



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU**



Mr Maja Đurendić-Brenesel

DISTRIBUCIJA OPIJATNIH ALKALOIDA U MOZGU

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2007.

*Posvećeno dragom kolegi i prijatelju
Bori Šušnjaru*

Ova doktorska disertacija je rađena na Institutu za sudsku medicinu, Klinički centar Novi Sad, Zavodu za fiziologiju i Zavodu za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu i Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Mentoru dr Nedi Mimici-Dukić, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, se najiskrenije i najtoplije zahvaljujem na svesrdnoj pomoći, korisnim savetima, sugestijama i podršci koju mi je pružila tokom izrade ove disertacije.

Dr Milošu Tasiću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, dugujem veliku zahvalnost na nesebičnoj pomoći i interesovanju, kao i dragocenim stručnim savetima u toku izrade ove disertacije.

Dr Miri Popović i dr Kseniji Kuhajdi, redovnim profesorima PMF-a u Novom Sadu, dr Vesni Ivetić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu i dr Milanu Popoviću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu se zahvaljujem na interesovanju koje su pokazali za ovaj rad.

Dr Silvani Andrić, vanrednom profesoru PMF-a u Novom Sadu se zahvaljujem na eksperimentalnim životinjama koje je obezbedila za ovu disertaciju.

Dr Vladimiru Pilji, asistentu Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, se posebno zahvaljujem na saradnji, pruženoj pomoći u radu sa eksperimentalnim životinjama, korisnim savetima, razumevanju, podršci i iskrenom prijateljstvu.

Ivanu Vorgučinu, glavnom tehničaru Instituta za sudsku medicinu u Novom Sadu, se najtoplije zahvaljujem na pruženoj pomoći u radu sa eksperimentalnim životinjama.

Dr Bogosavu Lažetiću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, mr Biljani Božin i mr Isidori Samojlik, asistentima Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, dugujem zahvalnost na pruženoj pomoći u radu sa eksperimentalnim životinjama.

Dr Branislavu Budakovu, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu se zahvaljujem na podršci i interesovanju za ovaj rad.

Mr Zvonimiru Sakaču se zahvaljujem na tehničkoj obradi teksta.

Svojoj dragoj porodici se zahvaljujem na podršci, razumevanju i strpljenju, a posebno suprugu Draganu na pomoći pri obradi eksperimentalnih rezultata i majci Evgeniji na korisnim sugestijama i savetima.

Dragim kolegama mr Đuri Vujicu, dipl. hem. Katarini Štajnic-Ristić i dipl. hem. Borislavu Šušnjaru se posebno zahvaljujem na pomoći, podršci, savetima, nezaboravnim prijatnim trenucima i prijateljstvu, bez kojih ovaj rad ne bi bio kompletan.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. OPIJUM-ISTORIJSKI PREGLED	4
2.2. DOBIJANJE OPIJUMA	7
2.3. OPIJATNI ALKALOIDI	9
2.3.1. Morfin	13
2.3.2. Kodein	14
2.3.3. Papaverin	14
2.3.4. Noskapin (narkotin)	15
2.4. SINTETIČKI OPIJATNI ANALGETICI	15
<i>Jedinjenja slične strukture morfinu</i>	18
2.4.1. Heroin	18
2.4.2. Hidromorfon (Dilaudid).....	20
2.4.3. Oksimorfon (Numorfan)	20
2.4.4. Etilmorfin (Dionin)	20
2.4.5. Hidrokodon.....	21
2.4.6. Oksikodon	21
2.4.7. Dihidrokodein	21
2.4.8. Buprenorfin	22
2.4.9. Etorfin.....	22
<i>Morfinani</i>	22
2.4.10. Butorfanol	22
2.4.11. Dekstrometorfan.....	23
<i>Benzomorfan</i>	23
2.4.12. Pentazocin.....	23
2.4.13. Fenazocin	23
<i>Difenilamini</i>	24
2.4.14. Metadon (Heptanon).....	24
2.4.15. Propoksifen	24
<i>Fenilpiperidini</i>	25
2.4.16. Meperidin (Petidin).....	25
2.4.17. Fentanil.....	25
2.5. BIOTRANSFORMACIJA OPIJATA.....	26
2.5.1. Biotransformacija morfina.....	26
2.5.2. Biotransformacija kodeina	28
2.5.3. Biotransformacija heroina.....	29
2.5.4. Biotransformacija metadona	30

2.6.	OPIJATNI ANTAGONISTI	31
2.6.1.	Nalorfin	31
2.6.2.	Nalokson	32
2.6.3.	Naltrekson	32
2.7.	ENDOGENI OPIJATI	33
2.7.1.	Opijatni peptidi	33
2.7.2.	Endogeni morfin	34
2.8.	OPIJATNI RECEPTORI	38
2.8.1.	Klasifikacija opijatnih receptora	38
2.8.2.	Struktura opijatnih receptora	39
2.8.3.	Lokalizacija opijatnih receptora	41
2.8.4.	Promena gustine μ -opijatnih receptora	44
2.9.	RAZLIKE U OSETLJIVOSTI NA OPIJATE KOD SUPROTNIH POLOVA	45
2.10.	UTICAJ OPIJATA NA OKSIDATIVNI STRES	48
2.10.1.	Uloga jetre u metabolizmu	49
2.10.2.	Enzimi oksidativnog stresa	49
2.10.2.1.	Lipidna peroksidacija (LP)	50
2.10.2.2.	Superoksid-dizmutaza (SOD)	51
2.10.2.3.	Katalaza (CAT)	51
2.10.2.4.	Glutation-peroksidaza (GSH-Px)	51
2.10.2.5.	Peroksidaza (Px)	51
2.10.2.6.	Ksantin-oksidaža (XOD)	52
2.10.2.7.	Glutation (GSH)	52
2.10.3.	Hepatotoksično dejstvo opijata	52
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	54
3.1.	MATERIJAL I METODE	54
3.1.1.	Humani biološki uzorci	56
3.1.1.1.	Postupak čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE-Solid Phase Extraction) humanih bioloških uzoraka za ispitivanje opijatnih alkaloida	56
3.1.2.	Biološki uzorci eksperimentalnih životinja (pacova)	57
3.1.2.1.	Postupak pripreme heroina za tretiranje eksperimentalnih životinja	57
3.1.2.2.	Tretiranje eksperimentalnih životinja heroinom	58
3.1.2.3.	Postupak čvrsto-tečne (SPE) ekstrakcije bioloških uzoraka eksperimentalnih životinja za ispitivanje opijatnih alkaloida	59
3.1.3.	Kvalitativna i kvantitativna GC-MS analiza bioloških uzoraka	59
3.1.4.	Ispitivanje aktivnosti enzima oksidativnog stresa i količine proteina u jetri eksperimentalnih životinja	61
3.1.4.1.	Određivanje sadržaja ukupnih proteina	61
3.1.4.2.	Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (LP)	62
3.1.4.3.	Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	62
3.1.4.4.	Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze (GSH-Px)	63
3.1.4.5.	Određivanje aktivnosti peroksidaze (Px)	63
3.1.4.6.	Određivanje aktivnosti ksantin-oksidaže (XOD)	64
3.1.4.7.	Određivanje sadržaja redukovano glutationa (GSH)	64
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	66
4.1.	POSTUPAK PRIPREME BIOLOŠKIH UZORAKA ZA ANALIZU	67
4.2.	KVALITATIVNA GC/MS ANALIZA HUMANIH BIOLOŠKIH UZORAKA	67
4.3.	KVANTITATIVNA GC/MS ANALIZA HUMANIH BIOLOŠKIH UZORAKA MOŽDANOG TKIVA	72
4.3.1.	Određivanje ukupnog sadržaja opijatnih alkaloida kod muških osoba	73
4.3.2.	Određivanje sadržaja pojedinačnih opijatnih alkaloida kod muških osoba	74

Kodein	75
Morfin	76
Acetilkodein	77
6-Acetilmorfin.....	79
Heroin	80
4.3.3. Određivanje ukupnog sadržaja opijatnih alkaloida kod ženskih osoba	82
4.3.4. Određivanje sadržaja pojedinačnih opijatnih alkaloida kod ženskih osoba ...	83
Kodein	83
Morfin	85
Acetilkodein	86
6-Acetilmorfin.....	87
Heroin	88
4.4. ANALIZA BIOLOŠKIH UZORAKA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA	91
4.4.1. Analiza heroina kojim su tretirane eksperimentalne životinje.....	92
4.4.2. Preliminarna istraživanja na eksperimentalnim životinjama	92
4.5. KVANTITATIVNA GC/MS ANALIZA BIOLOŠKIH UZORAKA MUŽJAKA PACOVA.....	94
4.5.1. Analiza ispitivanih opijata u moždanom tkivu	94
4.5.2. Analiza ispitivanih opijata u uzorcima krvi	100
4.6. KVANTITATIVNA GC/MS ANALIZA BIOLOŠKIH UZORAKA ŽENKI PACOVA.....	103
4.6.1. Analiza ispitivanih opijata u moždanom tkivu	103
4.6.2. Analiza ispitivanih opijata u uzorcima krvi	109
4.7. POREĐENJE SADRŽAJA OPIJATNIH ALKALOIDA U BIOLOŠKIM UZORCIMA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA SUPROTNIH POLOVA.....	112
4.8. UTICAJ OPIJATA NA BIOHEMIJSKE PARAMETRE U JETRI EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA.....	116
4.8.1. Uticaj opijata na relativnu masu jetre i sadržaj ukupnih proteina	116
4.8.2. Uticaj opijata na markere oksidativnog stresa u jetri eksperimentalnih životinja	117
4.8.2.1. Uticaj opijata na lipidnu peroksidaciju	117
4.8.2.2. Uticaj opijata na aktivnost katalaze.....	118
4.8.2.3. Uticaj opijata na aktivnost glutation-peroksidaze	118
4.8.2.4. Uticaj opijata na aktivnost peroksidaze	119
4.8.2.5. Uticaj opijata na aktivnost ksantin-oksidade.....	120
4.8.2.6. Uticaj opijata na količinu redukovanog glutationa	120
4.9. POREĐENJE VREDNOSTI BIOHEMIJSKIH PARAMETARA JETRE KOD EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA SUPROTNIH POLOVA	120
5. ZAKLJUČAK	124
6. LITERATURA	134
7. SAŽETAK.....	155
8. SUMMARY	157
9. BIOGRAFIJA.....	159

1. UVOD

Opijatni alkaloidi (opijati) su narkotički analgetici. Oni čine grupu prirodnih ili sintetičkih jedinjenja koja ispoljavaju dejstvo slično morfinu, osnovnom agensu za ublažavanje bola (dobijenom iz opijumskog maka).

