksidativnog kapaciteta hepatocita, što se ogleda u padu nivoa glutaciona.

Za razliku od smanjenja koncentracije ukupnog glutaciona u kori prednjeg mozga nakon 24 h od akutnog davanja HPZ sa AGM u odnosu na HPZ grupu, koje nije statistički značajno (*Slika V16*), posle dvonedeljnog kombinovanog tretmana dolazi do povećanja nivoa ukupnog glutaciona u ovoj moždanoj strukturi, $p < 0,05$ (*Slika V18*), u odnosu na HPZ grupu. Smatra se da je razlika u sadržaju glutaciona pri akutnom i subakutnom davanju HPZ najznačajniji pokazatelj kako akumulacije SR u ćelijama, tako i adaptacije na oksidativni stres. Povećana koncentracija ukupnog glutaciona registrovana je i u strijatumu i hipokampusu životinja koje su 15 dana dobijale HPZ+AGM u odnosu na HPZ grupu. Primenjena doza AGM je možda niska, tako da je pokrenut mehanizam stvaranja peroksida preko NO, dovodeći do reaktivnog povećanja sadržaja ukupnog glutaciona, što sve upućuje na uključenost AGM u ove procese. Izmereno povećanje koncentracije ukupnog glutaciona u našem radu pokazatelj je adekvatne aktivnosti AOS, postignuto primenom AGM. Za sintezu glutaciona neophodan je i glutamat, tako da tretman sa

AGM smanjuje i toksičnost glutamata i posledično pokretanje oksidativnog stresa. Ovi rezultati pokazuju protektivnu ulogu davanja AGM na status glutaciona u mozgu 15 dana nakon subakutnog tretmana. Do povećanja sadržaja ukupnog glutaciona pod dejstvom AGM, verovatno dolazi usled stimulacije *de novo* sinteze GSH (Liu i sar., 2014).

Nakon 15 dana uzastopnog davanja HPZ i AGM pacovima, u svim ispitivanim selektivno osetljivim strukturama mozga, nivoi TBARS (*Slika V8*) i ukupnog glutaciona (*Slika VI8*) vratili su se na kontrolne vrednosti, što znači da AGM sprečava oksidativno oštećenje povećanjem kapaciteta AOS, u koju su uključene enzimske (SOD, GPx, CAT) i neenzimske (glutacion) komponente. Dobijeni rezultati potvrđuju da AGM poboljšava ukupni status AOS u moždanom tkivu pacova, tako da se može koristiti kao skupljač SR u uslovima oksidativnog stresa u mnogim tkivima, uključujući i mozak. Ovi rezultati pokazuju neuroprotektivne efekte AGM u različitim patološkim stanjima, gde spadaju i trovanja (Porciúncula i sar., 2001; Atif i sar., 2008).

VI2.4.3. Uticaj akutnog i subakutnog davanja AGM na sadržaj ukupnog glutaciona

Akutno (48 h) i subakutno (15 dana) davanje AGM dovodi do povećanja nivoa ukupnog glutaciona u jetri u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika VI5*). Očigledno da su u kontrolnoj grupi životinja aplikacija fiziološkog rastvora menja uslove sredine u kojima AGM povećava kapacitet AOS i zaštitu od SR (Ikbal i sar., 2014).

Dalje, naši rezultati pokazuju da dvonedeljno davanje samo AGM dovodi do značajnog sniženja koncentracije ukupnog glutaciona u hipokampusu u odnosu na kontrolnu grupu (*Slika VI8*). Smanjeni sadržaj ukupnog glutaciona u ovoj moždanoj strukturi ukazuje na nepotpunu oksidativnu zaštitu ćelije, što je potvrđeno povećanim stvaranjem $O_2^{\cdot-}$ (*Slika V22*) i povećanom koncentracijom TBARS (*Slika V8*) u ovim uzorcima.

VI2.5. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u tkivu jetre i mozga

VI2.5.1. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ na stvaranje $O_2^{\cdot-}$

Inflamatorna reakcija ima veoma važan udeo u oštećenju ćelija jetre izazvanog HPZ. Pomenuto je da reakcijom između NO i $O_2^{\cdot-}$ nastaje ONOO⁻, izuzetno jak oksidujući i nitrirajući agens, koji može reagovati sa svim klasama biomolekula. Veći afinitet NO prema $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na SOD, čiji je supstrat $O_2^{\cdot-}$, može objasniti nepromenjen nivo stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u jetri u ranom terminu (24 h) nakon akutne primene HPZ (*Slika VI9*), dok još nije razvijena sekundarna inflamacija.

U CNS, ONOO⁻ se može stvarati u ćelijama mikroglije aktivacijom pro-inflamatornih citokina, dok u neuronima može nastati različitim mehanizmima:

- hiperaktivnošću glutamatne neurotransmisije,

- disfunkcijom mitohondrija i
- potrošnjom L-arginina ili tetrahidrobiopterina (Torreilles i sar., 1999).

Prva dva mehanizma sinteze ONOO⁻ predstavljaju odgovor neurona na početno oštećenje, a stvoreni ONOO⁻ pogoršava inflamatorni proces i posledično oštećenje neurona, dok treći mehanizam njegovog stvaranja direktno učestvuje u pokretanju procesa oštećenja.

U oba termina nakon akutnog tretmana (*Slike V20,21*), kao i nakon 15 dnevnog subakutnog davanja HPZ (*Slika V22*) u svim ispitivanim selektivno osetljivim strukturama mozga (osim u hipokampusu posle 24 h), proizvodnja O₂^{•-} značajno raste u odnosu na kontrolu. Porast O₂^{•-} kod akutnog (24 h i 48 h) i subakutnog (15 dana) davanja HPZ ukazuje na vremensku i prostornu propagaciju procesa stvaranja O₂^{•-}, s obzirom da se javlja u moždanim strukturama u kojima postoji pogodna biohemijska sredina za njegov nastanak (bogatstvo u NMDA receptorima). Dobijeni podaci pokazuju da je u ovim terminima u mozgu pacova, uspostavljen proces stvaranja O₂^{•-}, uključujući i redoks kruženje. Povećano stvaranje O₂^{•-} udruženo je sa povećanjem koncentracije NO₂+NO₃ u svim ispitivanim strukturama mozga i svim vremenskim intervalima žrtvovanja (*Slike VII-13*), što bi upućivalo da su toksični efekti HPZ dugotrajni, jer se ne uspostavlja redoks ravnoteža, odnosno održava se neadekvatna AOS.

Povećano stvaranje O₂^{•-} nakon višekratnog davanja HPZ u trajanju od 15 dana u svim ispitivanim strukturama mozga dovodi do uslova za dalje stvaranje OH[•], koji je u stanju da pokrene LPO membrana. U ovom terminu povećano stvaranje O₂^{•-} praćeno je smanjenom aktivnošću GPx u kori prednjeg mozga posle davanja HPZ (*Slika V57*), što govori o oštećenju enzimskog AOS.

VI2.5.2. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ+AGM na stvaranje O₂^{•-}

Toksičnost HPZ odvija se preko ekscitotoksične kaskade, koja uključuje smanjeno preuzimanje glutamata od strane astroglije, njegovo duže zadržavanje u sinaptičkom prostoru, prekomernu aktivaciju NMDA receptora, uz povećani intracelularni influks Ca²⁺. Ove promene su direktno povezane sa povećanjem aktivnosti NOS u frontoparijetalnoj kori, što direktno vodi stvaranju RVK (Harkany i sar., 2000). Primena AGM sa HPZ smanjuje stvaranje O₂^{•-} u regionu kore velikog mozga 48 h nakon akutnog (*Slika V21*), odnosno 15 dana (*Slika V22*) nakon subakutnog kombinovanog tretmana. Poznato je da AGM blokira NMDA receptore, Ca⁺⁺-voltažne kanale i oslobađanje glutamata, što je udruženo sa smanjenjem nivoa NO u moždanim strukturama. U uslovima smanjenih inhibitornih efekata NO na proces respiracije u mitohondrijama, posledično dolazi do smanjenog stvaranja O₂^{•-}. Stoga, protektivni efekti AGM, koji su potvrđeni smanjenom proizvodnjom O₂^{•-} posle davanja HPZ sa AGM u našoj studiji, mogu se objasniti njegovim ukupnim antioksidativnim i antinitrozativnim potencijalom.

VI2.5.3. Uticaj akutnog i subakutnog davanja AGM na stvaranje O₂^{•-}

U jetri životinja koje su žrtvovane 24 h nakon jednokratne primene AGM nisu registrovane promene u stvaranju O₂^{•-} u odnosu na kontrolu (*Slika VI9*). Ovaj rezultat, uz podatak da je akutna primena AGM u istom terminu dovela do smanjenja koncentracije NO₂+NO₃ u jetri u odnosu na kontrolnu grupu (*Slika VI0*), potvrđuje antioksidativna svojstva AGM. U terminu 48 h nakon davanja AGM registrovano je povećano stvaranje O₂^{•-} (*Slika VI9*), kao i povećana koncentracija NO₂+NO₃ (*Slika VI0*), dok je subakutno davanje AGM u toku 15 uzastopnih dana vratilo vrednosti O₂^{•-} i NO₂+NO₃ na nivo kontrole u jetri, ukazujući na njegov kasnije ispoljen stabilni efekat.

Stvaranje O₂^{•-} je na nivou kontrolnih vrednosti u regionu kore prednjeg mozga i strijatuma 48 h nakon akutnog davanja AGM (*Slika V21*), kao i 15 dana nakon subakutne primene AGM u ovim moždanim strukturama (*Slika V22*). Istovremeno, izmerena aktivnost antioksidativnog enzima SOD odgovara takođe kontrolnim vrednostima nakon davanja samo AGM, što samo ukazuje na njegovo prisustvo u fiziološkim koncentracijama (*Slike V25,26*).

VI2.6. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na aktivnost SOD u tkivu jetre i mozga

VI2.6.1. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ na aktivnost SOD

Od kada su McCord i Fridovich (1969) pre četiri decenije, pokazali da izolovani protein iz eritrocita može da neutrališe O₂^{•-}, i nazvali ga SOD, usledila su mnogobrojna istraživanja, sa ciljem da se ispita uticaj različitih ksenobiotika na aktivnost ovog enzima sa antioksidativnim dejstvom.

Prema našim istraživanjima, akutno davanje HPZ posle 24 h i 48 h dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti ukupne SOD u jetri, u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika V23*). S obzirom da se u jetri nakon 48 h, O₂^{•-} permanentno generiše u procesu redoks kruženja na nivou mitohondrija, verovatno da je ovaj vremenski period od aplikacije HPZ dovoljan da dođe do iscrpljenosti AOS nakon akutnog davanja HPZ. Snižena aktivnost SOD i povećano stvaranje O₂^{•-} (*Slika VI9*) 48 h nakon trovanja ukazuju na operativnost oksidativnog stresa u jetri pacova.

Slične rezultate o smanjenju aktivnosti SOD u uslovima delovanja HPZ dokazali su i drugi autori (Naidu i sar., 2002; Pillai i sar., 2007). Smatra se da se ovim podacima o smanjenoj aktivnosti SOD pri jednokratnoj primeni HPZ može objasniti i nastanak LPO u tkivu jetre, što je potvrđeno u našem eksperimentu u terminu 48 h od davanja HPZ, u odnosu na kontrolne životinje (*Slika V5*). Inaktivacija SOD može nastati i usled povećanog stvaranja SR, koji zatim izazivaju oksidativnu modifikaciju proteinskih lanaca enzima, što nije isključeno i kao mogućnost inhibicije aktivnosti SOD pri davanju HPZ.

U cilju održavanja homeostaze, u ćeliji se kontinuirano obnavljaju antioksidativni kapaciteti. Ukoliko to obnavljanje nije adekvatno potrebama, oštećenja nastala putem prekomernog stvaranja SR

akumuliraju se i učestvuju u patofiziološkim mehanizmima mnogih patoloških stanja. Ako se zna da se stvaranje RVK, ali i njihovo uklanjanje od strane antioksidanata, nalaze u stalnoj dinamičkoj ravnoteži, svako narušavanje ove ravnoteže, bilo izazvano povećanim stvaranjem SR, bilo insuficijentnim AOS, dovodi do oksidativnog stresa. Zapravo, intracelularni metabolizam koji određuje redoks stanje unutar ćelije, a koje je prvenstveno određeno nivoom oksidacije ili redukcije nikotinadenin nukleotida (NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺) i glutationa (GSH/GSSG), određen je energetske statusom ćelije, samim tim i neurona (Mršulja i Kostić, 1994).

Naši rezultati pokazuju da je u regionu kore prednjeg mozga 24 h nakon davanja HPZ registrovano smanjenje aktivnosti ukupne SOD u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika V24*). Uz smanjenje aktivnosti antioksidativnog enzima, istovremeno postoji u ovom terminu i povećano stvaranje O₂[•] (*Slika V20*) u ovoj moždanoj strukturi, što ukazuje na prisustvo oksidativnog stresa. Ovakav nalaz ne mora biti posledica neadekvatne funkcije, već postignute saturacije enzima, tako da odnos O₂[•]/SOD predstavlja najbolji pokazatelj intenziteta oksidativnog stresa u tkivu. Sa druge strane, u ovom ranom terminu (24 h) od aplikacije HPZ i ONOO⁻ može biti uključen u oštećenje samog enzima.

Istraživanja na polju molekularne biologije obezbeđuju bolje razumevanje kaskade biohemijskih događaja nakon primene različitih antipsihotika, sa aspekta heterogene prirode ovih patoloških stanja u mozgu. Jedna od hipoteza koja objašnjava heterogenost patofizioloških zbivanja, jeste uključenost SR, na čije su destruktivno dejstvo neuroni naročito osetljivi. Oštećenja u mozgu povezana su sa dejstvom SR i metala (Fe, Cu, Zn, Al). Toksičnost ksenobiotika koji pokreću stvaranje SR eliminiše se "čistačima" SR. Smanjena aktivnost SOD (*Slika V24*) praćena je povećanim stvaranjem O₂[•] (*Slika V20*), što je registrovano u regionu strijatuma 24 h nakon *i.p.* davanja HPZ, u odnosu na kontrolnu grupu. Aktivnost enzima SOD, koji je uključen u dizmutaciju O₂[•], nije dovoljna za njegovu eliminaciju usled hiperprodukcije O₂[•], što dovodi do nastanka oksidativnog stresa.