Opijum je sasušeni mlečni sok, dobijen zasecanjem nezrelih čaura maka (*Papaver somniferum*). Od svih alkaloida prisutnih u opijumu, morfin zauzima prvo mesto po procentualnoj zastupljenosti i toksičnosti, a isto tako i u pogledu terapijske važnosti. Identifikovano je preko dvadeset različitih alkaloida, od kojih su osim morfina važni: kodein, tebain, papaverin, noskapin, mekonin.

Sintetski analgetici, kao što su meperidin (petidin), pentazocin (fortral), metadon (heptanon) se koriste kao zamena za prirodne alkaloidne iz opijuma.

Heroin (3,6-diacetilmorfin) je polusintetski derivat morfina. Proizvodi se direktno iz opijuma ili delimično čistog morfina. Znatno je toksičniji od morfina, ima tri puta jače dejstvo i veoma brzo dovodi do toksikomanije. Pretpostavlja se da je najadiktivnija droga. Danas se heroin gotovo isključivo upotrebljava kao sredstvo za uživanje, što uzrokuje nesagledive zdravstvene probleme i posledice.

Heroin je trenutno najopasnija droga u našoj zemlji. Na ilegalnom tržištu, heroin-prašak svetlo smeđe boje, osim čiste supstance 3,6-diacetilmorfina (5-50%), najčešće sadrži opijatne alkaloidne: mekonin, hidrokotarnin, tebaol, acetiltebaol, kodein, acetilkodein, morfin, monoacetilmorfin (3-acetilmorfin, 6-acetilmorfin), papaverin, noskapin i aditive: šećer (glukoza, saharoza, laktoza, manitol, dekstroza), paracetamol i kofein. Konzumiranjem heroina, za koji se nikada ne zna koliko sadrži procenata čiste supstance, u velikom broju slučajeva, trenutno nastupa stanje predoziranosti (overdose), koje može imati fatalan ishod.

U terapijske svrhe opijatni alkaloidi se koriste kao analgetici, antidijaretici i antitusici. U kliničkoj praksi se koriste samo četiri prirodna opijatna alkaloida: morfin, kodein, papaverin i noskapin.

Morfin i drugi prirodni i sintetički opijati prvenstveno ispoljavaju dejstvo na centralni nervni sistem, čulo vida i gastrointestinalni trakt. Pri hroničnoj upotrebi ili u slučaju akutnog

trovanja, morfin deluje sedativno, deprimira disanje, suzbija kašalj, prouzrokuje opstipaciju i miozu (suženje zenica).

Posebna karakteristika morfina je da na pojedinim integracionim nivoima centralnog nervnog sistema deluje depresivno, a na drugim ekscitatorno. Najvažniji farmakološki efekat morfina je analgezija, pri čemu se ne menja prag za percepciju drugih čulnih utisaka (dodir, miris, sluh). Morfin povišava prag za percepciju bola, deprimira psihičko doživljavanje bola, deluje sedativno, prouzrokuje prijatno raspoloženje (euforiju), što može biti razlog za nastajanje psihičke i fizičke zavisnosti. Paralelno sa euforijom, morfin prouzrokuje pospanost, apatiju, smanjenje fizičke aktivnosti i letargiju. Ekscitatorno dejstvo morfin ispoljava na primer stimulisanjem centra za povraćanje, što rezultuje mučninom i povraćanjem.

Osnovni nedostatak primene morfina u medicinske svrhe je što se pri produženoj terapiji neminovno razvija tolerancija, fizička i psihička zavisnost. Tolerancija je ukrštena u odnosu na ostale prirodne ili sintetičke opijate. Fizička zavisnost je evidentna kada je neophodno da se nastavi sa davanjem morfina, kako bi se izbegla pojava veoma neprijatnih apstinencijalnih sindroma.

Morfin i njemu srodni lekovi se vezuju za mnoga mesta u organizmu i tako prouzrokuju farmakološke efekte. Ta mesta, opijatni receptori, se prvenstveno nalaze u mozgu i nivou kičmene moždine, isključivo u nervnim strukturama. Opijatni receptori koji ispoljavaju visok afinitet prema egzogenim opijatima, istovremeno sadrže i visoke koncentracije endogenih opijatnih polipeptida. Ovi polipeptidi - enkefalini, endorfini i dinorfini deluju analgetički kao i morfin.

Toksičnost morfina je direktno prouzrokovana aktivacijom, tj. vezivanjem za μ (μ) receptore, koji imaju značajnu ulogu u bolu i analgeziji, respiratornim i kardiovaskularnim funkcijama, peristaltici, ishrani, raspoloženju, termoregulaciji, sekreciji hormona i regulaciji imunih funkcija.

Imunohistohemijskim ispitivanjima humanog mozga, u smrtnim slučajevima usled prekomerno uzete doze morfina, utvrđeno je da se morfin lokalizuje u citoplazmi neurona moždane kore, bazalnih ganglija, moždanog stabla, malog mozga i dela limbičkog sistema - hipokampusa i amigdale (*Kuhar i sar., 1973; Bero i sar., 1988; Bidlac i sar., 1988; Roy i sar., 1988; Mansour i Watson, 1993; Schmidt i sar., 1994; Liu i sar., 1996; Atweh i Kuhar, 1997a; 1997b; 1997c*).

U današnje vreme, sve je više smrtnih slučajeva prouzrokovanih konzumiranjem opijata. Toksikološka laboratorija na Institutu za sudsku medicinu u Novom Sadu ima dugogodišnje iskustvo u analiziranju bioloških uzoraka kao što su: krv, urin, želudačni sadržaj, žuč, jetra, u cilju identifikacije opijata kao uzročnika smrti. Usled veoma brze biotransformacije, opijatni alkaloidi se često ne mogu identifikovati analizom navedenih bioloških uzoraka (*Tasić i sar., 2007*). S obzirom da je neophodno utvrditi prisustvo opijatnih alkaloida u biološkim uzorcima osoba, kod kojih je smrt nastupila usled uzete doze heroina, ukazala se potreba za uvođenjem specifičnih metoda analiza moždanog tkiva i selekcije

delova moždanog tkiva sa najvećim sadržajem opijata. Istraživanja u ovom pravcu su od izuzetnog značaja.

Naglo umiranje osoba koje konzumiraju opijate (u praksi heroin), kod kojih autopsija pokazuje otok mozga i pluća, a toksikološka analiza ne toksične koncentracije heroina i njegovih metabolita, nema zadovoljavajuću interpretaciju. Ispitivanja navedenog stanja, koji se u literaturi podvodi i pod naziv *sindrom X*, upravo je predmet ove disertacije.

Hipoteza

Poznavanje regionalne distribucije heroina, odnosno opijata i njihovih metabolita u strukturama centralnog nervnog sistema i ispitivanje uticaja na enzime oksidativnog stresa izazvanog opijatima, pomaže razumevanju kompleksnog mehanizma naglog umiranja opijatnih zavisnika.

Cilj istraživanja

- Razrada postupaka izolacije opijatnih alkaloida iz humanih bioloških uzoraka i bioloških uzoraka eksperimentalnih životinja,
- razrada metoda za kvalitativnu i kvantitativnu GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) analizu bioloških uzoraka,
- ispitivanje distribucije opijatnih alkaloida: morfina, kodeina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u humanom mozgu, odnosno u njegovim pojedinim delovima: moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima, gde je ranijim istraživanjima utvrđena najveća gustina μ -opijatnih receptora,
- utvrđivanje eventualnih razlika u distribuciji opijatnih alkaloida u pojedinim delovima humanog moždanog tkiva suprotnih polova,
- ispitivanje distribucije opijatnih alkaloida: morfina, kodeina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u delovima moždanog tkiva (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima) eksperimentalnih životinja (pacova),
- utvrđivanje eventualnih razlika u distribuciji opijatnih alkaloida u pojedinim delovima moždanog tkiva eksperimentalnih životinja suprotnih polova i
- ispitivanje intenziteta lipidne peroksidacije (LP), aktivnosti enzima: katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GSH-Px), peroksidaze (Px) i ksantin-oksidge (XOD), sadržaja glutationa (GSH) u jetri pacova suprotnih polova, tretiranih opijatnim alkaloidima.

2. OPŠTI DEO

2.1. OPIJUM-ISTORIJSKI PREGLED

Prvi istorijski zapisi o dalekoj prošlosti ljudskog roda ukazuju da su droge biljnog porekla uzimali gotovo svi narodi, verovatno još u praistorijsko doba. Pretpostavlja se da je čovek imao prva iskustva sa drogama već u mlađem paleolitskom dobu (40000-10000 god. p.n.e.).

Prva biljka sa psihoaktivnim svojstvima koja se spominje u istoriji je mak (*Papaver somniferum*) (slika 2.1.).

Iskopavanjem ostataka naselja u Švajcarskoj iz neolitskog perioda (3200-2600 god. p.n.e.), otkriveno je da je mak bio uzgajan verovatno zbog hranljive vrednosti semena koje sadrži oko 45 % ulja. Narkotičko dejstvo ove biljke je nesumnjivo i tada bilo poznato.