U hipokampusu životinja je takođe 24 h nakon davanja HPZ izmerena snižena aktivnost ukupne SOD, u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika V24*). Međutim, u ovoj moždanoj strukturi je istovremeno registrovano i smanjeno stvaranje O₂[•], u odnosu na kontrolu (*Slika V20*). Verovatno je da HPZ indukuje prekomernu stimulaciju NMDA receptora, što stvara uslove za proces ekscitotoksičnosti i prekomernu akumulaciju slobodnog Ca²⁺, koji aktivira NOS i nastanak NO. Dalje, snižena vrednost O₂[•] mogla bi biti posledica njegovog povećanog trošenja u sintezi ONOO⁻. Snižena aktivnost SOD verovatno je posledica smanjene količine supstrata, odnosno O₂[•]. Smanjena aktivnost SOD može da bude posledica nitrozilacije delova molekula SOD, što je registrovano posebno u mitohondrijama neurona u kojima je operativna nNOS (Johnson i sar., 2013). Kalcijum uzrokuje aktivaciju NOS i dalje formiranje ONOO⁻ iz NO i O₂[•] radikala. Ova reakcija se izuzetno brzo odvija i ne zahteva prisustvo prelaznih metala, a ONOO⁻ može difundovati i po nekoliko ćelijskih dijametara uzrokujući, kao vrlo reaktivno jedinjenje, udaljena

oksidativna oštećenja proteina, lipida i DNK. Takođe, aktivira se fosfolipaza A₂ i metaboličkim obrtom masnih kiselina oslobađa arahidonska kiselina, prekursor SR. Kalcijumom posredovana aktivacija endonukleaze uzrokuje leziju DNK (tačkaste mutacije). Neki autori smatraju da su primarne mutacije mitohondrijske DNK i da su one osnova insuficijentnosti pojedinih kompleksa u respiratornom lancu, što dovodi do povećanog stvaranja SR i oštećenja neurona. U prilog ovoj pretpostavci idu dokazi o insuficijentnosti pojedinih kompleksa respiratornog lanca mitohondrija kod trovanja ksenobiotcima (Contreras-Shannon i sar., 2013). Već je pomenuto da je stradanje selektivno osetljivih moždanih regiona posredovano EAK, pre svega glutatomom. Oštećenje verovatno nastaje kao posledica pokrenutih (slobodnim radikalima) ekscitotoksičnih efekata glutamata. Ova biohemijska događanja najpre zahvataju one strukture (selektivne neuronske populacije) koje imaju pogodnu biohemijsku organizaciju za nastanak i propagaciju ovakvih reakcija. Upravo je hipokampus moždana struktura sa najgušćom distribucijom NMDA receptora, te se ubraja i u selektivno najosetljivije moždane strukture (Russel i sar. 1999).

U terminu 48 h nakon davanja HPZ izmerena je takođe snižena aktivnost ukupne SOD u svim selektivno osetljivim strukturama mozga pacova, u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika V25*).

Za razliku od akutne primene, subakutno davanje HPZ tokom dve nedelje ne izaziva značajnije promene u aktivnosti ukupne SOD u regionu kore prednjeg mozga, u odnosu na kontrolu (*Slika V26*). Nepromenjena aktivnost SOD u korteksu pri subakutnom trovanju HPZ ukazuje na aktiviranje odbrambenih mehanizama protiv oksidativnih oštećenja, među kojima se posebno izdvajaju MT i glutation. Dosadašnji eksperimentalni podaci o uticaju produžene primene HPZ na aktivnost SOD su kontradiktorni, tako da ima podataka i o smanjenju aktivnosti ovog enzima (Pillai i sar., 2007). Smanjenu aktivnost enzima u našim eksperimentalnim uslovima registrovali smo u strijatumu, a povećanje SOD u hipokampusu pacova 15 dana nakon uzastopne primene HPZ, u odnosu na kontrolu (*Slika V26*). Dobijeno povećanje koncentracije TBARS kod subakutnog davanja HPZ (*Slika V8*), ukazuje na peroksidaciju membranskih lipida, a na oštećenje lipida u našim eksperimentalnim uslovima dodatno utiču i snižene vrednosti antioksidanata. Pored toga, u hipokampusu životinja nakon subakutne primene HPZ došlo je i do porasta koncentracije NO₂+NO₃ (*Slika V13*), što vodi zaključku da su oksidativni i nitrozativni stres značajni mehanizmi oštećenja mozga posle dvonedeljnog davanja HPZ. Korelativna analiza pokazala je da između koncentracije HPZ i aktivnosti enzima SOD postoji negativna korelacija u jetri (*Slika V40*), odnosno pozitivna korelacija u kori prednjeg mozga (*Slika V41*) nakon 24 h i strijatumu (*Slika V42*) nakon 48 h od davanja HPZ. Takođe, korelativnom analizom došli smo do rezultata da je povećana aktivnost SOD nakon akutnog tretmana sa HPZ posle 48 h dovela do povećanja aktivnosti CAT u korteksu (*Slika V62*) i hipokampusu (*Slika V63*), dok je uzrokovala smanjenje aktivnosti CAT u korteksu 15 dana posle subakutnog tretmana (*Slika V65*). Oprečni rezultati koje smo dobili za SOD i CAT pri

izlaganju HPZ jednokratno i u dužem vremenskom periodu (15 dana) mogu se objasniti različitim dozama i dužinom izlaganja.

VI2.6.2. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ+AGM na aktivnost SOD

Nakon 48 h od primene HPZ sa AGM u jetri pacova izmerena je snižena aktivnost SOD (*Slika V23*), dok nije nađena promena koncentracije NO_2+NO_3 (*Slika V10*), kao ni $\text{O}_2^{\cdot-}$ (*Slika V19*), u odnosu na grupu sa HPZ. Dobijeni rezultati mogli bi se objasniti trošenjem $\text{O}_2^{\cdot-}$ i NO u pravcu sinteze visoko toksičnog ONOO⁻, što bi značilo da u ovom terminu AGM ne pokazuje protektivne efekte u tkivu jetre. Potencijalna mesta toksičnosti indukovane preko ONOO⁻ su tirozinski ostaci receptora tirozin kinaze, koji su važni u održavanju normalne aktivnosti ćelija jetre. Sa druge strane, može oštetiti i sam enzim SOD, metaloprotein. Pored toga, NO pokazuje veći afinitet prema $\text{O}_2^{\cdot-}$ u odnosu na SOD, što može objasniti smanjenu aktivnost ovog enzima usled nedostatka supstrata ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Djukic i sar., 2012).

Nakon dve nedelje davanja HPZ sa AGM u regionu hipokampusa registrovana je snižena aktivnost SOD (*Slika V26*), što je praćeno smanjenim stvaranjem $\text{O}_2^{\cdot-}$ u ovoj moždanoj strukturi (*Slika V22*), u odnosu na eksperimentalnu grupu životinja koja je dobijala samo HPZ. Ovi rezultati pokazuju da subakutna kombinovana primena HPZ sa AGM dovodi do redoks ravnoteže, odnosno postiže se adekvatna aktivnost AOS u mozgu. Takođe, davanjem AGM izostaje put uklanjanja $\text{O}_2^{\cdot-}$ preko NO, tako da SOD ostaje dominantni mehanizam njegovog eliminisanja. Moguće je i da davanje AGM prekida kaskadu povećanog stvaranja $\text{O}_2^{\cdot-}$ indukovanu HPZ.

VI2.6.3. Uticaj akutnog i subakutnog davanja AGM na aktivnost SOD

Aktivnost antioksidativnog enzima SOD snižena je u hipokampusu 24 h nakon primene samo AGM u odnosu na kontrolu (*Slika V24*). Guo i saradnici (1999) pokazali su da za razliku od citosolne konstitutivne CuZnSOD, mitohondrijalna MnSOD predstavlja inducibilni enzim, koji zavisi od nivoa stvaranja RVK i omogućava prilagođavanje ćelija mozga različitim koncentracijama reaktivnih vrsta, nastalih u oksidativnom metabolizmu, što je u našem istraživanju potvrđeno smanjenim stvaranjem $\text{O}_2^{\cdot-}$ u ovoj moždanoj strukturi (*Slika V20*). Prema tome, rezultat smanjenog stvaranja $\text{O}_2^{\cdot-}$ kao kosupstrata, jeste i registrovana smanjena aktivnost antioksidativnog enzima SOD u regionu hipokampusa posle davanja AGM.

I dok je akutno trovanje (posle 48 h) HPZ prema rezultatima ovog rada smanjilo aktivnost ukupne SOD, davanje samo AGM održalo je aktivnost enzima na nivou kontrolnih vrednosti, kako u jetri (*Slika V23*), tako i u svim ispitivanim strukturama mozga (*Slika V25*), ukazujući na bitan podatak do koga smo došli, odnosno da se protektivno dejstvo AGM u uslovima akutnog trovanja HPZ u jetri i mozgu ostvaruje i na komponente AOS.

VI2.7. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na aktivnost CAT u tkivu jetre i mozga

VI2.7.1. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ na aktivnost CAT

Katalaza je enzim od najvećeg značaja za zaštitu ćelija od toksičnih efekata H_2O_2 . Već je ukazano na njenu osnovnu ulogu u prevođenju H_2O_2 u vodu i kiseonik. U osnovi je ovo reakcija dizmutacije, jer se H_2O_2 istovremeno redukuje i oksiduje. Zasićenje CAT sa H_2O_2 je teško izvodljivo, jer je njena maksimalna brzina (V_{max}) uklanjanja H_2O_2 izuzetno velika (Pathak i sar., 2014).

Enzim CAT je primarno lokalizovan u peroksizomima i odgovoran je za redukciju H_2O_2 stvorenog iz metabolizma masnih kiselina dugog lanca u peroksizomima. Jako je teško predvideti odgovor antioksidanata na hemijski stres, jer različiti faktori utiču na aktivnost antioksidativnih enzima (Van der Oost i sar., 2003). Rezultati Li i saradnika pokazuju da su promene aktivnosti CAT nakon delovanja HPZ dominantne i da se javljaju u opsegu terapijskog delovanja HPZ (Li i sar., 2008). Pošto je pokazano da HPZ inhibiše SOD, zaključuje se da su promene aktivnosti CAT bolji pokazatelj veličine oksidativnog stresa koji se javlja nakon delovanja HPZ.

Katalaza je prisutna u većini organa, ali je jetra mesto njene najveće koncentracije. Naši rezultati potvrđuju ove podatke, jer je u jetri kontrolnih životinja aktivnost CAT bila veća od aktivnosti enzima u ispitivanim moždanim regionima (*Slike V27-30*). Pored toga, korelativnom analizom dobili smo rezultat da povećanjem koncentracije HPZ opada aktivnost CAT u strijatumu životinja 15 dana nakon subakutnog davanja HPZ (*Slika V45*).

Studija jedne grupe autora iz 2003. godine pokazala je da davanje HPZ kod pacova utiče na aktivnost antioksidativnih enzima (praćena je aktivnost SOD i CAT) u tkivu jetre (Can i sar., 2003). Ovi autori su pronašli promenu aktivnosti CAT u jetri posle davanja HPZ u dozi od 25 mg/kg i ukazali na potencijal HPZ da izazove strukturne promene na endotelnim ćelijama. U kulturi endotelnih ćelija pokazano je da HPZ može da izazove nastanak vezikulacije ćelijske membrane i da primena većih koncentracija HPZ dovodi do gubitka ćelija. Na dozno zavistan način HPZ dovodi do strukturnih promena i modifikacije permeabilnosti membrane endotelnih ćelija, čime utiče na hemodinamsku otpornost krvnih sudova *in vivo*. Takođe, HPZ prooksidativno deluje i posredstvom delovanja svojih metabolita koji su uključeni u stvaranje H_2O_2 procesom autooksidacije (Kelder i sar., 1991). Uprkos protektivnim efektima protiv drugih kiseoničnih radikala, kao što su OH^{\bullet} ili $O_2^{\bullet-}$, HPZ nije uključen u uklanjanje H_2O_2 . Može se reći da HPZ u malim dozama sprečava oštećenje endotela mehanizmima koji su deo njegovog antioksidativnog dejstva, kao i indukovanjem smanjenja koncentracije $TNF\alpha$, ali da pri visokim dozama HPZ, prooksidativni efekti njegovih metabolita imaju prednost nad povoljnim efektima ovog ksenobiotika, što dovodi do oštećenja ćelije (Can i sar., 2003). Prethodni rezultati u drugim patološkim stanjima na modelu hepatične manifestacije metaboličkog sindroma (*nonalcoholic fatty liver*

disease - NAFLD), takođe su pokazali da aktivnost CAT može biti smanjena u jetri (Jorgačević i sar., 2013). Rezultati ove studije pokazuju da je jednokratno, kao i višekratno davanje HPZ u trajanju od 15 dana, dovelo do smanjenja aktivnosti CAT u jetri, u odnosu na kontrolne grupe životinja (*Slika V27*). Oksidativni stres dovodi do aktivacije hepatičnih stelatnih ćelija i proinflatarnog odgovora Kupferovih ćelija, što učestvuje u razvoju inflamatornog procesa i fibroze (Koek i sar., 2011).

Uloga citohroma P450 kao i njegovih izoenzima CYP2E1 i CYP2B6 je izuzetno bitna u biotransformaciji HPZ, pri čemu se u procesima katabolizma HPZ mogu stvarati brojne RVK i RVA. Ksenobiotici učestvuju u indukciji CYP450. Pored oksidacije ksenobiotika, izoenzimi CYP2E1 i CYP2B6 učestvuju u stvaranju RVK i RVA, kao što su superoksidni, hidroksilni i lipidni hidroperoksidni radikali. Jedno od objašnjenja za smanjeni antioksidativni kapacitet i smanjenu aktivnost CAT u jetri pacova nakon akutne i subakutne primene HPZ, u odnosu na kontrolne grupe moglo bi da bude povećanje aktivnosti CYP2E1 u jetri, koje dovodi do inaktivacije CAT i SOD u toku trovanja (Qi i sar., 2013). Naši rezultati su u skladu sa ovim istraživanjima, jer je akutno davanje HPZ pored smanjene aktivnosti CAT, dovelo i da smanjenja aktivnosti SOD (*Slika V23*) u jetri pacova u odnosu na kontrolne grupe, što se može objasniti progresivnim razvojem oksidativnog stresa. Ova studija ukazala je na postojanje pozitivne korelacije između aktivnosti SOD i aktivnosti CAT u korteksu (*Slika V62*) i hipokampusu (*Slika V63*) životinja 48 h nakon davanja HPZ. Smanjena aktivnost SOD dovodi do akumulacije $O_2^{\cdot-}$, koji u reakciji sa NO formira ONOO \cdot . Ovi rezultati se mogu objasniti inaktivacijom SOD i CAT preko superoksidnog, hidroksilnog, peroksid radikala ili singlet kiseonika. Takođe, dodatni razlog za smanjeni antioksidativni kapacitet je niža sinteza proteina u odmaklom stadijumu nakon trovanja.