Naziv opijum je izveden iz grčke reči *οπιον* - *opion*, što znači sok, s obzirom da se opijum dobija iz soka semene čaure maka. Preveden na latinski, *opion* je postao opijum.

Poznato je da su opijum koristili drevni Grci kao sredstvo za tretiranje različitih zdravstvenih tegoba, uključujući zmijski ujed, astmu, kašalj, grčeve, epilepsiju, glavobolju, gluvoću, takođe i kao sredstvo za uživanje, tako da su se opijumske bonbone i kolači slobodno prodavali na ulicama. Narodi kritske civilizacije su pravili kipove boginji maka i slaveći je, ukrašavali su joj glavu zarezanim čaurama maka iz kojih se cedio čudotvorni sok. Zavisnost od opijuma je bila prisutna i u visokom staležu, među



Slika 2.1. Mak-*Papaver somniferum*

vojskovođama i političarima drevnog Rima.

Starogrčki pesnik *Homer* (850 god. p.n.e.) u jednom spevu navodi da je Zevsova ćerka Helena vojnicima davala vino sa čudotvornim sokom, od kojeg su ovi zaboravljali na strah i bolest. Slično ovoj legendi, u Odiseji, *Homer* spominje napitak pod imenom *nepentes*, koji omogućava da se zaborave bol i nesreća. Veruje se da je Homerov čudotvoran napitak bio opijum, mada je neosporno da su zabeleške *Theophrastus-a* iz III veka p.n.e. prvi pisani izvor u kojem se spominje opijum.

"Otac medicine"-*Hippocrates* (460-370 god. p.n.e.) je prepisivao sok od belog maka sa semenom koprive.

Arapi su bili izuzetno dobro upoznati sa efektima opijuma, a arapski trgovci su ga preneli sa istoka gde se koristio prevashodno za lečenje dizenterije, tako da se u IV veku proširila kultura gajenja maka od Male Azije sve do Indije i Kine. Međutim, kineska literatura navodi upotrebu opijuma znatno ranije. Tako je poznati kineski hirurg *Hua To* (220-264 god.) davao pacijentima preparate od opijuma i kanabisa neposredno pre operacije.

U Evropi nije bila poznata većina opojnih droga sve do XIII veka, kada su krstaši sa Bliskog istoka doneli opijum (*Karch, 2002; Petrović, 2003; Milić, 2005*).

Smatra se da je prvi medicinski preparat na bazi opijuma propisao u XVI veku čuveni *Paracelsus* (1493-1541), pod nazivom *Laudanum* - opijumska tinktura. *Paracelsus* je opijum zvao "kamen besmrtnosti". Polazio je od činjenice da su san i ublaženje bola neizostavni deo lečenja, bez obzira na uzrok bolesti (*Karch, 2002*).

Slavni engleski lekar *Thomas Sydenham* je 1680. godine napisao: "Između brojnih lekova koje je Svevišnji Bog dao ljudima da olakšaju svoje patnje, ni jedan nije tako univerzalan i efektan kao opijum".

Početak masovne upotrebe opijuma u Kini se povezuje sa pojavom duvana, tj. pušenjem lule koje su uveli Holanđani sa Jave u XVII veku. Kinezi su mešali indijski opijum i duvan, produkte kojima su Holanđani trgovali, što je popularizovalo pušenja opijuma, sa ili bez duvana. Trgovina opijumom je bila veoma značajan izvor prihoda za kolonijalne sile Veliku Britaniju, Holandiju i Španiju. U to vreme je opijum bio dostupan u Evropi, ali njegova upotreba nije bila zabrinjavajuća.

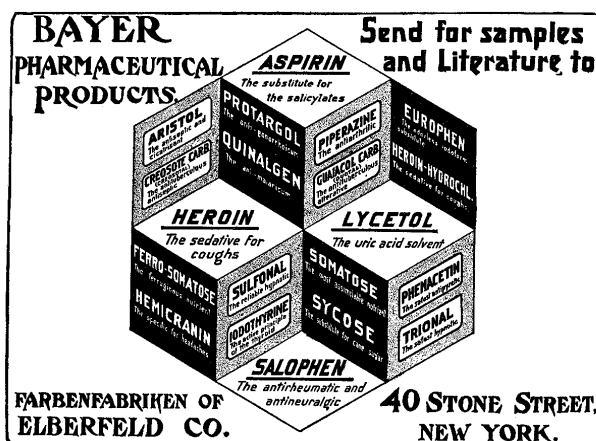
U XIX veku je Britanska istočno - indijska kompanija stavila monopol na kompletnu proizvodnju opijuma u Bengalu i uvozila sve veće količine opijuma u Kinu. Kada je 1820. god. Kina zabranila uvoz opijuma, kompanija je najpre organizovala krijumčarenje droge, a potom je privolela vladu Velike Britanije da primenom sile nametne uvoz opijuma u Kinu. Tako se 1840. god. odigrao prvi opijumski rat, a šesnaest godina kasnije drugi opijumski rat (1856-1860 god.), u kojem se Velikoj Britaniji pridružila Francuska i SAD. Kina je nakon poraza počela da gaji sopstveni opijumski mak i ubrzo je postala najveći proizvođač opijuma u svetu.

Setürner je 1805. godine izolovao glavni alkaloid opijuma i nazvao ga morfin, po *Morpheus*, grčkom bogu sna. Zatim je *Robiquet* izolovao opijatne alkaloidne noskapi i

kodein (1817 i 1832. god.). *Merck* je 1848. god. iz opijuma izolovao papaverin, a *Small* i *Lutz* su 1932. god. izolovali tebain. Otkriće opijatnih alkaloida je uslovalo da sredinom XIX veka njihova upotreba, u odnosu na sirovi opijum, postane dominantna i opšteprihvaćena u medicini širom sveta.

Škotski fizičar *Alexander Wood* je 1855. god. objavio svoje eksperimente, u kojima je davao ljudima opijum pomoću šprica za potkožne injekcije (hipodermički špric). Njegova supruga se podvrgla eksperimentima i verovatno je bila prva žena koja je umrla od prekomerno injektovane doze opijata. Otkrićem hipodermičkog šprica stvorena je opasna zabluda, da morfin unesen injekcionim putem u organizam ne izaziva zavisnost i potrebu za povećanjem doza (*Howard-Jones, 1972*). Komercijalna proizvodnja špriceva je počela nakon civilnog rata u SAD, opijati su se davali subkutano, a intravenske injekcije morfina i heroina su postale praksa tek 1920. god. (*Karch, 2002*).

Sve veći problem zavisnosti od opijuma i morfina podstakao je naučna istraživanja u cilju iznalaženja potentnog analgetika (painkiller) koji ne stvara zavisnost. Tako je 1874. god. *Alder Wright*, zagrevanjem morfina sa acetanhidridom sintetizovao 3,6-diacetilmorfin, tj. heroin, smatrajući ga adekvatnom zamenom za morfin, a da ne stvara zavisnost. Reč heroin potiče od nemačke reči *heroisch*, što znači - veliki.



Slika 2.2. Komercijalni proizvodi farmaceutske kompanije Bayer

Nemačka farmaceutska kompanija *Bayer* je 1898. god. započela komercijalnu proizvodnju leka pod imenom heroin, preporučujući ga za lečenje kašlja i tuberkuloze, takođe se koristio u lečenju zavisnosti od morfina (slika 2.2.) (*deRidder, 1994*).

Heroin je prodavan kao prašak, razblažen rastvor i u kapsulama. Otkrićem da je heroin znatno toksičniji od morfina, da ima tri puta jače dejstvo i veoma brzo dovodi do toksikomanije, kao i usled naglog porasta broja zavisnika o heroinu, njegova legalna proizvodnja je 1924. god. zabranjena u SAD.

Na ilegalnom tržištu se 1970-tih god. pojavio meksički heroin braon boje, koji se prodavao po nižim cenama u odnosu na evropski. Sredinom osamdesetih godina se na

američkom ilegalnom tržištu mogao naći heroin iz tri regije: Meksika, jugozapadne Azije (Pakistan, Avganistan, Turska, Liban) i jugoistočne Azije (Burma, Laos, Tajland), a ubrzo se pojavio i heroin iz Kolumbije. Ustanovljeno je (1997. god.) da je jugoistočna Azija odgovorna za polovinu svetske proizvodnje opijuma. Procenjeno je da se u ovoj regiji godišnje proizvede preko 200 tona heroina, pri čemu je za proizvodnju jedne tone potrebno prosečno deset tona morfina.

Rezultati brojnih ispitivanja ukazuju da je interesovanje omladine za drogu u svetu, a i u našoj zemlji, u stalnom porastu, pri čemu se starosna granica opasno pomera naniže. Masovna zloupotreba droge u našoj zemlji je počela šezdesetih godina prošlog veka a danas je opijum, odnosno heroin najpopularnija i najčešće korišćena droga, iako odnosi najviše žrtava, čije je lečenje najteže, a procenat izlečenih najniži (*Petrović, 2003*).

Konzumiranje opijata je duboko ukorenjeno u ljudskom društvu, široko rasprostranjeno, privlačno, izuzetno teško za lečenje, nemoguće ga je zaustaviti, a štetne posledice su višestruke, kako po konzumente, tako i po društvo u celini.

2.2. DOBIJANJE OPIJUMA

Opijum je mlečni sok koji se dobija zasecanjem nezrelih čaura opijumskog maka (*Papaver somniferum*) (slika 2.3.).

Čaure se zasecaju u svitanje ili smiraj dana, a mlečni sok, ili kako ga u narodu nazivaju "opijumske suze", se sakuplja tek nakon 8 do 14 sati, kada postane tamniji i gušći, tzv. lateks. Opijumska kaša se mesi i presuje u pogače, čija težina u proseku iznosi oko 400 grama. Opijumske pogače mogu dugo da stoje, vremenom sasvim očvrsnu i dobiju tamno mrku ili crnu boju u sredini (slika 2.4.).