Već je objašnjeno da intraćelijski AOS obuhvata različite skupljače SR, koji mogu biti antioksidativni enzimi i neenzimski antioksidanti kao što je glutation i drugi tioli. Prvu liniju enzimskog ćelijskog AOS čine: SOD, CAT, GR i GPx. Pošto eliminišu SR, ravnoteža ovih antioksidantnih enzima je veoma bitna i u fiziološkim uslovima. Kada dođe do povećanog stvaranja SR nakon delovanja toksina, gubi se ova ravnoteža i uspostavlja se oksidativni insult (Manna i sar., 2007). U toku metabolizma stvaraju se brojne RVK, pri čemu je CAT odgovorna za razlaganje H_2O_2 . Ovaj enzim katalizuje uklanjanje H_2O_2 formiranog u reakciji koju je katalizovala SOD (Ramanathan i sar., 2002). Redukovana aktivnost CAT nakon davanja HPZ može biti u korelaciji sa povećanim stvaranjem H_2O_2 . U svim ispitivanim moždanim strukturama 24 h od akutnog trovanja HPZ smanjena aktivnost CAT (*Slika V28*) praćena je i smanjenjem aktivnosti SOD (*Slika V24*), u odnosu na kontrolu. Naši rezultati su u skladu sa ovim nalazima, jer je u kori prednjeg mozga u ovom terminu, akutno davanje HPZ dovelo do povećanja koncentracije ukupnog glutationa (*Slika V16*), koja je praćena smanjenom aktivnošću SOD i CAT.

Međutim, aktivnost enzima bila je na nivou kontrolnih vrednosti 48 h posle akutnog davanja HPZ u kori prednjeg mozga (*Slika V29*). Primena HPZ kod pacova uzrokuje i smanjenje sadržaja ukupnog

glutaciona u ovom terminu (*Slika V17*), što sumarno govori o oštećenju AOS u mozgu i čini neurone osjetljivim na oštećenje uzrokovano ovim antipsihotikom.

Istraživanja Bishnoi i saradnika iz 2007. godine pokazala su da hronična *i.p.* primena HPZ u trajanju od 21 dan u strijatumu pacova dovodi do smanjenja antioksidativnih enzima (CAT i SOD), neproteinskih tiola i koncentracije NO, a povećanja nivoa TBARS u poređenju sa kontrolom (Bishnoi i sar., 2007). Naši rezultati nakon subakutnog davanja HPZ u skladu su sa ovim istraživanjima, jer je i u našim eksperimentalnim uslovima subakutno davanje HPZ dovelo u strijatumu do smanjenja aktivnosti CAT (*Slika V30*) i SOD (*Slika V26*), a povećanja koncentracije TBARS (*Slika V8*) u odnosu na kontrolne životinje.

Ispitivani ekotoksikološki efekti HPZ u kulturi na *Carassius auratus* pokazali su da izlaganje HPZ prvo dovodi do smanjenja aktivnosti SOD, a zatim do njenog povećanja, dok je aktivnost CAT prvo povećana, a zatim se smanjuje (Li i sar., 2008). Naši rezultati pokazuju da je aktivnost CAT u kori prednjeg mozga 24 h posle akutnog trovanja HPZ smanjena (*Slika V28*), dok se nakon dugotrajne primene u trajanju od 15 dana aktivnost enzima povećava (*Slika V30*) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

VI2.7.2. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ+AGM na aktivnost CAT

Naši rezultati opisuju smanjenje antioksidativnog kapaciteta u jetri kako posle akutnog davanja HPZ, tako i 15 dana nakon njegove subakutne primene (*Slika V27*). Ovi rezultati pokazuju veliki stepen osjetljivosti jetre za oksidativno oštećenje u ranim, kao i odmaklom stadijumu nakon primene HPZ. Davanje AGM nakon HPZ dovelo je do povećanja aktivnosti CAT u svim vremenskim intervalima posle akutnog i subakutnog tretmana, u odnosu na grupu životinja koje su dobile samo HPZ.

Mozak je posebno osjetljiv nakon trovanja, jer zahteva velike količine kiseonika. Posедуje velike količine nezasićenih masnih kiselina, a pri tom ima slab antioksidativni kapacitet (Radermacher i sar., 2013). Poznato je da aktivisanje presinaptičkih D₂ receptora dovodi do smanjenog oslobađanja glutamata iz kortiko-strijatnih projekcionih vlakana (Carlsson i Carlsson, 1990). Ranije studije su pokazale da hronična blokada ovih receptora neurolepticima povećava sinaptičko oslobađanje aspartata i glutamata u strijatumu (Bardgett i sar., 1993). Oksidativno oštećenje odlaže degeneraciju neurona uzrokovanu aktivacijom NMDA i neNMDA glutamatnim jonotropnim receptorima (Coyle i Puttfarcken, 1993). Povećanje kiseoničnih radikala može inhibirati presinaptičko preuzimanje glutamata, inaktivirati enzimsku odbranu od ćelijskih oksidanata, oštetiti mitohondrijski elektronski transport, stimulisati NOS preko influksa Ca²⁺ posredovano preko NMDA receptora i reagovati sa superoksidom za formiranje visoko reaktivnog ONOO⁻, što dovodi do povećanog stvaranja redoks-aktivnih vrsta i oslobađanje ekscitatornih amino kiselina iz neurona (Burkhardt i sar., 1993; Jackson-Lewis i Przedborski, 1994). Ove sekundarne interakcije mogu dovesti do formiranja *circulus vitiosus* koji pokreću oksidativno oštećenje

posredovano glutamatom u strijatumu. U našoj studiji povećanje LPO (*Slika V7*) i povećano stvaranje $O_2^{\cdot-}$ (*Slika V21*), uz smanjenje antioksidativnih enzima – SOD (*Slika V25*) i CAT (*Slika V29*) koje je registrovano u strijatumu davanjem samo HPZ jednokratno posle 48 h, može biti povezano sa povećanjem glutamatergičke transmisije nakon hronične blokade dopaminskih receptora. Međutim, naši rezultati pokazuju da kombinovana primena HPZ sa AGM smanjuje nivo TBARS (*Slika V7*) i stvaranje $O_2^{\cdot-}$ (*Slika V21*), dok istovremeno povećava aktivnost antioksidativnih enzima - SOD (*Slika V25*) i CAT (*Slika V29*) u regionu strijatuma 48 h nakon tretmana. Primena AGM uz HPZ pozitivno moduliše nekoliko NMDA-posredovanih odgovora. Studija Schwartz i saradnika pokazala je da SOD i CAT sprečavaju degeneraciju neurona indukovanu glutamatergičkim mehanizmima (Schwartz i sar., 1998). Pored oksidativnog oštećenja koje se pokreće hiperglutamatergičkom neurotransmisijom indukovanom davanjem HPZ, drugi pretpostavljeni model za razvoj oštećenja je da smanjena aktivnost SOD i CAT čini neurone strijatuma mnogo osetljivijim na ekscitatornu neurotransmisiju, koja se pogoršava davanjem HPZ.

Primena AGM sa HPZ povezana je sa smanjenim preuzimanjem glutamata i posledično, njegovim povećanjem u ekstracelularnom prostoru, što je praćeno influksom Ca^{2+} (Burger i sar., 2003, 2004). Na našem eksperimentalnom modelu višekratno davanje AGM sa HPZ u trajanju od 15 dana, dovelo je do povećanja aktivnosti CAT u svim ispitivanim selektivno osetljivim strukturama mozga, u odnosu na grupu sa HPZ (*Slika V30*), što može ukazati da AGM sa potentnom antioksidativnom i neuroprotektivnom aktivnošću može biti mogući kandidat u tretmanu nakon trovanja HPZ.

VI2.7.3. Uticaj akutnog i subakutnog davanja AGM na aktivnost CAT

Akutno i subakutno davanje AGM *per se* ne dovodi do značajnih promena u aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu grupu životinja kako u tkivu jetre (*Slika V27*), tako i u svim ispitivanim selektivno osetljivim regionima mozga (*Slike V28-30*).

VI2.8. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na aktivnost GPx u tkivu jetre i mozga

VI2.8.1. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ na aktivnost GPx

Familija enzima GPx je široko rasprostranjena u animalnim tkivima i specifična za glutation kao donor vodonikovih atoma. Pored H_2O_2 , enzimi ove familije mogu reagovati i sa organskim peroksidima poput peroksida masnih kiselina, a kao rezultat ove reakcije peroksidi se redukuju do alkohola (Yamamoto i Takahashi, 1993).

Pored SOD i CAT, GPx ima važnu ulogu kao antioksidativni enzim u supresiji LPO u tkivima. Sva tri enzima uključena su u direktnu eliminaciju reaktivnih kiseoničnih metabolita, koji su najefikasniji u odbrani nakon oštećenja. Iako SOD uklanja $O_2^{\cdot-}$, kao proizvod reakcije dobija se H_2O_2 , koji se može

prevesti u aktivni OH^{*} i dovesti do LPO ukoliko nema dovoljno CAT ili GPx za razlaganje H₂O₂ (Ashokkumar i Sudhandiran, 2008). Kao veoma važan antioksidativni enzim, GPx uključena je u inaktivaciju mnogih mutagena iz okoline. Korelativna analiza pokazala je da je povećana aktivnost GPx povezana sa smanjenom koncentracijom NO₂+NO₃ u jetri posle 24 h (*Slika V46*), smanjenom koncentracijom TBARS u strijatumu posle 24 h (*Slika V54*) i smanjenim stvaranjem O₂^{*} u korteksu posle 15 dana (*Slika V57*) od davanja HPZ.

Naši rezultati pokazuju da je u tkivu jetre 48 h nakon akutnog davanja HPZ došlo do smanjenja sadržaja ukupnog glutaciona, koji je multifunkcionalni intracelularni ne-enzimski solubilni antioksidant, veoma prisutan u citoplazmi, nukleusu i mitohondrijama (*Slika V15*). Veoma je važno da glutation i GPx uklanjaju perokside korišćenjem glutaciona kao redukujućeg agensa. Kao rezultat povećanja oksidativnog stresa u grupi životinja sa HPZ, sadržaj ukupnog glutaciona (*Slika V15*) i aktivnost GPx je značajno redukovana u jetri 48 h nakon tretmana (*Slika V31*). Ovo smanjenje može biti rezultat smanjenja SH grupa koje smo registrovali u plazmi 48 h nakon davanja HPZ u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika V14*). Različite RVK su odgovorne za oksidaciju esencijalnih SH grupa uključenih u kontrolu aktivnosti brojnih enzima (De Vries i De Flora, 1993). Peroksidi se mogu prevesti u manje oksidovanu formu H₂O₂. Međutim, glavna opasnost od povećanog H₂O₂ ogleda se u njegovoj sposobnosti da prolazi ćelijsku membranu veoma brzo; kada uđe u ćeliju, može reagovati sa jonima Fe²⁺ i Cu²⁺ i formirati toksične OH^{*}, što predstavlja početak toksičnog insulta. U endotelnim ćelijama peroksidi se mogu prevesti u hidroksilne jone u prisustvu gvožđa. Hidroksilni radikal može reagovati sa svim komponentama DNK molekula i učestvovati u oštećenju purinskih i pirimidinskih baza (Halliwell, 1996). U tom smislu, veoma je važno razumeti međusobnu korelaciju između različitih enzimskih komponenti AOS.

U svim ispitivanim selektivno osetljivim strukturama mozga pacova (korteks, strijatum, hipokampus) 24 h (*Slika V32*) nakon akutnog davanja HPZ nije registrovana izmenjena aktivnost enzima GPx u odnosu na kontrolnu grupu životinja, dok je u terminu 48 h (*Slika V33*) od akutnog, kao i 15 dana (*Slika V34*) nakon subakutne primene HPZ, aktivnost GPx značajno niža od kontrolnih vrednosti. Smanjena aktivnost GPx u hipokampusu pacova nakon 15 dana od davanja HPZ udružena je sa povećanom aktivnošću SOD (*Slika V26*) i smanjenom aktivnošću CAT (*Slika V30*) u ovoj moždanoj strukturi, u odnosu na kontrolu. Takođe, korelativna analiza pokazala je da sa smanjenjem aktivnosti GPx dolazi do povećanja aktivnosti SOD u strijatumu pacova 48 h nakon davanja HPZ (*Slika V64*). Ovi rezultati mogu se objasniti povećanom akumulacijom H₂O₂. Radovi Hodgsona i Fridovicha su pokazali da je brzina inaktivacije SOD direktno zavisna od koncentracije H₂O₂ i samog enzima (Hodgson i Fridovich, 1975).

VI2.8.2. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ+AGM na aktivnost GPx

Rezultati naše eksperimentalne studije pokazali su da akutno davanje HPZ+AGM nakon 24 h u jetri dovodi do povećanja aktivnosti GPx (*Slika V31*) i sadržaja ukupnog glutaciona (*Slika V15*), dok značajno smanjuje TBARS (*Slika V5*) u ovom tkivnom homogenatu.

Na našem eksperimentalnom modelu, rezultati dobijeni u mozgu su pokazali da davanje AGM nakon HPZ posle 48 h smanjuje koncentraciju TBARS (*Slika V7*), a povećava aktivnost antioksidativnih enzima – SOD (*Slika V25*), CAT (*Slika V29*) i GPx (*Slika V33*) u strijatumu u odnosu na grupu životinja sa HPZ. Akutna primena AGM posle HPZ vraća sve ispitivane parametre na kontrolne vrednosti, što predstavlja jedan od mogućih mehanizama neuroprotektivnih efekata AGM nakon trovanja HPZ kod pacova.