Slika 2.3. Zasecanje nezrelih čaura opijumskog maka

Zasecanjem jedne čaure opijumskog maka se dobije oko 0,02 - 0,05 grama sirovog opijuma, tako da je za jednu opijumsku pogaču potrebno oko 10000 čaura. Opijumske pogače imaju veliku vrednost i zato ih nazivaju "crno zlato". U nekim delovima Makedonije su pogače nekada davane kao miraz. Danas je skoro sasvim napušteno klasično sakupljanje opijumskog soka i zamenjeno je mašinskom tehnologijom obrade opijumskog maka. Smatra



se da je balkanski i maloazijski mak najkvalitetniji jer sadrži najveći procenat morfina, s obzirom da procenat morfina određuje delotvornost i kvalitet opijuma. (NCB, 1998; Karch, 2002; Petrović, 2003).

Slika 2.4. Opijumska pogača

Opijum je sirovina dobijena iz maka i dalje se prerađuje, a finalni proizvodi se najčešće dele u tri grupe:

1. **preparisani opijum** - ekstrakt opijuma koji služi za pušenje uz pomoć specijalno konstruisanih lula (slika 2.5.);



Slika 2.5. Preparisani opijum i lula

2. **medicinski preparati opijuma** - posebno pripremljen opijum u prahu, pilulama ili kao tinktura (slika 2.6.);



Slika 2.6. Medicinski preparati opijuma

3. **medicinski preparati opijatnih alkaloida** - dobijaju se određenim industrijskim procesom, a najpoznatiji su morfin i njegovi derivati (kodein, heroin, dionin, dilaudid) (slika 2.7.).



Slika 2.7. Medicinski preparati opijatnih alkaloida

2.3. OPIJATNI ALKALOIDI

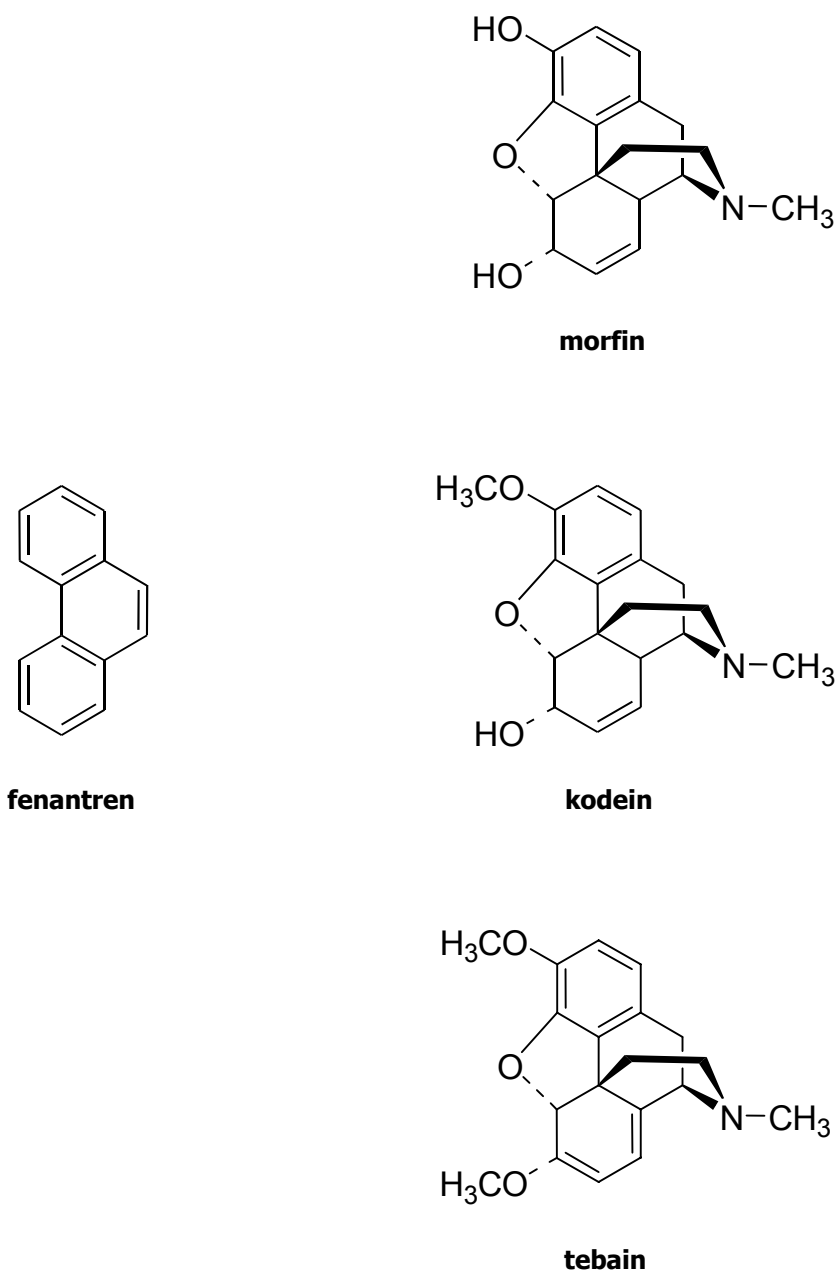
Opijatni alkaloidi predstavljaju oko 25 % mase opijuma. Osim alkaloida, opijum sadrži i tzv. balastne materije (organske kiseline, smole, sluzave materije, ulja, šećere, belančevinaste materije).

Alkaloidi imaju bazni karakter (otuda i njihovo ime), tako da se u opijumu nalaze vezani u obliku soli za mekonsku kiselinu (*Mokranjac, 1963; Varagić, 2002; Petrović, 2003*).

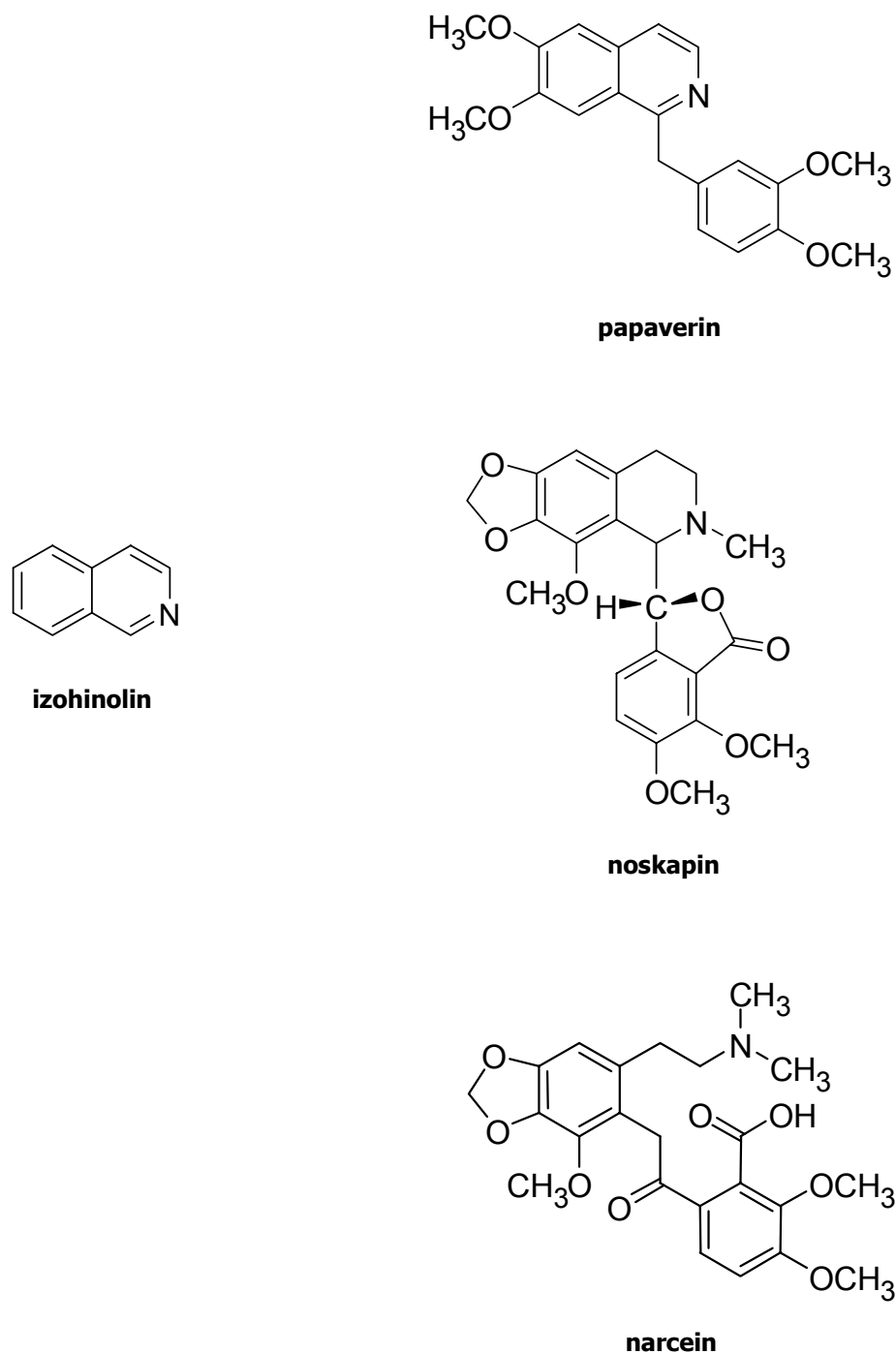
Od svih alkaloida prisutnih u opijumu, morfin zauzima prvo mesto, kako u pogledu procentualne zastupljenosti, tako i po terapijskom značaju i toksičnosti. Morfin čini 50 % i više od ukupnih alkaloida u opijumu. Identifikovano je preko dvadeset različitih alkaloida, od kojih su osim morfina važni: kodein, papaverin, noskapin (narkotin), tebain, narcein, mekonin, hidrokotarnin i dr. (*Rogers i sar., 1981*).