Povećana aktivnost CAT i GPx koja je registrovana u svim selektivno osetljivim strukturama mozga 48 h nakon akutnog (*Slike V29,33*) i 15 dana nakon subakutnog (*Slike V30,34*) davanja HPZ sa AGM, u odnosu na grupu životinja sa HPZ verovatno je rezultat većeg stvaranja H₂O₂. Hussain i saradnici pokazuju da su neurodegenerativne promene u mozgu povezane sa stvaranjem RVK u toku ćelijskog metabolizma (Hussain i sar., 1995). Primena AGM sa HPZ povećava aktivnost enzimskih antioksidanata u ovim moždanim regionima, uključujući i aktivnost CAT i GPx, i vrši supresiju LPO i sprečava razvoj oksidativnog stresa.

VI2.8.3. Uticaj akutnog i subakutnog davanja AGM na aktivnost GPx

Aktivnost enzima GPx bila je na nivou odgovarajućih kontrolnih vrednosti kako posle akutne (24 h, 48 h), tako i nakon subakutne primene AGM u uzorcima iz tkiva jetre (*Slika V31*) i ispitivanih selektivno osetljivih struktura mozga (*Slike V32-34*).

VI2.9. Uticaj HPZ, HPZ sa AGM i AGM na aktivnost GR u tkivu jetre i mozga

VI2.9.1. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ na aktivnost GR

Objašnjena je ranije uloga GR koja katalizuje reakciju kojom se GSSG vraća u prvobitni redukovani oblik (GSH). Svojom aktivnošću GR održava dovoljnu količinu redukovanog glutaciona čime na posredan način doprinosi antioksidativnom statusu, koji je poremećen nakon akutnog davanja HPZ pacovima, jer je u jetri pacova registrovano značajno smanjenje aktivnosti GR u odnosu na kontrolne grupe životinja (*Slika V35*).

Naši rezultati, takođe, pokazuju smanjenu aktivnost enzima GR i u svim ispitivanim selektivno osetljivim strukturama mozga nakon akutne i subakutne primene HPZ u odnosu na kontrole (*Slike V36-38*). Već je ukazano na redoks sistem glutaciona, koji je veoma važan za redukciju oksidativnog stresa. Glutacion je poznat skupljač radikala, koji se prevodi u oksidovani oblik delovanjem enzima GPx i

ponovo vraća u redukovanu formu enzimom GR (Yao i sar., 2006). Nakon 48 h od akutnog davanja HPZ u svim ispitivanim selektivno osetljivim strukturama mozga registrovana je smanjena aktivnost enzima GR (*Slika V37*) u odnosu na kontrolne grupe, što je praćeno smanjenjem sadržaja ukupnog glutaciona (*Slika V17*) u ovom vremenskom terminu. Ovo smanjenje održava se i nakon 15 dana od primene subtoksične doze HPZ u svim moždanim strukturama u odnosu na kontrolu (*Slike V18,38*). Poremećaj redoks regulatornih mehanizama u AOS rezultat je smanjenog nivoa ukupnog glutaciona i smanjene aktivnosti GR u moždanim regionima pacova nakon trovanja HPZ.

U kori prednjeg mozga pacova višekratna primena HPZ u trajanju od 15 dana dovela je do povećanja aktivnosti SOD (*Slika V26*), koja nema statističku značajnost i CAT (*Slika V30*), kao i do smanjenja aktivnosti GPx (*Slika V34*) i GR (*Slika V38*) u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Ovi rezultati odražavaju se na pokrenut oksidativni prasak u mozgu pacova (Sundaram i sar., 2014). Smanjena aktivnost GPx i GR u kori mozga dalje govori o gubitku ukupnog glutaciona (*Slika V18*) i povećanju LPO (*Slika V8*), koje smo takođe registrovali u kori mozga nakon subakutne primene HPZ. Registrovano povećanje SOD i CAT je konačno verovatno rezultat povećanog stvaranja RVK.

Između aktivnosti GPx i GR postoji pozitivna korelacija u jetri (*Slika V51*) 15 dana posle primene HPZ. Takođe, GR negativno korelira sa koncentracijom TBARS u jetri (*Slika V49*) i mozgu (*Slika V53*) životinja posle davanja HPZ. Ove korelacije pokazuju da dinamičko stanje reguliše redoks ravnotežu, kao i da je u terminu 15 dana posle primene samog HPZ došlo do poremećaja mehanizama redoks ravnoteže u AOS, verovatno u sniženom nivou ukupnog glutaciona, kao i smanjenoj aktivnosti GR.

VI2.9.2. Uticaj akutnog i subakutnog davanja HPZ+AGM na aktivnost GR

Studije pokazuju da glutation zajedno sa GPx ima važnu ulogu u zaštiti ćelija od citotoksičnih agenasa skupljanjem RVK (Ashokkumar i Sudhandiran, 2008). Pored toga, poznato je da GR učestvuje u detoksikaciji ksenobiotika, SR i peroksida preko uklanjanja toksičnih agenasa sa glutationom, što na kraju štiti ćelije i organe od oštećenja uzrokovanih različitim toksinima. Davanje AGM sa HPZ eksperimentalnim životinjama sprečava biološka oksidativna oštećenja. Povećana aktivnost GR u jetri (*Slika V35*) i mozgu (*Slike V36-38*) pacova posle akutnog i subakutnog davanja AGM sa HPZ u svim ispitivanim terminima, može biti posledica uklonjenih SR i smanjenog oksidativnog stresa. Pošto je u tkivu jetre akutno davanje AGM sa HPZ posle 24 h smanjilo nivo cirkulišućih oksidanata kao što su LPO (potvrđeno našim rezultatima i prikazano na *Slici V5*) i OH^{*}, registrovano je povećanje enzimskih – SOD (*Slika V23*), CAT (*Slika V27*), GPx (*Slika V31*) i GR (*Slika V35*) antioksidanata. Objašnjenje se verovatno nalazi u sposobnosti AGM da kao skupljač SR čuva antioksidativni status i štiti ćelije od LPO.

VI2.9.3. Uticaj akutnog i subakutnog davanja AGM na aktivnost GR

Jednokratno davanje AGM u dozi od 75 mg/kg TM imalo je minoran efekat na aktivnost GR u jetri (*Slika V35*) i selektivno osetljivim strukturama mozga (*Slike V36,37*) kod pacova. Takođe, i višekratna primena AGM u trajanju od dve nedelje u istoj dozi nije značajnije uticala na aktivnost ovog enzima u tkivu jetre (*Slika V35*) i mozga (*Slika V38*) kod pacova.

VI3. Morfološke promene kao indikatori oštećenja izazvanih HPZ

Ćelije monocitno-makrofagnog sistema su jedne od ključnih komponenti imunskog sistema. One su prisutne u svim organima, tkivima i telesnim tečnostima i zauzimaju značajno mesto u tkivnoj homeostazi, imunskim i inflamatornim reakcijama (Nakazawa i sar., 2013). Ovom sistemu pripadaju promonociti i njihovi prekursori u kostnoj srži, monociti u cirkulaciji i makrofagi u tkivima. Makrofagima pripadaju histiociti (vezivno tkivo), Kupferove ćelije (jetra), osteoklasti (kost), mikroglia (nervno tkivo), mezanglijske ćelije (glomeruli bubrega), Langerhansove ćelije (koža), alveolni makrofagi (pluća), makrofagi koštane srži, slezine, kao i pleurski i peritoneumski makrofagi. Oni su veoma heterogena populacija ćelija, kako po veličini i granularnosti, tako i po svojim fenotipskim karakteristikama i enzimskoj aktivnosti. Makrofagi predstavljaju značajan izvor raznovrsnih enzima, brojnih proteina plazme (komponenta sistema komplementa, faktora koagulacije, fibronektina, feritina, haptoglobina, α -2 makroglobulina) (Bohlon i sar., 2014). Produkti arahidonske kiseline (prostaglandini i leukotrijeni) zauzimaju značajno mesto u širokom spektru solubilnih produkata (Lutz i Cornett, 2013). Fagocitoza, vezivanje antigen-antitelo kompleksa, C5a komponenta sistema komplementa ili tumorske ćelije, mogu biti inicijatori poremećaja respiratornog lanca, što dovodi do nagomilavanja oksidativnih metabolita: $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 . Ovi metaboliti se stvaraju u blizini ćelijske membrane ili u fagocitoznim vakuolama, a podstiču antimikrobni i antitumorski efekat makrofaga (Zhu i sar., 2006).

Veliki broj raznovrsnih funkcija ćelija monocitno-makrofagnog sistema omogućen je prisustvom različitih receptora, tj. antigena na njihovoj membrani. Svaki organ ili tkivo poseduje specifičan tip makrofaga, tako da mikrosredina tkiva indukuje ekspresiju specifičnih antigena na makrofagima, što je povezano sa funkcijom koju data ćelija obavlja.

Rezultati velikog broja *in vitro* studija na izolovanim ćelijama mikroglie, kao i glija/neuronskim kulturama ćelija, paralelno sa studijama na animalnim modelima i kliničkim istraživanjima, pokazali su da aktivirana mikroglia oslobađa inflamatorne medijatore sa važnom funkcijom odbrane od neurotrofnih patogeni uključenih u oštećenje mozga kod neuroinflamatornih bolesti. Pojava neurotrofina se poklapa sa površinom oštećenja krvno moždane barijere. Infiltracija inflamatornih ćelija može na direktan ili indirektan način uticati na vaskularnu permeabilnost i sekundarno oštećenje tkiva. U području lezije nalaze se makrofagi, limfociti i dendritske ćelije, kao i plazma ćelije u kasnijem stadijumu nakon

oštećenja. Studije pokazuju da se nakon oštećenja CNS, populacije leukocita menjaju u toku vremena, čime ukazuju na mehanizam i tip oštećenja tkiva (Rock i Peterson, 2006; Schnell i sar., 1999; Matyszak i sar., 1997).

VI3.1. Efekat HPZ kod akutnog i subakutnog trovanja

Studija Sulaimana i saradnika na pacovima pokazuje da davanje HPZ dovodi do morfoloških promena, pri čemu su osnovne patološke promene pojava pigmentnih granula i intracelularnih vakuola unutar hepatocita, inflamatorni ćelijski infiltrati i degeneracija (Sulaiman i sar., 2006).

U našem istraživanju je u prvom posmatranom terminu (24 h), kao i 48 h nakon akutne primene HPZ na presecima tkiva jetre pacova detektovano povećanje broja i gustine ED1 pozitivnih ćelija (monocita i makrofaga) u HPZ grupi, u odnosu na kontrolnu grupu životinja (*Slika V66*). Ovi rezultati pokazuju da je i u ranom terminu od 24 h već došlo do formiranja lezije. U HPZ+AGM grupi, kao i u grupi životinja koje su dobile samo AGM nije bilo razlike u pozitivnosti ED1 ćelija u odnosu na kontrolnu grupu životinja (rezultati nisu prikazani). Takođe, subakutni tretman nije doveo do značajnih promena u ekspresiji ED1 molekula, što može biti posledica senzitivnosti sistema koji se koriste za detekciju.

U slučaju oštećenja CNS, glija ćelije proliferišu u područje lezije i uklanjaju debris, a svojim produžecima popunjavaju nastali defekt u nervnom tkivu (Schubert i sar., 2001). Proces je poznat pod nazivom glijoza. Svi ovi procesi nastaju pod dejstvom gliofibrilarnog kiselog proteina (GFAP), koji se nalazi u astrocitima i koristi u imunocitohemijским izučavanjima upravo u cilju identifikacije astrocита, jer predstavlja njihov specifičan marker.

S obzirom da reaktivne glija ćelije imaju ulogu u patološkim mehanizmima posredovanim antipsihoticima i da pokreću oksidativno oštećenje neurona, kritični korak postiže se kada patološka aktivacija glije nije ograničena samo na mikrogliju, već uključuje i astrocitate (Müller i Ackenheil, 1998). Akutna primena HPZ je u prvom posmatranom terminu (24 h nakon tretmana) dovela do povećane imunoreaktivnosti glija ćelija u mozgu pacova, u smislu povećanja broja GFAP pozitivnih ćelija (+). U našem istraživanju je najveća ekspresija GFAP molekula, kao markera aktivacije astrocита, detektovana upravo u terminu 24 h od primene HPZ (*Slika V67*). Astrociti učestvuju u metabolizmu neurotransmitera, naročito GABAe i glutamata, zatim, preuzimanju K⁺ iz ekstracelularnog prostora u toku aktivnosti neurona, održavanju njegovog niskog nivoa u vanćelijskom prostoru (DiNuzzo i sar., 2013). Između ostalog, astrociti predstavljaju glavni depo glikogena u mozgu, učestvuju u transportu materija od kapilara do neurona, ali imaju i veoma značajnu ulogu u procesima regeneracije nervnog sistema (Kowiański i sar., 2002).

Astrociti su i 48 h nakon akutne primene HPZ identifikovani kao gusta mreža GFAP pozitivnih ćelija, koje su bile prisutne u svim zonama parenhima mozga i čiji su se obojeni produžeci pružali u perivaskularnu, subpialnu i subependimnu zonu. Astrociti mogu izgubiti svoju fiziološku kontrolu mehanizmom negativne povratne sprege nad mikroglijskom proizvodnjom NO, i čak učestvovati u formiranju neurotoksičnog ONOO⁻. Moguće je da je ovaj mehanizam pokrenut davanjem HPZ, jer je u svim strukturama mozga registrovano povećanje koncentracije NO₂+NO₃ u odnosu na kontrole. Oštećenje ekstracelularne jonske homeostaze održavane astrocitima dalje vodi ekscitotoksičnom oštećenju (Schubert i sar., 2001).

Studija Heneke i saradnika iz 2000. godine pokazala je kod kontrolnih životinja (tretiranih PBSom) najveću ekspresiju GFAP pozitivnih ćelija posle 48 h (Heneke i sar., 2001). Druga grupa autora iz Škotske pokazala je 2001. godine kod lažno operisanih životinja (tretiranih 0,9 % fiziološkim rastvorom) povećanu gustinu i intenzitet bojenja kontralateralnog korteksa, što ukazuje na pojačanu reakciju glijе uzrokovanu mehaničkim oštećenjem (Wagner i sar., 1993). U našem radu je kod kontrolnih životinja koje su dobile 0,9 % fiziološki rastvor, bojenje tela neurona i njihovih nastavaka bilo umerenog intenziteta (+).