Na osnovu hemijske strukture, opijatni alkaloidi se mogu podeliti u grupe derivata:

- fenantrena (morfin, kodein, tebain) (slika 2.8.) i
- izohinolina (papaverin, noskapin, narcein) (slika 2.9.).



Slika 2.8. Alkaloidi fenantrenske strukture



Slika 2.9. Alkaloidi izohinolinske strukture

Hemijska struktura opijatnih alkaloida bitno utiče na njihovo farmakološko dejstvo. Tako, alkaloidi derivati fenantrena deluju uglavnom na centralni nervni sistem (CNS), izazivajući kombinaciju depresivnih i stimulativnih efekata i podstiču kontrakcije nekih glatkih mišića.

Nasuprot tome, alkaloidi derivati izohinolina imaju samo beznačajno dejstvo na CNS, a izrazito spazmolitičko dejstvo na glatke mišiće. Na osnovu navedenog, dejstvo opijuma se ne smatra identično morfinskom, nego predstavlja rezultantu delovanja svih alkaloida, sa dominantnim dejstvom alkaloida derivata fenantrena, naročito morfina (*Bogdanović, 1981*). Toksičnost opijuma je srazmerna procentualnoj zastupljenosti morfina. Posle morfina, prema toksičnosti slede kodein, tebain, papaverin, narcein i noskapin (klasifikacija po Rabuteau) (*Mokranjac, 1963*).

U terapijske svrhe opijatni alkaloidi se koriste kao analgetici, antidijaretici i antitusici (*Brecher, 1972; Jaffe, 1975*). U kliničkoj praksi koriste se samo četiri, od navedenih alkaloida, a to su: morfin, kodein, papaverin i noskapin.

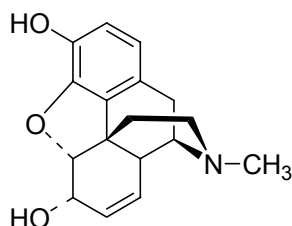
Osnovni nedostatak primene morfina u medicinske svrhe je što se pri produženoj terapiji neminovno razvija tolerancija, psihička i fizička zavisnost.

Tolerancija je stanje koje karakteriše smanjena reakcija na istu količinu droge, ili potreba za povećanjem doze droge da bi se postigao isti efekat. Primenom opijata, tolerancija se razvija veoma brzo, a veoma se brzo i gubi nakon određenog perioda apstinencije. Tolerancija je ukrštena u odnosu na ostale prirodne ili sintetičke opijate, ali ne i u odnosu na psihoaktivne supstance koje ispoljavaju depresivno dejstvo na CNS, kao što su alkohol i sedativi - hipnotici, npr. barbiturati.

Psihička zavisnost predstavlja jedan vid posebnog odnosa između droge i ličnosti. Nastaje usled toga što psihoaktivna supstanca izaziva neko prijatno (euforija) ili posebno raspoloženje, tj. željeno emocionalno stanje, tako da se javlja neodoljiva želja da se "osećaj zadovoljstva ili izbegavanje neprijatnog raspoloženja" ponovi. Dobro psihičko stanje osobe zavisi samo od toga da li u slučaju potrebe ima pri ruci željenu psihoaktivnu supstancu, koja je neophodan uslov za normalno mentalno funkcionisanje ličnosti. Po prestanku uzimanja psihoaktivne supstance pojavljuju se uglavnom blagi znaci apstinencije, kao što je nemir, depresija, letargija, u trajanju od nekoliko dana.

Fizička zavisnost karakteriše "prilagođeno" (promenjeno) stanje organizma, a manifestuje se psihofizičkim poremećajima nakon prestanka konzumiranja psihoaktivne supstance koja prouzrokuje zavisnost. Psihofizički poremećaji se nazivaju *apstinencijalni sindrom*, a najčešće su simptomi koji se javljaju u ovom sindromu suprotni onima koje psihoaktivna supstanca prouzrokuje. Step en apstinencijalnog sindroma je različit, ponekad može ugroziti život. Ponovnim konzumiranjem psihoaktivne supstance znaci apstinencije nestaju, tako da je često strah od neprijatnih apstinencijalnih pojava, osnovna pokretačka snaga koja zavisnu osobu primorava da kontinualno uzima drogu. Simptomi i znaci apstinencijalnog sindroma se ispoljavaju kao izražen nemir, razdražljivost, slabost, depresija, groznica, dijareja, ubrzano disanje, anoreksija, digestivne tegobe praćene abdominalnim bolom i gađenjem, ponekad grčevima, konvulzijama i gubitkom svesti (*Bogdanović, 1981; Rogers i sar., 1981; Varagić, 2002*).

2.3.1. MORFIN



Slika 2.10. Struktura morfina

Morfin (slika 2.10.) je najznačajniji i najpoznatiji alkaloid opijuma, u kojem je zastupljen 8 - 19 %, izolovan je 1805. god. (Setürner), hemijska struktura mu je otkrivena 1927. god. (Richardson), a totalna sinteza izvedena 1952. god. (Gates i Tschudi) (*Karch, 2002*). Morfin je beo kristalan prah, bez mirisa, oporog ukusa, a na svetlosti brzo dobija žućkastu boju. Morfin je i danas standardna supstanca za određivanje analgetskog efekta.

Analgezija je najvažniji farmakološki efekat morfina, zbog kojeg se kao lek upotrebljava u terapiji. Koristi se za suzbijanje najjačih bolova, kao kod opekotina, teških fraktura, infarkta miokarda, šoka i malignih oboljenja. Pri tome, ne prouzrokuje opštu depresiju CNS-a, ni gubitak svesti i ne menja prag za percepciju drugih čulnih utisaka (dodir, miris, sluh). Morfin povišava prag za percepciju bola i menja tip emocionalne reakcije prema bolu, tako što deprimira psihičko doživljavanje bola.

Posebna karakteristika morfina je da na pojedinim integracionim nivoima centralnog nervnog sistema deluje depresivno, a na drugim ekscitatorno.

Morfin, kao i ostali opijati, prouzrokuje prijatno raspoloženje - euforiju, koja se ubrzo zamenjuje pospanošću, apatijom i letargijom. U većim dozama, smanjuje osetljivost respiratornog centra prema ugljen-dioksidu i na taj način deprimira disanje. Kao i ostali opijati, snažno inhibira refleks kašlja, a stimuliše centar za povraćanje. Prouzrokuje miozu, smanjuje lučenje hlorovodonične kiseline u želudcu, deluje opstipantno i otežava mokrenje.

Morfin je rastvorljiv u vodi, a relativno slabo u lipidima, što se objašnjava hidrofilnošću molekula, s obzirom da poseduje dve hidroksilne grupe. Iako je CNS primarno mesto dejstva morfina, za razliku od heroina i kodeina, samo oko 20 % uzete doze morfina može da prođe hematoencefalnu (krvno-moždanu) barijeru i stigne do mozga, a zahvaljujući transportu pomoću P-glikoproteina (*Rogers i sar., 1981; Dambisa i sar., 1992; Letrent i Polli, 1999*). Kod dece ova barijera za morfin ne postoji, što je jedan od razloga njihove posebne osetljivosti prema morfinu. Svi opijati lako prolaze kroz placentu (*Varagić, 2002*).

Tolerancija se postiže, prosečno, nakon dve nedelje kontinualnog uzimanja morfina i manje, ukoliko se daju veće pojedinačne doze u kraćim vremenskim intervalima. Tako, osoba koja je tolerantna prema morfinu, može da podnese i od 20 do 200 puta veće doze od terapijskih (pojedini morfinomani su podnosili i 4 g morfina datog intravenski). Tolerancija je ukrštena u odnosu na ostale prirodne ili sintetičke opijate.

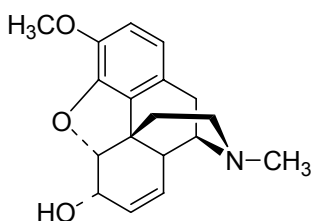
Akutno trovanje morfinom je najčešće posledica prekomerne kliničke doze, slučajnog unošenja veće količine, ali je u većini slučajeva samoubilačko. Doza od 100 mg i više prouzrokuje akutno trovanje, s obzirom da je terapijska pojedinačna doza 10 - 30 mg, a

najveća dnevna doza je 100 mg. Osnovni simptomi akutnog trovanja su koma, depresija disanja sa cijanozom i mioza.

Hronično trovanje morfinom (morfinomanija) nastaje konzumiranjem morfina u svrhu uživanja, pri čemu se prosečne dnevne doze kreću od 0,5 do 2,0 g. Posle naglog prekida uzimanja morfina, kod zavisne osobe se razvija apstinencijalni sindrom. Simptomi koji se razvijaju u okviru apstinencijalnog sindroma su suprotni uobičajenim farmakološkim efektima morfina, a najvažniji su nesanica, nemir, razdražljivost, midrijaza i dijareja. Sindrom dostiže maksimum 48 - 72 časa od poslednjeg uzimanja morfina, a zatim postepeno slabi u toku dve nedelje. Nakon spontanog prestanka apstinencijalnih simptoma, iščezava tolerancija prema morfinu, tako da često dolazi do smrtnog slučaja, ukoliko osoba u to vreme uzme dozu morfina koju je ranije podnosila (*Bogdanović, 1981; Varagić, 2002*).

Morfin se može unositi u organizam oralno, udisanjem para nakon zagrevanja, intanasalno, injekcionim putem (subkutano, intramuskularno, intravenski) i rektalno. Morfin se dobro resorbuje (kao i ostali opijati), a brzina dejstva zavisi od načina unošenja. Efekat oralno primenjene doze je znatno slabiji u poređenju sa intravenskom, intramuskularnom i subkutanom (*Stuart-Harris i Joel, 2000*).

2.3.2. KODEIN



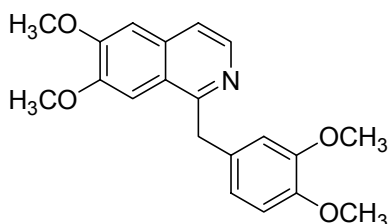
Slika 2.11. Struktura kodeina

Kodein (3-metoksimorfin) (slika 2.11.) je prirodni alkaloid opijuma, izolovao ga je *Robiquet* 1832. god. U zavisnosti od podneblja na kom se uzgaja opijumski mak, sadržaj kodeina se kreće od 0,7 do 2,5 %.

Primenjuje se najviše kao antitusik, mada ispoljava i analgetičko dejstvo koje je 20 % i manje, od potencijala morfina. Njegovo analgetičko dejstvo se ne pojačava sa povećanjem doze, zbog toga se koristi kao oralni analgetik za blage bolove (glavobolja, bol u leđima itd.). U analgetičkim preparatima se često kombinuje sa analgoantipiretikom paracetamolom.

Za razliku od morfina, ne izaziva euforiju (ili je izaziva u maloj meri) i retko se javlja zavisnost. Terapijska pojedinačna doza iznosi 30 - 100 mg, a maksimalna dnevna doza je 300 mg. Neželjeni efekti kodeina su vrtoglavica, pospanost, opstipacija i depresija disanja (*Varagić, 2002; Rang i sar., 2003*).

2.3.3. PAPAVERIN



Slika 2.12. Struktura papaverina

Papaverin (slika 2.12.) je prirodni alkaloid opijuma, u kojem je zastupljen od 0,5 do 1,0 %.

Upotrebljava se uglavnom kod nekih oboljenja kardiovaskularnog sistema, kod plućne embolije i cerebrovaskularne tromboze. Daje se

oralno, subkutano, intramuskularno, a ređe intravenski, kada može da izazove srčane aritmije.

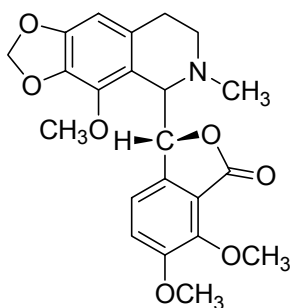
Terapijske pojedinačne doze papaverina se kreću od 40 do 200 mg, a maksimalne dnevne doze od 150 do 600 mg, u zavisnosti od načina davanja.

Dejstvo papaverina na centralni nervni sistem je beznačajno, tako da terapijske doze ne prouzrokuju san ni analgeziju. Ukoliko se daju velike doze ili se brzo ubrizga intravenski, može da dođe do treperenja srčanih komora i smrti.

Papaverin ispoljava spazmolitičko dejstvo, opušta mnoge glatke mišiće, naročito u krvnim sudovima, pri čemu ne parališe mišićne ćelije.

Dobro se resorbuje iz digestivnog trakta i nakon subkutanog i intramuskularnog ubrizgavanja. Znatno deo se nagomilava u jetri i masnim depozitima, a može se naći i u drugim tkivima. Metabolize se u jetri, a izlučuje se u urinu (*Bogdanović, 1981*).

2.3.4. NOSKAPIN (NARKOTIN)



Slika 2.13. Struktura noskapiina

Noskapiin (slika 2.13.) je prirodni alkaloid opijuma, izolovao ga je *Robiquet* 1817. god. Sadržaj noskapiina u opijumu se kreće od 4 do 6 %.

Primenjuje se kao antitusik, suzbija kašalj u istoj meri kao i kodein, ali ne prouzrokuje euforiju i zavisnost. Daje se oralno, terapijska pojedinačna doza iznosi 15 - 60 mg, a maksimalna dnevna doza je 250 mg.

Slično papaverinu, noskapiin deluje depresivno na glatke mišiće i srce, ali se ovo dejstvo ne ispoljava pri terapijskim koncentracijama.

Kao neželjeni efekti se javljaju pospanost, glavobolja, vrtoglavica i depresija disanja. Metabolize se u jetri, a izlučuje u urinu (*Bogdanović, 1981; Varagić, 2002*).

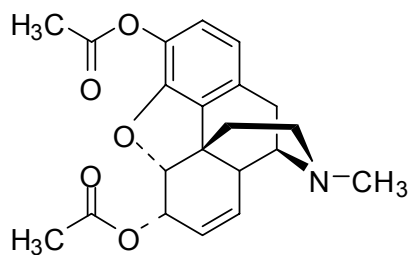
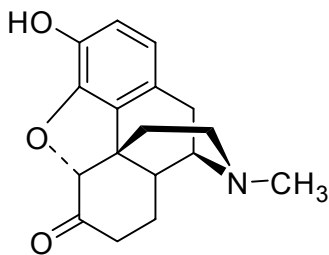
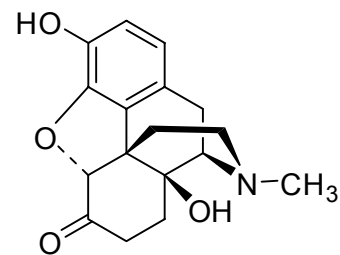
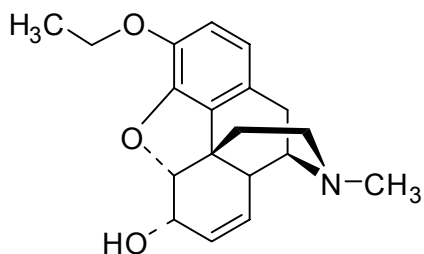
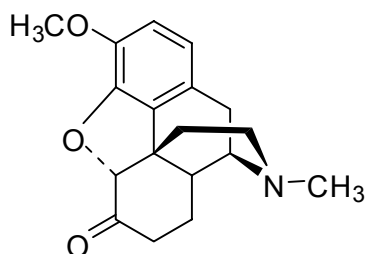
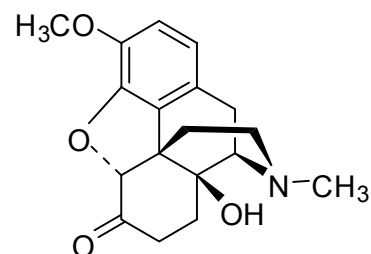
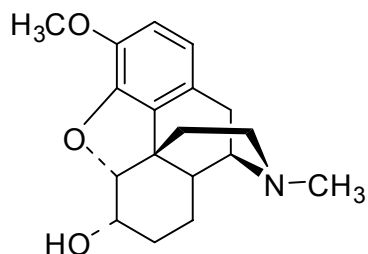
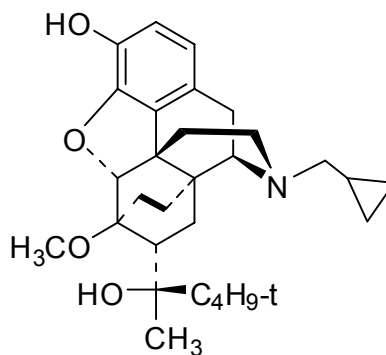
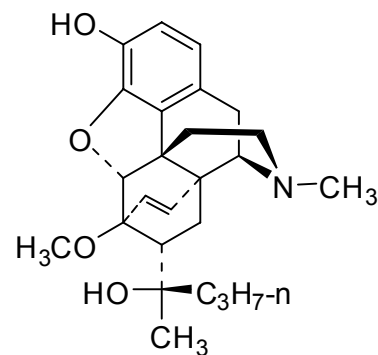
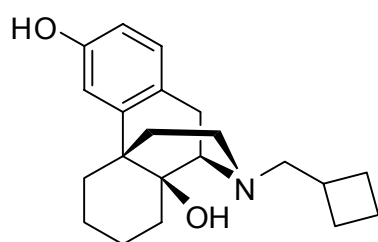
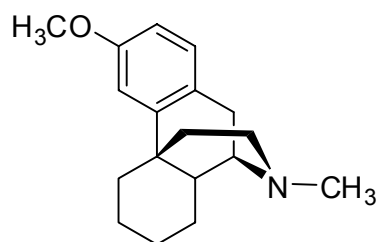
2.4. SINTETIČKI OPIJATNI ANALGETICI

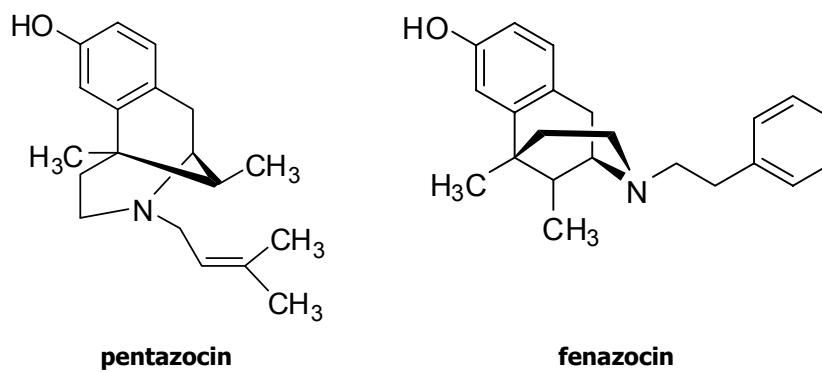
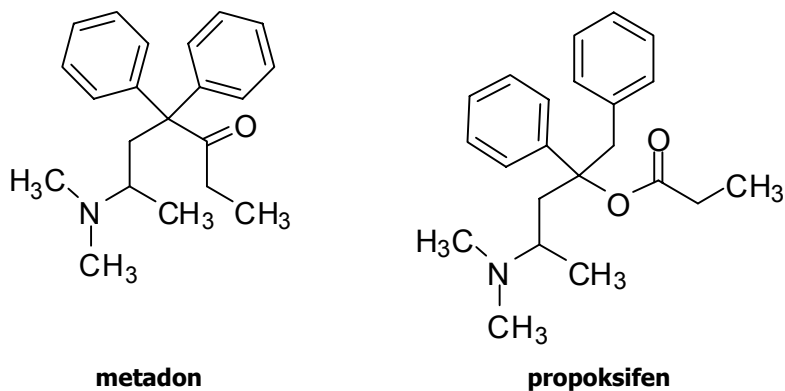
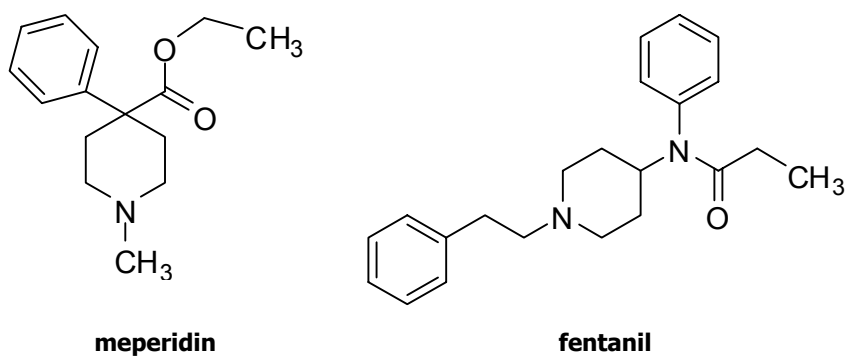
Neželjena dejstava morfina, naročito stvaranje toksikomanije, uslovala su pronalaženje polusintetičkih i sintetičkih jedinjenja, koja imaju analgetičko dejstvo slično morfinu, a ne ispoljavaju negativne efekte ovog alkaloida. U tu svrhu je sintetizovan velik broj jedinjenja, od kojih samo neka imaju kliničku primenu.