Neurohemijski poremećaji nastupaju rano po aplikaciji određenih supstanci, dovodeći do izmenjene funkcije neurona. S obzirom da su i morfološke promene indikatori toksičnih efekata kesnobotika, nakon subakutnog davanja HPZ u trajanju od 15 dana imunohistohemijska slika se nije razlikovala od rezultata dobijenih nakon akutnog tretmana (rezultati nisu prikazani).

VI4. Ekspresija proteina – Western blot

4.1. Elektroforetski profil ED1

Elektroforetski profil ED1 koje obeležava aktivisane makrofage u jetri kontrolnih i eksperimentalnih grupa kod akutnog (48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana prikazan je na *Slici V68*. Elektroforetska analiza ED1 predstavlja kvalitativan nalaz koji ukazuje na postojanje razlika u profilu ovog enzima u mozgu ispitivanih grupa nakon različitog tretmana. Konstatovane razlike su najizraženije u kontrolnoj grupi 15 dana posle davanja fiziološkog rastvora, kao i u eksperimentalnim grupama sa AGM 48 h posle tretmana, gde se zapaža različit broj traka. Veći nivo ekspresije dobijen je u kontrolnoj grupi nakon subakutne primene fiziološkog rastvora, kao i u HPZ+AGM i AGM grupama životinja 48 h posle akutnog tretmana, što ukazuje na veći nivo ekspresije ED1 molekula. Dobijeni elektroferogrami ED1 u jetri predstavljaju kvalitativan nalaz koji pokazuje tipičan distribucioni obrazac ovog molekula kod svih ispitivanih grupa nakon akutnog (48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana. Elektroforetski nalaz ED1 molekula u jetri ispitivanih grupa daje prikaz jasnih tkivnih razlika u profilu ovog molekula, markera aktivisanih makrofaga.

4.2. Elektroforetski profil GFAP

Elektroforetski profil GFAP molekula koje predstavlja marker aktivacije astroglijalne reakcije u mozgu kontrolnih i eksperimentalnih grupa kod akutnog (48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana prikazan je posebno za koru prednjeg mozga (*Slika V69*), strijatum (*Slika V70*) i hipokampus (*Slika V71*). Na osnovu dobijenih elektroforetskih profila u kori prednjeg mozga konstatovane su jasne razlike u stepenu ekspresije proteina, koje su najizraženije u HPZ+AGM grupi životinja 48 h posle akutnog tretmana, tako da elektroforetski nalaz GFAP molekula u ovoj moždanoj strukturi daje prikaz jasnih tkivnih razlika u profilu GFAP za obeležavanje astrocita.

Međutim, elektroforetska analiza GFAP molekula predstavlja kvalitativan nalaz koji ne pokazuje postojanje razlika u profilu ovog enzima u strijatumu i hipokampusu ispitivanih grupa nakon različitog tretmana. Konstatovane razlike u ovim strukturama nisu pronađene i zapaža se sličan nivo ekspresije proteina u svim ispitivanim grupama kako žrtvovanih 48 h nakon akutne primene određenog tretmana, tako i 15 dana posle subakutnog davanja određenih supstanci. Dobijeni elektroferogrami GFAP u strijatumu i hipokampusu predstavljaju kvalitativan nalaz koji pokazuje tipičan distribucioni obrazac ovog molekula kod svih ispitivanih grupa nakon akutnog (48 h) i subakutnog (15 dana) tretmana.

VII Zaključci

1. Dobijeni rezultati pokazuju da jednokratna *i.p.* toksična doza HPZ od 38,7 mg/kg, kao i višekratna *i.p.* subtoksična doza HPZ tokom 15 uzastopnih dana od 9,78 mg/kg *Wistar* pacovima, neposredno po buđenju iz anestezije, dovodi do motorne usporenosti životinja u prvih par sati od aplikacije. U narednih 48 h, životinje su znatno pokretljivije, ali još uvek manje u odnosu na kontrolne grupe. Životinje koje su dobile čist AGM, kao i AGM sa HPZ jednokratno i višekratno u toku 15 uzastopnih dana (toksična i subtoksična doza AGM bila je 75 mg/kg *i.p.*) nisu pokazivale usporenost u kretanju, niti bilo kakve promene u ponašanju u odnosu na kontrolnu grupu.

2. Rezultati ove studije pokazuju da primena pojedinačne toksične doze HPZ posle 24 h, kao i davanje HPZ tokom 15 uzastopnih dana, izaziva značajan porast njegove koncentracije u jetri i mozgu, u poređenju sa kontrolnim vrednostima. Akutno i subakutno davanje AGM sa HPZ u svim ispitivanim terminima, značajno smanjuje koncentraciju HPZ u oba organa u odnosu na životinje koje su dobile samo HPZ, što pokazuje da prisustvo AGM redukuje i odlaže resorpciju HPZ.

3. Oksidativno oštećenje pronađeno je u plazmi, kao i tkivu jetre i mozga, što znači da se dešava sistemski, tj. na nivou celog organizma. Rezultati studije pokazuju da akutno trovanje HPZ posle 48 h indukuje oksidativni i nitrozativni stres u plazmi pacova (povećane koncentracije TBARS i NO₂+NO₃, a smanjen sadržaj ukupnih SH grupa). Međutim, pri subakutnom izlaganju pacova HPZ tokom dve nedelje, oksidativni i nitrozativni stres nisu mehanizmi kojima HPZ uzrokuje oštećenja. Zaštitni efekat od oksidativnih oštećenja, odnosno adaptivni odgovor pruža porast sadržaja ukupnih SH grupa, koje deluju kao antioksidanti, tako da subakutno davanje HPZ nije uticalo na promenu koncentracije TBARS u plazmi.

- Akutna i subakutna primena AGM nakon HPZ dovodi do značajnog smanjenja parametara oksidativnog/nitrozativnog stresa, kao i povećanja SH grupa u plazmi životinja, u odnosu na grupu životinja sa HPZ.

4. Povećanje koncentracija TBARS i NO₂+NO₃, kao i povećano stvaranje O₂^{•-} uz narušenu ravnotežu komponenata AOS (smanjena koncentracija ukupnog glutaciona i smanjena aktivnost SOD, CAT, GPx, GR) pokazuje da je oksidativno oštećenje lipida u jetri pacova nakon akutne primene HPZ odgovorno za stvaranje RVK i RVA. Na osnovu smanjene koncentracije ukupnog glutaciona i enzimskog antioksidativnog enzima – CAT, kod dugotrajne primene HPZ zaključuje se da HPZ inhibitorno deluje na sistem AOS organizma i ima veliki udeo u oksidativnim oštećenjima biomolekula. Rezultati pokazuju

veliki stepen osetljivosti jetre za oksidativno oštećenje u ranim, kao i odmaklom stadijumu nakon primene HPZ.

- Na osnovu dobijenog smanjenog sadržaja TBARS i povećanja AOS sistema odbrane (ukupni glutation, SOD, CAT, GPx, GR) nakon davanja AGM sa HPZ, može se zaključiti da AGM pokazuje protektivni efekat od toksičnog delovanja HPZ u jetri, zasnovan na redukovanju oksidativnog stresa.
- Imunohistohemijska analiza pokazala je da akutna primena HPZ u oba ispitivana termina (24 h i 48 h) dovodi do povećanja broja i gustine ED1 pozitivnih ćelija u tkivu jetre.
- Elektroforetski nalaz ED1 molekula u jetri kontrolnih i eksperimentalnih grupa životinja pokazuje postojanje razlika u profilu ovog molekula u mozgu ispitivanih grupa nakon različitog tretmana. Najizraženije razlike pronađene su u kontrolnoj grupi 15 dana posle davanja fiziološkog rastvora, kao i u eksperimentalnim grupama sa AGM 48 h posle tretmana, što ukazuje na veći nivo ekspresije ED1 molekula.

5. U našoj studiji povećanje LPO i povećano stvaranje $O_2^{\cdot-}$, uz smanjenje antioksidativnih enzima – SOD, CAT, GPx i GR koje je registrovano u moždanim strukturama (kora prednjeg mozga, strijatum, hipokampus) posle akutne i subakutne primene HPZ, pokazuje da u oštećenju mozga pri akutnom izlaganju HPZ u značajnoj meri učestvuje povećano stvaranje RVK i RVA.

- Primena AGM sa HPZ koja je dovela do povećanja aktivnosti enzimskih antioksidanata u ispitivanim moždanim regionima, smanjuje LPO i sprečava razvoj oksidativnog stresa. Ovi rezultati ukazuju na direktnu ulogu AGM u protekciji ćelijske membrane, sa aspekta sprečavanja njenog oksidativnog oštećenja. Kombinovana primena HPZ sa AGM smanjuje nivo TBARS i stvaranje $O_2^{\cdot-}$, dok istovremeno povećava aktivnost antioksidativnih enzima, što znači da AGM sprečava oksidativno oštećenje povećanjem AOS odbrane, u koju su uključene enzimske (SOD, CAT, GPx, GR) i neenzimske (glutation) komponente. Dobijeni rezultati potvrđuju da AGM poboljšava ukupni AOS status u moždanom tkivu pacova.
- U istraživanju je pokazana povećana imunoreaktivnost glija ćelija, u smislu povećanja broja GFAP pozitivnih ćelija i intenziteta imunohistohemijske reakcije na moždanim presecima pacova nakon akutne primene HPZ.
- Elektroforetski profil GFAP molekula pokazuje najveće razlike u stepenu ekspresije proteina u kori prednjeg mozga, koje su najizraženije u HPZ+AGM grupi životinja 48 h posle akutnog tretmana.

Agmatin može biti skupljač SR u uslovima oksidativnog stresa u nekim tkivima, uključujući i jetru i mozak. Takođe, AGM može poboljšati ukupni antioksidativni status u ovim organima nakon trovanja HPZ. Primena AGM sa HPZ poboljšava enzimske (SOD, CAT, GPx, GR) i ne-enzimske (glutation) antioksidativne aktivnosti, što ukazuje na ulogu AGM u sprečavanju razvoja oksidativnog stresa izazvanog HPZ u jetri i mozgu pacova. Ovi podaci govore u prilog protektivnih efekata AGM koji štiti ćelijske membrane od LPO i oksidacije proteina, i pomaže u održavanju integriteta ćelijskih organela, tako da može biti od velike koristi u uslovima smanjenja glutaciona i stvaranja SR u toku oksidativnog stresa. Dobijeni rezultati govore o promenama uzrokovanim AGM, koje su pre svega vezane za LPO-AOS.

Ovo istraživanje predstavlja doprinos razjašnjenju toksičnog dejstva antipsihotika HPZ i ukazuje na mogućnost terapijske primene neuromodulatora AGM u akutnom i subakutnom trovanju ovim lekom. Rezultati studije pokazali su da HPZ indukuje oksidativni stres aktiviranjem RVK i RVA i time dovodi do oštećenja tkiva, koja se redukuju modulacijom sinteze NO primenom AGM.

Potencijalno protektivno dejstvo AGM u ovom eksperimentalnom modelu, kao i pokazana sposobnost da koriguje promene pokazatelja oksidativnog stresa izazvane HPZ, predstavljaju dokaz njegovog potencijalnog značaja u kombinovanom terapijskom pristupu u tretmanu toksičnih efekata ovog antipsihotika.

VIII Literatura

1. Adamson B, Schwarz D, Klugston P, Gilmont R, Perry L, Fisher J, Lindblad W, Rees R. Delayed repair: the role of glutathione in a rat incisional wound model. *J Surg Res* 1996; 62(2): 159-64.
2. Adamson GM, Carlson TJ, Billings RE. Phospholipase A₂ activation in cultured mouse hepatocytes exposed to tumor necrosis factor-alpha. *J Biochem Toxicol* 1994; 9(4): 181-90.
3. Akanmu D, Cecchini R, Aruoma OI, Halliwell B. The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288(1): 10-6.
4. Almroth BC. Oxidative damage in fish used as biomarkers in field and laboratory studies. Doctoral Dissertation, Department of Zoology/Zoophysiology, Göteborg University, Sweden; 2008. p. 1-74.
5. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 2002; 53: 1331-41.
6. Anderson ME. Tissue glutathione. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton: CRC Press; 1986. p. 317-23.
7. Anderson ME, Meister A. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(3): 707-11.
8. Anderson ME, Meister A. Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J Biol Chem* 1980; 255(20): 9530-3.
9. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 2005; 70: 200-14.
10. Arenas FA, Diaz WA, Leal CA, Perez-Donoso J, Imlay JA, Vasquez CC. The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 398: 690-4.
11. Aricioglu F, Regunathan S. Agmatine attenuates stress- and lipopolysaccharide-induced fever in rats. *Physiol Behav* 2005; 85(3): 370-5.
12. Aricioglu-Kartal F, Uzbay IT. Inhibitory effect of agmatine on naloxone-precipitated abstinence syndrome in morphine dependent rats. *Life Sci* 1997; 61(18): 1775-81.
13. Ashokkumar P, Sudhandiran G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed Pharmacother* 2008; 62(9): 590-7.

14. Askalany AR, Yamakura T, Petrenko AB, Kohno T, Sakimura K, Baba H. Effect of agmatine on heteromeric N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neurosci Res* 2005; 52(4): 387-92.
15. Atif F, Yousuf S, Agrawal SK. Restraint stress-induced oxidative damage and its amelioration with selenium. *J Pharmacol* 2008; 600: 59-63.
16. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Florida; 1985. p. 123-32.
17. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 360438.
18. Babson JR, Gavitt NE, Dougherty JM. Chlorpromazine protection against Ca(2+)-dependent and oxidative cell injury. Limitations due to depressed mitochondrial function. *Biochem Pharmacol* 1994; 48(7): 1509-17.
19. Baf MH, Subhash MN, Lakshmana KM, Rao BS. The effect of chronic chlorpromazine administration on monoamine levels in various regions of rat brain. *Neurochem Res* 1995; 20(1): 51-4.
20. Bafana A, Dutt S, Kumar S, Ahuja PS. Superoxide dismutase: an industrial perspective. *Crit Rev Biotechnol* 2011; 31(1): 65-76.
21. Baldessarini RJ, Tarazi FI. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: Goodman and Gilman's, *The pharmacological basis of therapeutics*. Medical Publishing Division 10th ed New York; 2003. 460: 494.
22. Banerjee KK, Bishayee A, Chatterjee M. Elevated lipid peroxidation, decreased glutathione levels and changes in glutathione-related enzymes in rats treated with human placental extract. *Acta Med Okayama* 1993; 47(4): 223-7.
23. Bannai S, Sato H, Ishii T, Taketani S. Enhancement of glutathione levels in mouse peritoneal macrophages by sodium arsenite, cadmium chloride and glucose/glucose oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1092(2): 175-9.
24. Bardgett ME, Wrona CT, Newcomer JW, Csernansky JG. Subcortical excitatory amino acid levels after acute and subchronic administration of typical and atypical neuroleptics. *Eur J Pharmacol* 1993; 230: 245-50.
25. Barrameda-Medina Y, Montesinos-Pereira D, Romero L, Blasco B, Ruiz JM. Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *Plant Sci* 2014; 227: 110-21.