Ova jedinjenja se klasifikuju u 5 grupa, u zavisnosti od molekulske strukture (*Karch, 2002*):

1. jedinjenja slične strukture morfinu (slika 2.14.),
2. morfinani (butorfanol) (slika 2.15.),

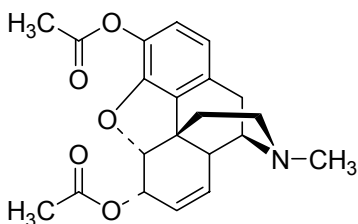
3. benzomorfolini (pentazocin) (slika 2.16.),
4. difenilamini (metadon) (slika 2.17.) i
5. fenilpiperidini (meperidin) (slika 2.18.).

**heroin****hidromorfon****oksimorfon****etilmorfin****hidrokodon****oksikodon****dihidrokodein****buprenorfin****etorfin****Slika 2.14.** Sintetički opijatni analgetici slične strukture morfinu**butorfanol****dekstrometorfan****Slika 2.15.** Sintetički opijatni analgetici - morfinani

**Slika 2.16.** Sintetički opijatni analgetici - benzomorfan**Slika 2.17.** Sintetički opijatni analgetici – difenilamini**Slika 2.18.** Sintetički opijatni analgetici - fenilpiperidini

JEDINJENJA SLIČNE STRUKTURE MORFINU

2.4.1. HEROIN



Slika 2.19. Struktura heroina

Heroin (3,6-diacetilmorfin) (slika 2.19.) je polusintetski derivat morfina, prvi ga je sintetizovao *Alder Wright* 1874. god.

Felix Hoffman, radeći za farmaceutsku kompaniju *Bayer*, sintetizovao je heroin 1897. god., a godinu dana kasnije je počela komercijalna proizvodnja ove supstance za lečenje kašlja, tuberkuloze i zavisnosti od morfina.

U Velikoj Britaniji se heroin još može naći u kliničkoj praksi, gde se koristi kao analgetik, iako je u mnogim zemljama zabranjen (*Rang i sar., 2003*), tako da se najviše upotrebljava kao sredstvo za uživanje.

Heroin se u ilegalnim laboratorijama proizvodi direktno iz opijuma ili poluprečišćenog morfina, zagrevanjem sa acetanhidridom, a postupak se odvija u nekoliko faza i traje 12 - 14 sati.

U našoj zemlji na ilegalnom tržištu, heroin - prašak svetlo smeđe boje, osim čiste supstance 3,6-diacetilmorfina (5 - 50%), najčešće sadrži opijatne alkaloida: mekonin, hidrokotarnin, tebaol, acetiltebaol, kodein, acetilkodein, morfin, monoacetilmorfin (3-acetilmorfin, 6-acetilmorfin), papaverin i noskapin.

Prilikom pripreme za prodaju, da bi se povećala masa, heroinu se dodaju i razni aditivi: šećer (glukoza, saharoza, laktoza, manitol, dekstroza), skrob, kinin, paracetamol, kofein, prokain, difenhidramin (*Chaudron-Thozet, 1992; Bjornsdottir i Hansen, 1995*).

Veće količine heroina (1 kg) se prodaju u paketima oblika "cigle" oblepljene izolir trakom ili u najlonskim kesama (slika 2.20.), a manje količine (0,1 - 5,0 g), u paketićima oblika "pisma" od različitog papira, zatopljenim najlonskim kesicama, najlonskim kesicama oblika "lopte" ili u plastičnim ambalažama od lekova (slika 2.21.).



Slika 2.20. Pakovanje veće količine heroina za ilegalno tržište



Slika 2.21. Pakovanje manje količine heroina za ilegalno tržište

Heroin je droga za koju se nikada ne zna koliko sadrži procenata čiste supstance. Često se dešava da, ukoliko se konzumira nisko procentni heroin, zatim nabavi procentualno jači heroin, po njegovoj primeni trenutno nastupi stanje predoziranosti (overdose), koje može imati fatalan ishod. Međutim, dešava se da i relativno mala količina heroina može da izazove smrt usled kardiovaskularnog kolapsa i plućnog edema. Ovaj sindrom je poznat kao: akutna fatalna reakcija ili *sindrom X*, do kog najčešće dolazi ukoliko se istovremeno sa heroinom konzumiraju depresanti CNS-a, kao što su alkohol i barbiturati (Anthony i Helzer, 1991; O'Brien, 1992; Gossop, 2000).

Heroin je znatno potentniji od morfina, ima tri puta jače analgetičko dejstvo i veoma brzo dovodi do toksikomanije. Pretpostavlja se da je najadiktivnija droga, samo posle nekoliko dana primene, stvara snažnu fizičku zavisnost. Trenutno je najpopularnija i najopasnija droga u našoj zemlji (Petrović, 2003).

U dozama od 1 - 2 mg deluje analgetički, uobičajena terapijska doza je 4 mg, a količina od 5 mg već može biti toksična, dok smrt može nastupiti i uzimanjem 10 mg. Pretpostavljena minimalna letalna doza heroina je 200 mg, ali zavisnici mogu konzumirati i 10 puta veću količinu (Mokranjac, 1963).

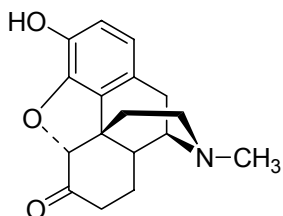
Heroin se unosi u organizam injekcionim putem (subkutano, intramuskularno, intravenski), intranasalno, udisanjem para nakon zagrevanja, poznato kao "isterivanje zmaja" (chasing the dragon) i pušenjem, pomešan sa sadržajem cigarete (Kramer, 1990; Strang i Griffiths, 1997).

Intravenskim unošenjem se postiže najintenzivnije dejstvo i najbrže započinje euforija, za svega 7 - 8 sekundi. Intramuskularnim unošenjem euforija započinje nakon 5 - 8 minuta, a intranasalnim, u toku 10 - 15 minuta. Intravenski unesen heroin, obično ima tri faze dejstva:

1. faza udarnog dejstva, tzv. bljeska (flesh), kratkotrajna je, praćena je tahikardijom i subjektivnim doživljajem toplote,
2. euforično meditativna faza (stound), koju karakteriše blaga euforija, smirenost, osećaj prijatnog umora, pospanost i

3. hipnotička faza, koja je karakterisana pospanošću i snom. Posle buđenja prisutan je umor, odsustvo motivacije, psihička depresija, anksioznost i opsesivna želja da se nabavi i uzme nova količina droge.

2.4.2. HIDROMORFON (DILAUDID)



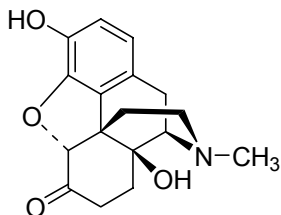
Slika 2.22. Struktura hidromorfona

Polusintetski derivat morfina, hidromorfon (slika 2.22.) je 7 - 10 puta potentniji od morfina (Mahler i Forrest, 1975). Spada u veoma efikasno sredstvo za ublažavanje bolova.

Primenjuje se u različitim dozama, u obliku tableta, praška, rastvora za oralnu primenu, rektalnih supozitorija i rastvora za injekcionu primenu.

U odnosu na morfin, analgetičko dejstvo traje kraće, a nauzeja, povraćanje, opstipacija i euforija su slabije izraženi. Pretpostavlja se da će se ispoljiti klasični simptomi opijatne intoksikacije, ukoliko se uzme prekomerna doza hidromorfona (Karch, 2002).

2.4.3. OKSIMORFON (NUMORFAN)

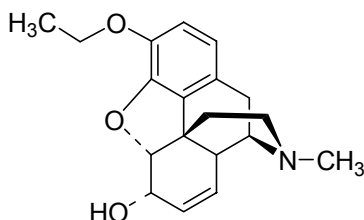


Slika 2.23. Struktura oksimorfona

Polusintetski derivat morfina, oksimorfon (slika 2.23.) je 7 - 10 puta potentniji od morfina. U odnosu na morfin, analgetičko dejstvo traje isti vremenski period, a nauzeja, povraćanje, opstipacija i euforija su jače izraženi.

Primenjuje se uglavnom intravenski kao anestetičko sredstvo, međutim može da izazove snažnu depresiju disanja, 5 sati nakon primene (Patt, 1988).