26. Battaglia V, Rossi CA, Colombatto S, Grillo MA, Toninello A. Different behavior of agmatine in liver mitochondria: inducer of oxidative stress or scavenger of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768(5): 1147-53.
27. Bellomo G, Vairetti M, Stivala L, Mirabelli F, Richelmi P, Orrenius S. Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(10): 4412-6.
28. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Possible anti-oxidant and neuroprotective mechanisms of zolpidem in attenuating typical anti-psychotic-induced orofacial dyskinesia: a biochemical and neurochemical study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31(5):1130-8.
29. Blitzblau R, Gupta S, Djali S, Robinson MB, Rosenberg PA. The glutamate transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate indirectly evokes NMDA receptor mediated neurotoxicity in rat cortical cultures. *Eur J Neurosci* 1996; 8(9): 1840-52.
30. Bohlson SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho MM, Fraser DA. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol* 2014; 5: 402.
31. Bolaños JP, Heales SJ, Peuchen S, Barker JE, Land JM, Clark JB. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 995-1001.
32. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951-65.
33. Bronstein AC, Spyker DA, Cantilena LR, Green JL, Rumack BH, Dart RC. 2010 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers National Poison Data System (NPDS): 28th Annual report. *Clin Toxicol* 2011; 49: 910-41.
34. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr* 2001; 4: 593-9.
35. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15: 186-90.
36. Burger ME, Alves A, Callegari L, Athayde FR, Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27(1): 135-40.

37. Burger M, Fachinetto R, Calegari L, Paixão MW, Braga AL, Rocha JB. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. *Brain Res Bull* 2004; 64(4): 339-45.
38. Burkhardt C, Kelly JP, Lim YH, Filley CM, Parker WD Jr. Neuroleptic medications inhibit complex I of the electron transport chain. *Ann Neurol* 1993; 33: 512-7.
39. Burns MJ. The pharmacology and toxicology of atypical antipsychotic agents. *Clin Toxicol* 2001; 39(1): 1-14.
40. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 79-110.
41. Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Marfia GA, Pisani A, Sancesario G, Bernardi G. Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 2000; 61(3): 231-65.
42. Cameron A. The search for insulin substitutes. *Can Med Assoc J* 1928; 18: 69-71.
43. Can C, Demirci B, Uysal A, Akçay YD, Koşay S. Contradictory effects of chlorpromazine on endothelial cells in a rat model of endotoxic shock in association with its actions on serum TNF-alpha levels and antioxidant enzyme activities. *Pharmacol Res* 2003; 48(3): 223-30.
44. Cao X, Kambe F, Lu X, Kobayashi N, Ohmori S, Seo H. Glutathionylation of two cysteine residues in paired domain regulates DNA binding activity of Pax-8. *J Biol Chem* 2005; 280(27): 25901-6.
45. Carlsson M, Carlsson A. Interaction between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia – implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 1990; 13: 272-6.
46. Carvalho M, Hawksworth G, Milhazes N, Borges F, Monks TJ, Fernandes E, Carvalho F, Bastos ML. Role of metabolites in MDMA (ecstasy)-induced nephrotoxicity: an *in vitro* study using rat and human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol* 2002; 76(10): 581-8.
47. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1482-95.
48. Chabory E, Damon C, Leinor A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J, Schoor M, Gottwald U, Habenicht U, Drevet JR, Vernet P. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 2074-85.

49. Chabrier PE, Demerle-Pallardy C, Auguet M. Nitric oxide syntheses: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(8-9): 1029-35.
50. Cherian MG, Kang YJ. Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp Biol Med* 2006; 231: 138-44.
51. Chin TA, Templeton DM. Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells. *Toxicology* 1993; 77: 145-56.
52. Choudhary D, Srivastava M, Sarma A, Kale RK. Effect of high linear energy transfer radiation on biological membranes. *Radiat Environ Biophys* 1998; 37(3): 177-85.
53. Clancy KD, Lorenz K, Dries D, Gamelli RL, Hahn EL. Chlorpromazine modulates cytokine expression in the liver and lung after burn injury and endotoxemia. *J Trauma* 2000; 48(2): 215-22.
54. Contreras-Shannon V, Heart DL, Paredes RM, Navaira E, Catano G, Maffi SK, Walss-Bass C. Clozapine-induced mitochondria alterations and inflammation in brain and insulin-responsive cells. *PLoS One* 2013; 8(3): e59012.
55. Couée I, Tipton KF. The inhibition of glutamate dehydrogenase by some antipsychotic drugs. *Biochem Pharmacol* 1990; 39(5): 827-32.
56. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-95.
57. Dalmau I, Vela JM, González B, Finsen B, Castellano B. Dynamics of microglia in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 2003; 458(2): 144-57.
58. Daniel W, Janczar L, Danek L, Legrum W, Netter KJ. Pharmacokinetic interaction between carbamazepine and neuroleptics after combined prolonged treatment in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992; 345(5): 598-605.
59. Dass PD, Bermes EW Jr, Holmes EW. Renal and hepatic output of glutathione in plasma and whole blood. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1156(1): 99-102.
60. Dastan A, Kocer I, Erdogan F, Ates O, Kiziltunc A. Agmatine as retinal protection from ischemia-reperfusion injury in guinea pigs. *Jpn J Ophthalmol* 2009; 53(3): 219-24.
61. de la Monte SM, Sohn YK, Etienne D, Kraft J, Wands JR. Role of aberrant nitric oxide synthase-3 expression in cerebrovascular degeneration and vascular-mediated injury in AD. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 903: 61-71.

62. Demady DR, Jianmongkol S, Vuletich JL, Bender AT, Osawa Y. Agmatine enhances the NADPH oxidase activity of neuronal NO synthase and leads to oxidative inactivation of the enzyme. *Mol Pharmacol* 2001; 59(1): 24-9.
63. Deneke SM. Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Reg* 2000; 36: 151-80.
64. De Vries N, De Flora S. N-acetyl-L cystein. *J Cell Biochem* 1993; 17: 270-7.
65. Di Ciero Miranda M, de Bruin VM, Vale MR, Viana GS. Lipid peroxidation and nitrite plus nitrate levels in brain tissue from patients with AD. *Gerontology* 2000; 46(4): 179-84.
66. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and tiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1019-26.
67. Di Girolamo G, Farina M, Riberio ML, Ogando D, Aisemberg J, de los Santos AR, Marti ML, Franchi AM. Effects of cyclooxygenase inhibitor pretreatment on nitric oxide production, nNOS and iNOS expression in rat cerebellum. *Br J Pharmacol* 2003; 139(6): 1164-70.
68. DiNuzzo M, Mangia S, Maraviglia B, Giove F. Regulatory mechanisms for glycogenolysis and K⁺ uptake in brain astrocytes. *Neurochem Int* 2013; 63(5): 458-64.
69. Di Simplicio P, Franconi F, Frosalí S, Di Giuseppe D. Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids* 2003; 25(3-4): 323-39.
70. Djukic M, Jovanovic MD, Ninkovic M, Stevanovic I, Curcic M, Topic A, Vujanovic D, Djurdjevic D. Intrastratial pre-treatment with L-NAME protects rats from diquat neurotoxicity. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19(4): 666-72.
71. Dlugosz A, Roszkowska A, Zimmer M. Oestradiol protects against the harmful effects of fluoride more by increasing thiol group levels than scavenging hydroxyl radicals. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 105(6): 366-73.
72. Dong M, Dedon PC. Relatively small increases in the steady-state levels of nucleobase deamination products in DNA from human TK6 cells exposed to toxic levels of nitric oxide. *Chem Res Toxicol* 2006; 19(1): 50-7.
73. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43(3): 200-27.
74. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1): 47-95.

75. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Karakteristike slobodnih radikala. U: Biohemija slobodnih radikala. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu; 2000. p. 6-87.
76. Eghbal MA, Tafazoli S, Pennefather P, O'Brien PJ. Peroxidase catalysed formation of cytotoxic prooxidant phenothiazine free radicals at physiological pH. *Chem Biol Interact* 2004; 151(1): 43-51.
77. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82(1): 70-7.
78. Fabisiak JP, Pearce LL, Borisenko GG, Tyhurina YY, Tyurin VA, Razzack J, Lazo JS, Pitt BR, Kagan VE. Bifunctional anti/prooxidant potential of metallothionein: redox signaling of copper binding and release. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1(3): 349-64.
79. Fagali N, Catalá A. Fe²⁺ and Fe³⁺ initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem Phys Lipids* 2009; 159: 88-94.
80. Fairbanks CA, Schreiber KL, Brewer KL, Yu CG, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Grocholski BM, Shoeman DW, Kehl LJ, Regunathan S, Reis DJ, Yezierski RP, Wilcox GL. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(19): 10584-9.
81. Fang J, Zuo D, Yu PH. Comparison of the cytotoxicity of quaternary pyridinium metabolite of haloperidol (HP⁺) with the neurotoxin N-methyl-4-phenyl pyridinium (MPP⁺) toward cultured dopaminergic neuroblastoma cells. *Psychopharmacology* 1995; 121: 373-8.
82. Feng Y, Piletz JE, Leblanc MH. Agmatine suppresses nitric oxide production and attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 2002; 52(4): 606-11.
83. Feng Y, LeBlanc MH, Regunathan S. Agmatine reduces extracellular glutamate during pentylentetrazole-induced seizures in rat brain: a potential mechanism for the anticonvulsive effects. *Neurosci Lett* 2005; 390(3): 129-33.
84. Fernandez-Gonzalo S, Jodar M, Pousa E, Turon M, Garcia R, Rambla CH, Palao D. Selective effect of neurocognition on different theory of mind domains in first-episode psychosis. *J Nerv Ment Dis* 2014; 202(8): 576-82.
85. Fidaleo M. Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62(6):615-25.
86. Flint B. Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 1995; 38: 357-66.

87. Fotakis G, Cemeli E, Anderson D, Timbrell JA. Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. *Toxicol in vitro* 2005; 19: 481-9.
88. Freifelder D. *Physical Biochemistry. Application to Biochemistry and Molecular Biology*, Freeman WH and Co., San Francisco, 1976.
89. Gandhi A(1), Guo T, Ghose R. Role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in regulating tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mediated increase of acetaminophen (APAP) and chlorpromazine (CPZ) toxicity in murine hepatocytes. *J Toxicol Sci* 2010; 35(2): 163-73.
90. Gilad GM, Salame K, Rabey JM, Gilad VH. Agmatine treatment is neuroprotective in rodent brain injury models. *Life Sci* 1996; 58(2): PL 41-6.
91. Gilad GM, Gilad VH. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. *Neurosci Lett* 2000; 296(2-3): 97-100.
92. Gilad GM, Gilad VH, Finberg JP, Rabey JM. Neurochemical evidence for agmatine modulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity. *Neurochem Res* 2005; 30(6-7): 713-9.
93. Girotti M, Khan N, Mc Lellan B. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991; 31: 32-5.
94. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta* 1991; 196(2-3): 143-51.
95. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 922-35.
96. Grima G, Benz B, Parpura V, Cuénod M, Do KQ. Dopamine-induced oxidative stress in neurons with glutathione deficit: implication for schizophrenia. *Schizophr Res* 2003; 62(3): 213-24.
97. Guo Q, Fu W, Holtsberg FW, Steiner SM, Mattson MP. Superoxide mediates the cell-death-enhancing action of presenilin-1 mutations. *J Neurosci Res* 1999; 56(5): 457-70.
98. Guo X, Fang M, Zhai J, Wang B, Wang C, Hu B, Sun X, Lv L, Lu Z, Ma C, Guo T, Xie S, Twamley EW, Jin H, Zhao J. Effectiveness of maintenance treatments with atypical and typical antipsychotics in stable schizophrenia with early stage: 1-year naturalistic study. *Psychopharmacology* 2011; 216(4): 475-84.
99. Gurd JW, Jones LR, Mahler HR, Moore WJ. Isolation and partial characterization of rat brain synaptic membrane. *J Neurochem* 1974; 22: 281-90.

100. Halaris A, Piletz JE. Relevance of imidazoline receptors and agmatine to psychiatry: a decade of progress. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1009: 1-20.
101. Halliwell B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 1996; 24(4): 1023-7.
102. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third edition, Oxford University Press Inc., New York, USA; 1999. p. 1-936.
103. Harkany T, Penke B, Luiten PG. β -Amyloid excitotoxicity in rat magnocellular nucleus basalis. Effect of cortical deafferentation on cerebral blood flow regulation and implications for AD. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 903: 374-86.
104. Harry GJ, Schmitt TJ, Gong Z, Brown H, Zawia N, Evans HL. Lead-induced alterations of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the developing rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 139(1): 84-93.
105. Hatanaka T, Sato S, Endoh M, Katayama K, Kakemi M, Koizumi T. Effect of chlorpromazine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pentobarbital in rats. *J Pharmacobiodyn* 1988; 11(1):18-30.
106. Hatcher EL, Chen IN, Kang YJ. Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but non antioxidant enzymatic activities. *Free Rad Biol Med* 1995; 19: 805-12.
107. Heales SJ, Bolaños JP. Impairment of brain mitochondrial function by reactive nitrogen species: the role of glutathione in dictating susceptibility. *Neurochem Int* 2002; 40: 469-74.
108. Heitzman RJ. *Veterinary drug residues*, Commission of the European Communities, Second edition, 1994.
109. Heneka MT, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L, Riederer P, Feinstein DL, Klockgether T. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60(9): 906-16.
110. Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 1975; 14: 5294-9.
111. Hoebe KH, Monshouwer M, Witkamp RF, Fink-Gremmels J, van Miert AS. Cocultures of porcine hepatocytes and Kupffer cells as an improved *in vitro* model for the study of hepatotoxic compounds. *Vet Q* 2000; 22(1): 21-5.

112. Hogg N. The effect of cysteine on the auto-oxidation of homocysteine. *Free Radical Bio Med* 1999; 27: 28-33.
113. Hu J, Kulkarni AP. Metabolic fate of chemical mixtures. I. "Shuttle Oxidant" effect of lipoxygenase generated radical of chlorpromazine related phenothiazines on the oxidation of benzidine and other xenobiotics. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 2000; 20(4): 195-208.
114. Hughes MN. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxyxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 263-72.
115. Hussain S, Slikker W Jr, Ali SF. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13(8): 811-7.
116. Hwang Y, Kim J, Shin JY, Kim JI, Seo JS, Webster MJ, Lee D, Kim S. Gene expression profiling by mRNA sequencing reveals increased expression of immune/inflammation-related genes in the hippocampus of individuals with schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2013; 3: e321.
117. Iizuka Y, Hong S, Kim CY, Yang WI, Lee JE, Seong GJ. Protective mechanism of agmatine pretreatment on RGC-5 cells injured by oxidative stress. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43(4): 356-8.
118. Iqbal FE, Hernández JA, Barba-Espín G, Koussa T, Aziz A, Faize M, Diaz-Vivancos P. Enhanced salt-induced antioxidative responses involve a contribution of polyamine biosynthesis in grapevine plants. *J Plant Physiol* 2014; 171(10): 779-88.
119. Ikeda K, Hirano M, Orita A, Takeuchi M. Chlorpromazine inhibits concanavalin A-induced liver injury independently of cytokine modulation. *Immunol Lett* 1997; 55(3): 127-31.
120. Ilyukha VA. Superoxide dismutase and catalase in the organs of mammals of different ecogenesis. *J Evol Biochem Physiol* 2001; 37: 241-5.
121. Jackson-Lewis V, Przedborski S. Neuroleptic medications inhibit complex I of the electron transport chain. *Ann Neurol* 1994; 35: 244-5.
122. Janssen-Heininger YMW, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, Stamler JS, Rhee S, Vilet A. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1-17.
123. Johnson J, Manzo W, Gardner E, Menon J. Reactive oxygen species and anti-oxidant defenses in tail of tadpoles, *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2013; 158(2): 101-8.

124. Jorgačević B, Mladenović D, Ninković M, Prokić V, Stanković M, Aleksić V, Cerović I, Vukićević RJ, Vučević D, Stanković M, Radosavljević T. Dynamics of oxidative/nitrosative stress in mice with methionine-choline-deficient diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Hum Exp Toxicol* 2013; 33(7): 701-9.
125. Kabuto H, Tada M, Kohno M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(3): 423-7.
126. Kalinina EV, Chernov NN, Aleud R, Novichkova MD, Saprin AN, Berezov TT. Current views on antioxidative activity of glutathione and glutathione-depending enzymes. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2010; (3): 46-54.
127. Kalra SP, Pearson E, Sahu A, Kalra PS. Agmatine, a novel hypothalamic amine, stimulates pituitary luteinizing hormone release *in vivo* and hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release *in vitro*. *Neurosci Lett* 1995; 194(3): 165-8.
128. Kanzaki H, Shinohara F, Kajiya M, Kodama T. The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling. *J Biol Chem* 2013; 288(32): 23009-20.
129. Kato TA, Monji A, Mizoguchi Y, Hashioka S, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, Utsumi H, Kanba S. Anti-Inflammatory properties of antipsychotics via microglia modulations: are antipsychotics a 'fire extinguisher' in the brain of schizophrenia? *Mini Rev Med Chem* 2011; 11(7): 565-74.
130. Kawai Y, Smedsrød B, Elvevold K, Wake K. Uptake of lithium carmine by sinusoidal endothelial and Kupffer cells of the rat liver: new insights into the classical vital staining and the reticulo-endothelial system. *Cell Tissue Res* 1998; 292(2): 395-410.
131. Kelder PP, Fischer MJ, de Mol NJ, Janssen LH. Oxidation of chlorpromazine by methemoglobin in the presence of hydrogen peroxide. Formation of chlorpromazine radical cation and its covalent binding to methemoglobin. *Arch Biochem Biophys* 1991; 284(2): 313-9.
132. Kelleher MO, McMahon M, Eggleston IM, Dixon MJ, Taguchi K, Yamamoto M, Hayes JD. 1-Cyano-2,3-epithiopropene is a novel plant-derived chemopreventive agent which induces cytoprotective genes that afford resistance against the genotoxic alpha, beta-unsaturated aldehyde acrolein. *Carcinogenesis* 2009; 30(10): 1754-62.
133. Kemp M, Go Y, Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 921-37.

134. Keynan O, Mirovsky Y, Dekel S, Gilad VH, Gilad GM. Safety and Efficacy of Dietary Agmatine Sulfate in Lumbar Disc-associated Radiculopathy. An Open-label, Dose-escalating Study Followed by a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Pain Med* 2010; 11(3): 356-68.
135. Kharitonov VG, Sundquist AR, Sharma VS. Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J Biol Chem* 1995; 270: 28158-64.
136. Khatua AK, Bhattacharyya M. NADPH-induced oxidative damage of rat liver microsomes: protective role of chlorpromazine and trifluoperazine. *Pol J Pharmacol* 2001; 53(6): 629-34.
137. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 267-94.
138. Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238: 215-20.
139. Koek GH, Liedorp PR, Bast A. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta* 2011; 412(15-16): 1297-305.
140. Koppal T, Drake J, Yatin S, Jordan B, Vazadarajan S, Bettenhausen L, Butterfield DA. Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane proteins: insight into oxidative stress in AD. *J Neurochem* 1999; 72(1): 310-7.
141. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol* 2013; 64(4): 409-21.
142. Kossel A. Über das agmatin. *Zeitschr Physiol Chem* 1910; 66: 257-61.
143. Kovačević TB, Borković SS, Pavlović SZ, Radojičić RM, Saičić ZS. The concentrations of antioxidant compounds in the hepatopancreas, the gills and muscle of some freshwater crayfish species. *Acta Biol Hung* 1996; 57: 449-58.
144. Kowiański P, Karwacki Z, Dziewiatkowski J, Domaradzka-Pytel B, Ludkiewicz B, Wójcik S, Litwinowicz B, Narkiewicz O, Moryś J. Evolution of microglial and astroglial response during experimental intracerebral haemorrhage in the rat. *Folia Neuropathol* 2002; 41(3): 123-30.
145. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1997-2015.

146. Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, Schavocky JP, Watterson DM, Van Eldik LJ. Mechanism of glial activation by S100 β : involvement of the transcription factor NF κ B. *Neurobiol Ageing* 2001; 22(5): 765-72.
147. Lavinsky D, Arteni NS, Netto CA. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. *Behav Brain Res* 2003; 141(1): 19-24.
148. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Orey D, Richter F, Samara M, Barbui C, Engel RR, Geddes JR, Kissling W, Stapf MP, Lässig B, Salanti G, Davis JM. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet* 2013; 382(9896): 951-62.
149. Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 1994; 263(5149): 966-9.
150. Li J, Li X, Pei G, Qin BY. Effects of agmatine on tolerance to and substance dependence on morphine in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1999; 20(3): 232-8.
151. Li T, Zhou Q, Zhang N, Luo Y. Toxic effects of chlorpromazine on *Carassius auratus* and its oxidative stress. *J Environ Sci Health B* 2008; 43(8): 638-43.
152. Lilić A, Dencic S, Pavlović SZ, Blagojević DP, Spasić MB, Stankoviwt NS, Saicić ZS. Activity of antioxidative defense enzymes in the blood of patients with liver echinococcosis. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64(4): 235-40.
153. Lin AM, Chen CF, Ho LT. Neuroprotective effect of intermittent hypoxia on iron-induced oxidative injury in rat brain. *Exp Neurol* 2002; 176(2): 328-35.
154. Liu Y, Hyde AS, Simpson MA, Barycki JJ. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. *Adv Cancer Res* 2014; 122: 69-101.
155. Loewen CJ. Lipids as conductors in the orchestra of life. *F1000 Biol Rep* 2012; 4: 4.
156. Lopert P, Patel M. Brain mitochondria from DJ-1 knockout mice show increased respiration-dependent hydrogen peroxide consumption. *Redox Biol* 2014; 2: 667-72.
157. Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2014; 48: 102-11.

158. Lores-Arnaiz S, D'Amico G, Czerniczyniec A, Bustamante J, Boveris A. Brain mitochondrial nitric oxide synthase: *in vitro* and *in vivo* inhibition by chlorpromazine. Arch Biochem Biophys 2004; 430(2): 170-7.
159. Lortie MJ, Novotny WF, Peterson OW, Vallon V, Malvey K, Mendonca M, Satriano J, Insel P, Thomson SC, Blantz RC. Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat. J Clin Invest 1996; 97(2): 413-20.
160. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193(1): 265-75.
161. Lutz CS, Cornett AL. Regulation of genes in the arachidonic acid metabolic pathway by RNA processing and RNA-mediated mechanisms. Wiley Interdiscip Rev RNA 2013; 4(5): 593-605.
162. MacAllister SL, Young C, Guzdek A, Zhidkov N, O'Brien PJ. Molecular cytotoxic mechanisms of chlorpromazine in isolated rat hepatocytes. Can J Physiol Pharmacol 2013; 91(1): 56-63.
163. Maiorino M, Wissing JB, Brigelius-Flohe R, Calabrese F, Roveri A, Steinert P, Ursini F, Flohe L. Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. FASEB J 1998; 12: 1359-70.
164. Manna P, Sinha M, Pal P, Sil PC. Arjunolic acid, a triterpenoid saponin, ameliorates arsenic-induced cyto-toxicity in hepatocytes. Chem Biol Interact 2007; 170(3): 187-200.
165. Marinkovic S, Milisavljevic M, Kostic V. Olfaktorni i limbički sistem. In: Funkcionalna i topografska neuroanatomija. Beograd: Naučna knjiga; 1989. p. 206-15.
166. Maruiwa M, Mizoguchi A, Russell GJ, Narula N, Stronska M, Mizoguchi E, Rabb H, Arnaout MA, Bhan AK. Anti-KCA-3, a monoclonal antibody reactive with a rat complement C3 receptor, distinguishes Kupffer cells from other macrophages. J Immunol 1993; 150(9): 4019-30.
167. Matović V, Plamenac-Bulat Z, Đukić M. Uticaj povećanog unošenja kadmijuma na antioksidativni zaštitni sistem. Jugoslov Med Biohem 2004; 23: 117-26.
168. Mattson MP, Pedersen WA. Effects of amyloid precursor protein derivatives and oxidative stress on basal forebrain cholinergic systems in AD. Int J Dev Neurosci 1998; 16(7-8): 737-53.
169. Matyszak MK, Townsend MJ, Perry VH. Ultrastructural studies of an immune-mediated inflammatory response in the CNS parenchyma directed against a non-CNS antigen. Neuroscience 1997; 78(2): 549-60.

170. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase and enzymatic function for erythrocyte cupreine (hemocupreine). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
171. McIntosh MP, Leong N, Katneni K, Morizzi J, Shackelford DM, Pranker RJ. Impact of chlorpromazine self-association on its apparent binding constants with cyclodextrins: Effect of SBE(7)-beta-CD on the disposition of chlorpromazine in the rat. *J Pharm Sci* 2010; 99(7): 2999-3008.
172. Mengozzi M, Fantuzzi G, Faggioni R, Marchant A, Goldman M, Orencole S, Clark BD, Sironi M, Benigni F, Ghezzi P. Chlorpromazine specifically inhibits peripheral and brain TNF production, and up-regulates IL-10 production, in mice. *Immunology* 1994; 82(2): 207-10.
173. Mink JW. Basal ganglia. In: Zigmond MJ, Bloom TE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, editors. *Fundamental neuroscience*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 951-72.
174. Misra RR, Hochadel JF, Smith GT, Cook JC, Waalkes MP, Wink DA. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 326-32.
175. Molderings GJ, Schmidt K, Bönisch H, Göthert M. Inhibition of 5-HT₃ receptor function by imidazolines in mouse neuroblastoma cells: potential involvement of sigma 2 binding sites. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 354(3): 245-52.
176. Molderings GJ, Haenisch B. Agmatine (decarboxylated L-arginine): physiological role and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2012; 133(3): 351-65.
177. Mosialou E, Ekstrom E, Adang A, Morgenstern R. Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1993; 45(8): 1645-51.
178. Mršulja BB, Kostić VS. Bolesti bazalnih ganglija. In: Jovanovic M, editor. *Neurohemija u neurološkim bolestima*. Beograd: Medicinska knjiga; 1994. p. 260-320.
179. Munch G, Gasic-Milenkovic J, Dukic-Stefanovic S, Kuhla B, Heinrich K, Riederer P, Huttunen HJ, Founds H, Sajithlal G. Microglial activation induces cell death, inhibits neurite outgrowth and causes neurite retraction of differentiated neuroblastoma cells. *Exp Brain Res* 2003; 150(1): 1-8.
180. Müller N, Ackenheil M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998; 22(1): 1-33.

181. Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK. Carvedilol attenuates neuroleptic-induced orofacial dyskinesia: possible antioxidant mechanisms. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 193-200.
182. Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Possible implication of disordered neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Nephrol* 2013; 17(5): 631-3.
183. Navarro-González JA, Garcia-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998; 44: 679-81.
184. Neitz A, Mergia E, Neubacher U, Koesling D, Mittmann T. NO regulates the strength of synaptic inputs onto hippocampal CA1 neurons via NO-GC1/cGMP signalling. *Pflugers Arch* 2014 Jul 11.
185. Netto LES, Oliveira MA, Monteiro G, Demasi APD, Cussiol JRR, Discola KF, Demasi M, Silva GM, Alves SV, Faria VG, Horta BB. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem Physiol C* 2007; 146: 180-93.
186. Newcomer JW. Antipsychotic medications: metabolic and cardiovascular risk. *J Clin Psychiatry* 2007; 68 Suppl 4: 8-13.
187. Olmos G, DeGregorio-Rocasolano N, Paz Regalado M, Gasull T, Assumpció Boronat M, Trullas R, Villarroel A, Lerma J, García-Sevilla JA. Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *Br J Pharmacol* 1999; 127(6): 1317-26.
188. Onal A, Delen Y, Ulker S, Soykan N. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. *Life Sci* 2003; 73(4): 413-28.
189. Ondarza RN, Rendón JL, Ondarza M. Glutathione reductase in evolution. *J Mol Evol* 1983; 19(5): 371-5.
190. Papadopoulos MC, Koumenis IL, Dugan LL, Giffard RG. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res* 1997; 748: 151-6.
191. Parke DV, Sapota A. Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Int J Occup Med Environ Health* 1996; 9(4): 331-40.
192. Parris M, Kidd PD. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern Med Rev* 1997; 2: 155-76.

193. Patel MX, Arista IA, Taylor M, Barnes TR. How to compare doses of different antipsychotics: a systematic review of methods. *Schizophr Res* 2013; 149(1-3):141-8.
194. Pathak NN, Balaganur V, Lingaraju MC, Kant V, Latief N, More AS, Kumar D, Kumar D, Tandan SK. Atorvastatin attenuates neuropathic pain in rat neuropathy model by down-regulating oxidative damage at peripheral, spinal and supraspinal levels. *Neurochem Int* 2014; 68:1-9.
195. Paulozzi Lj, Anest JL. Unintentional poisoning death – United States, 1999-2004. *MMWR*; 2007. 56: 93-6.
196. Piletz JE, Chikkala DN, Ernsberger P. Comparison of the properties of agmatine and endogenous clonidine-displacing substance at imidazoline and alpha-2 adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272(2): 581-7.
197. Piletz JE, Ordway GA, Rajkowska G, Zhu H, Klimek V, Swilley S, Duncan BJ, May W, Halaris AE. Differential expression of alpha2-adrenoceptor vs. imidazoline binding sites in postmortem orbitofrontal cortex and amygdala of depressed subjects. *J Psychiatr Res* 2003; 37(5): 399-409.
198. Pillai A, Parikh V, Terry AV Jr, Mahadik SP. Long-term antipsychotic treatments and crossover studies in rats: differential effects of typical and atypical agents on the expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res* 2007; 41(5): 372-86.
199. Pirazzini M, Azarnia Tehran D, Zanetti G, Megighian A, Scorzeto M, Fillo S, Shone CC, Binz T, Rossetto O, Lista F, Montecucco C. Thioredoxin and its reductase are present on synaptic vesicles, and their inhibition prevents the paralysis induced by botulinum neurotoxins. *Cell Rep* 2014; 8(6): 1870-8.
200. Pollmächer T, Haack M, Schuld A, Kraus T, Hinze-Selch D. Effects of antipsychotic drugs on cytokine networks. *J Psychiatr Res* 2000; 34(6): 369-82.
201. Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang E, Buga AM. ROS and brain diseases: the good, the bad, and the ugly. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 963520.
202. Porciúncula LO, Rocha JB, Boeck CR, Vendite D, Souza DO. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 2001; 299: 217-20.

203. Qi XM, Miao LL, Cai Y, Gong LK, Ren J. ROS generated by CYP450, especially CYP2E1, mediate mitochondrial dysfunction induced by tetrandrine in rat hepatocytes. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34(9): 1229-36.
204. Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J* 1997; 322: 167-73.
205. Radenovic L, Kartelija G. Effect of chlorpromazine on human and murine intracellular carboxylesterases. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69(4): 381-6.
206. Radermacher KA, Wingler K, Langhauser F, Altenhofer S, Kleikers P, Hermans JJR, de Angelis MH, Kleinschnitz C, Schmidt HHHW. Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(12): 1418-27.
207. Raffa M, Mechri A, Othman LB, Fendri C, Gaha L, Kerkeni A. Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33(7):1178-83.
208. Ramanathan K, Balakumar BS, Panneerselvam C. Effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol on arsenic-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21(12): 675-80.
209. Radox Laboratories, Ltd. Radicales Libres, United Kingdom, Crumlin, 1996; 1–16.
210. Regunathan S, Youngson C, Raasch W, Wang H, Reis DJ. Imidazoline receptors and agmatine in blood vessels: a novel system inhibiting vascular smooth muscle proliferation. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276(3): 1272-82.
211. Reineke JJ, Cho DY, Dingle YT, Morello AP 3rd, Jacob J, Thanos CG, Mathiowitz E. Unique insights into the intestinal absorption, transit, and subsequent biodistribution of polymer-derived microspheres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(34): 13803-8.
212. Reis DJ, Yang XC, Milner TA. Agmatine containing axon terminals in rat hippocampus form synapses on pyramidal cells. *Neurosci Lett* 1998; 250(3): 185-8.
213. Reis DJ, Regunathan S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(5): 187-93.
214. Riazi K, Honar H, Homayoun H, Rashidi N, Kiani S, Ebrahimkhani MR, Noorian AR, Ghaffari K, Jannati A, Dehpour AR. The synergistic anticonvulsant effect of agmatine and morphine: possible role of alpha 2-adrenoceptors. *Epilepsy Res* 2005; 65(1-2): 33-40.

215. Robb SJ, Connor JR. Nitric oxide protects astrocytes from oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 962: 93-102.
216. Rock RB, Peterson PK. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1(2): 117-26.
217. Rusic-Stojiljkovic M. Retrogradna transdukcija signala – prenos signala sa ćelijske membrane u jedro: specijalan slučaj kod neurona. In: *Osnovni principi molekularne neurobiologije*. Beograd: Nova prosveta; 1998. p. 119-40.
218. Russel RL, Siedlak SL, Raina AK, Bautista JM, Smith MA, Perry G. Increased neuronal glucose-6-phosphate dehydrogenase and sulphhydryl levels indicate reductive compensation to oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Biochem Biophys* 1999; 370(2): 236-9.
219. Sasaki C, Shinozuka T, Murakami C, Irie W, Maeda K, Watanabe T, Nakamaru N, Furukawa M, Nakamura S, Kurihara K. Simultaneous determination of 5 psychotropic drugs of various types in an autopsy case of acute multiple drug poisoning. *Forensic Sci Int* 2013; 227(1-3): 90-4.
220. Satriano J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. *Amino Acids* 2004; 26(4): 321-9.
221. Savoy AC, Lupan DM, Manalo PB, Roberts JS, Schlageter AM, Weinhold LC, Kozel TR. Acute lethal toxicity following passive immunization for treatment of murine cryptococcosis. *Infect Immun* 1997; 65(5): 1800-7.
222. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences. *Brazilian J Med Biolog Res* 2005; 38: 995-1014.
223. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191-212.
224. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 1999; 11(10): 3648-58.
225. Schubert P, Ogata T, Marchini C, Ferroni S. Glia-related pathomechanisms in AD: a therapeutic target? *Mech Ageing Dev* 2001; 123(1): 47-57.
226. Schulz SB, Heidmann KE, Mike A, Klafz ZJ, Heinemann U, Gerevich Z. First and second generation antipsychotics influence hippocampal gamma oscillations by interactions with 5-HT₃ and D₃ receptors. *Br J Pharmacol* 2012; 167(7): 1480-91.

227. Schwartz PJ, Reaume A, Scott R, Coyle JT. Effects of over- and under-expression of Cu,Zn-superoxide dismutase on the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum. *Brain Res* 1998; 789(1): 32-9.
228. Stajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS. *Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja*. Udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac; 2007. p. 1-449.
229. Stanacevic M, Murari K, Rege A, Cauwenberghs G, Thakor NV. VLSI Potentiostat Array With Oversampling Gain Modulation for Wide-Range Neurotransmitter Sensing. *IEEE Trans Biomed Circuits Syst* 2007; 1(1): 63-72.
230. Stevanovic I, Ninkovic M, Stojanovic I, Ljubisavljevic S, Stojnev S, Bokonjic D. Beneficial effect of agmatine in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in iNOS-/- knockout mice. *Chem Biol Interact* 2013; 206: 309-18.
231. Stewart CR, Landseadel JP, Gurka MJ, Fairchild KD. Hypothermia increases interleukin-6 and interleukin-10 in juvenile endotoxemic mice. *Pediatr Crit Care Med* 2010; 11(1): 109-16.
232. Su RB, Wei XL, Zheng JQ, Liu Y, Lu XQ, Li J. Anticonvulsive effect of agmatine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 77(2): 345-9.
233. Sulaiman A, Al-Shawi N, Jwaied A, Mahmood D, Hussain S. Protective effect of melatonin against chlorpromazine-induced liver disease in rats. *Saudi Med J* 2006; 27(10): 1477-82.
234. Sun M, Zigman S. An important spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine auto-oxidation. *Anal Biochem* 1978; 90: 81-89.
235. Sun R, Eriksson S, Wang L. Oxidative stress induced S-glutathionylation and proteolytic degradation of mitochondrial thymidine kinase 2. *J Biol Chem* 2012; 287(29): 24304-12.
236. Sundaram MS, Hemshekhar M, Thushara RM, Santhosh MS, Kumar SK, Paul M, Devaraja S, Kemparaju K, Rangappa KS, Girish KS. Tamarind seed extract mitigates the liver oxidative stress in arthritic rats. *Food Funct* 2014; 5(3): 587-97.
237. Suzuki H, Gen K, Inoue Y. Comparison of the anti-dopamine D₂ and anti-serotonin 5-HT(2A) activities of chlorpromazine, bromperidol, haloperidol and second-generation antipsychotics parent compounds and metabolites thereof. *J Psychopharmacol* 2013; 27(4): 396-400.
238. Suzuki T, Remington G, Mulsant BH, Rajji TK, Uchida H, Graff-Guerrero A, Mamo DC. Treatment resistant schizophrenia and response to antipsychotics: a review. *Schizophr Res* 2011; 133(1-3): 54-62.

239. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 749-90.
240. Tahsili-Fahadan P, Yahyavi-Firouz-Abadi N, Khoshnoodi MA, Motiei-Langroudi R, Tahaei SA, Ghahremani MH, Dehpour AR. Agmatine potentiates morphine-induced conditioned place preference in mice: modulation by alpha2-adrenoceptors. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31(8): 1722-32.
241. Thornalley PJ, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress, kinetics and mechanisms of its reaction with superoxide and hydrogen radicals. *BBA* 1985; 827: 36-44.
242. Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Isobe C, Ishizaki E. The cerebrospinal fluid oxidized NO metabolites, nitrite and nitrate in AD and vascular dementia of Binswanger type and multiple small infarct type. *J Neural Transm* 1998; 105(10-12): 1283-91.
243. Tong XK, Hamel E. Basal forebrain nitric oxide synthase (NOS)-containing neurons project to microvessels and NOS neurons in the rat neocortex: cellular basis for cortical blood flow regulation. *Eur J Neurosci* 2000; 12(8): 2769-80.
244. Torreilles F, Salman-Tabcheh S, Guerin M, Torreilles J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 30(2): 153-63.
245. Trayhurn P, van Heyningen R. The metabolism of amino acids in the bovine lens. Their oxidation as a source of energy. *Biochem J* 1973; 136(1): 67-75.
246. Ulusu NN, Tandoğan B. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem* 2007; 303(1-2): 45-51.
247. Uzbay T, Goktalay G, Kayir H, Eker SS, Sarandol A, Oral S, Buyukuysal L, Ulusoy G, Kirli S. Increased plasma agmatine levels in patients with schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2013; 47(8): 1054-60.
248. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mayur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
249. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003; 13: 57-149.
250. Wagner AP, Reck G, Platt D. Evidence that V+ fibronectin, GFAP and S100 beta mRNAs are increased in the hippocampus of aged rats. *Exp Gerontol* 1993; 28(2): 135-43.

251. Wang H, Regunathan S, Youngson C, Bramwell S, Reis DJ. An antibody to agmatine localizes the amine in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett* 1995; 183(1-2): 17-21.
252. Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 335-55.
253. Wang WP, Iyo AH, Miguel-Hidalgo J, Regunathan S, Zhu MY. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 2006; 1084(1): 210-6.
254. Wei XL, Su RB, Lu XQ, Liu Y, Yu SZ, Yuan BL, Li J. Inhibition by agmatine on morphine-induced conditioned place preference in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 515(1-3): 99-106.
255. Wójcikowski J, Boksa J, Daniel WA. Main contribution of the cytochrome P450 isoenzyme 1A2 (CYP1A2) to N-demethylation and 5-sulfoxidation of the phenothiazine neuroleptic chlorpromazine in human liver--A comparison with other phenothiazines. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(8): 1252-9.
256. Wójcikowski J, Daniel WA. Influence of antidepressant drugs on chlorpromazine metabolism in human liver-an *in vitro* study. *Pharmacol Rep* 2010; 62(6): 1062-9.
257. Wójcikowski J, Haduch A, Daniel WA. Effect of classic and atypical neuroleptics on cytochrome P450 3A (CYP3A) in rat liver. *Pharmacol Rep* 2012; 64(6): 1411-8.
258. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE, Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009; 37(1): 153-68.
259. Wu N, Su RB, Xu B, Lu XQ, Liu Y, Zheng JQ, Piletz JE, Li J, Qin BY. IRAS, a candidate for I1-imidazoline receptor, mediates inhibitory effect of agmatine on cellular morphine dependence. *Biochem Pharmacol* 2005; 70(7): 1079-87.
260. Wu N, Su RB, Liu Y, Lu XQ, Zheng JQ, Cong B, Li J. Modulation of agmatine on calcium signal in morphine-dependent CHO cells by activation of IRAS, a candidate for imidazoline I1 receptor. *Eur J Pharmacol* 2006; 548(1-3): 21-8.
261. Yamamoto Y, Takahashi K.. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys* 1993; 305(2): 541-5.
262. Yamanaka K, Hasegawa A, Sawamura R, Okada S. Cellular response to oxidative damage in lung induced by the administration of dimethylarsinic acid, a major metabolite of inorganic arsenics, in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 108(2): 205-13.

263. Yao JK, Leonard S, Reddy R. Altered glutathione redox state in schizophrenia. *Dis Markers* 2006; 22(1-2): 83-93.
264. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med* 2002; 33: 337-49.
265. Zhu MY, Iyo A, Piletz JE, Regunathan S. Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1670(2): 156-64.
266. Zhu MY, Wang WP, Bissette G. Neuroprotective effects of agmatine against cell damage caused by glucocorticoids in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 2006; 141(4): 2019-27.
267. Zomkowski AD, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport* 2002; 13(4): 387-91.
268. Žikić RV, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB, Milovanović SR. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Monografija, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac; 2000. p. 1-150.