2.4.4. ETILMORFIN (DIONIN)

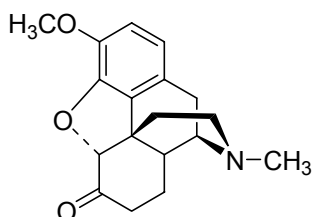


Slika 2.24. Struktura etilmorfina

Polusintetski derivat morfina, etilmorfin (slika 2.24.) je manje potentan u odnosu na morfin, a potentniji u odnosu na kodein.

Primenjuje se kao antitusik, i to samo kao privremeni lek, s obzirom da stvara zavisnost.

2.4.5. HIDROKODON

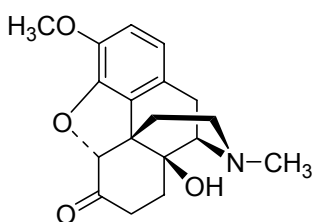


Slika 2.25. Struktura hidrokodona

Polusintetski derivat kodeina i tebaina, hidrokodon (slika 2.25.) se primenjuje kao oralni antitusik, u obliku tableta, kapsula i sirupa.

U komercijalnim preparatima se često kombinuje sa paracetamolom, aspirinom, brufenom i nekim antihistaminicima. Njegovom prekomernom primenom stvara se psihička i fizička zavisnost.

2.4.6. OKSIKODON



Slika 2.26. Struktura oksikodona

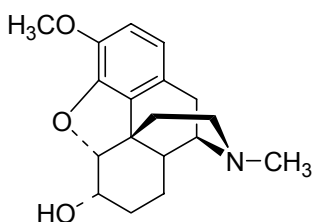
Polusintetski derivat tebaina, oksikodon (slika 2.26.) je sintetizovan 1916. god. u Nemačkoj, par godina nakon što je farmaceutska kompanija *Bayer* obustavila masovnu proizvodnju heroina. Smatralo se da ovaj derivat tebaina ima isto analgetičko dejstvo kao morfin i heroin, a slabije izraženo euforično dejstvo, koje bi dovelo do stvaranja zavisnosti i zloupotrebe.

Međutim, na osnovu subjektivnih iskustava, utvrđeno je da oksikodon prouzrokuje euforiju u dovoljnoj meri, što je uslovalo njegovu zloupotrebu.

U medicinske svrhe se primenjuje kao oralni analgetik za ublažavanje jakih bolova, u obliku tableta, pri čemu se često kombinuje sa paracetamolom, aspirinom, brufenom.

Tolerancija i fizička zavisnost mogu da nastanu nakon nekoliko dana primene, ukoliko su potrebne veće doze da bi se postigao analgetički efekat (*Coluzzi i Mattia, 2005*).

2.4.7. DIHIDROKODEIN



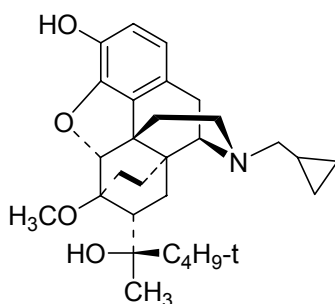
Slika 2.27. Struktura dihidrokodeina

Sintetički opijatni analgetik, dihidrokodein (slika 2.27.) je sličan kodeinu po hemijskoj strukturi, farmakološkom dejstvu i potentnosti. Primenjuje se kao oralni analgetik za ublažavanje bolova nakon operacije i kao antitusik. Često se kombinuje sa paracetamolom i kofeinom.

Iako biotransformacijom dihidrokodeina nastaju veoma aktivni metaboliti, kao što su dihidromorfin i dihidromorfin-6-glukuronid, koji je 100 puta potentniji, ne ispoljavaju značajne farmakološke efekte, s obzirom da nastaju u malim količinama (*Schmidt i sar., 2003*).

Tolerancija, psihička i fizička zavisnost mogu da nastanu kontinualnom upotrebom dihidrokodeina (*O'Neill i sar., 2000*).

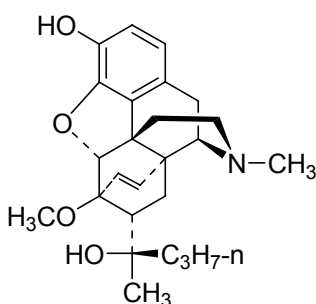
2.4.8. BUPRENORFIN



Slika 2.28. Struktura buprenorfina

Polusintetski derivat tebaina, buprenorfin (slika 2.28.) je u poređenju sa morfinom 25 - 50 puta potentniji i duže ispoljava farmakološko dejstvo. Primenjuje se kao analgetik i za lečenje zavisnosti od opijata (*Wallenstein, 1986*).

2.4.9. ETORFIN



Slika 2.29. Struktura etorfina

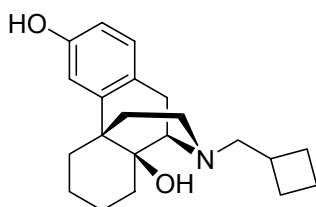
Sintetički opijatni analgetik, etorfin (slika 2.29.) je sintetisan 1963. god., može se dobiti iz tebaina. Etorfin ima oko 3000 puta jače analgetičko dejstvo od morfina.

Zbog svog izuzetno snažnog dejstva, primenjuje se za imobilizaciju divljih životinja, npr. slonova i drugih velikih sisara. Samo 4 mg etorfina je dovoljno za imobilizaciju afričkog slona težine 5 tona.

Etorfin je veoma toksičan, često je radi lakšeg prepoznavanja njegov rastvor obojen crvenom bojom, prodaja je strogo kontrolisana, a može se nabaviti samo u veterinarske svrhe (*Stegmann, 1999; Rang i sar., 2003*).

MORFINANI

2.4.10. BUTORFANOL

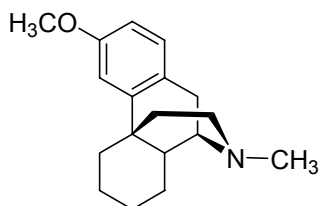


Slika 2.30. Struktura butorfanola

Sintetički opijatni analgetik, butorfanol (slika 2.30.) se primenjuje intranasalno u vidu spreja za lečenje migrene i parenteralno kao analgetik (*Katzung, 2001*).

Neželjeni efekti butorfanola su pospanost, slabost, znojenje i nauzeja. Butorfanol ne prouzrokuje zavisnost (*Varagić, 2002*).

2.4.11. DEKSTROMETORFAN



Slika 2.31. Struktura dekstrometorfana

Sintetički opijatni analgetik, dekstrometorfan (slika 2.31.) se primenjuje kao antitusik. Prednost primene dekstrometorfana u odnosu na kodein je što ne stvara fizičku zavisnost.

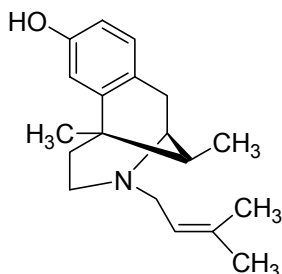
Dekstrometorfan u terapijskim dozama ne ispoljava ili u veoma maloj meri ispoljava psihološke efekte.

Međutim, uzimanjem 7 - 50 puta veće doze od terapijskih u relativno kratkom vremenskom periodu, javljaju se promene svesti, čiji se efekti razlikuju.

Pojedinci su efekte promene svesti opisali kao veoma prijatne, slične kao kada se kombinuju opijati i halucinogeni, a nasuprot tome, drugi su opisali stanje disforije, panike ili straha (*Wolfe i Caravati, 1995; Boyer, 2004*).

BENZOMORFANI

2.4.12. PENTAZOCIN



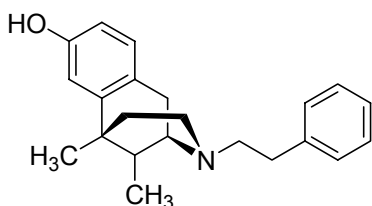
Slika 2.32. Struktura pentazocina

Sintetički opijatni analgetik, pentazocin (slika 2.32.) ima dva puta slabije dejstvo od morfina, a primenjuje se kao analgetik oralno, intramuskularno i subkutano.

Pentazocin je mešoviti agonist - antagonist. U malim dozama mu je dejstvo slično morfinu, a u velikim dozama izaziva blagu depresiju disanja, izraženu disforiju sa halucinacijama. Njegova antagonistička aktivnost se ispoljava ako se primeni istovremeno sa morfinom, tako što smanjuje analgetičko i druga delovanja morfina, a može da prouzrokuje pojavu apstinencijalnog sindroma kod zavisnika od morfina.

Iako manje, u poređenju sa ostalim opijatima, pentazocin pokazuje sklonost ka stvaranju zavisnosti i daleko je od idealne zamene za morfin, kako se ranije smatralo.

2.4.13. FENAZOCIN



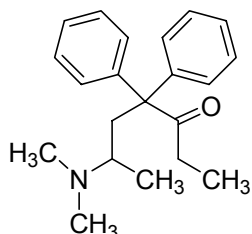
Slika 2.33. Struktura fenazocina

Sintetički opijatni analgetik, fenazocin (slika 2.33.) ima tri puta jače analgetičko dejstvo od morfina. Manje je efikasan kada se daje oralno, tako

da se primenjuje intramuskularno. Neželjena dejstva su opstipacija i stvaranje zavisnosti.

DIFENILAMINI

2.4.14. METADON (HEPTANON)



Slika 2.34. Struktura metadona

Sintetički opijatni analgetik, metadon (slika 2.34.) je sintetisao *Max Bockmühl* 1937. god. Metadon ima farmakološko dejstvo slično morfinu, ali znatno duže (24 časa) i manje sedativno dejstvo. S obzirom da se njegovom primenom tolerancija i fizička zavisnost razvijaju nešto sporije nego kod morfina, intenzivno se primenjuje u lečenju morfinske ili heroinske zavisnosti (terapija održavanja na metadonu) (*Blake i sar., 1997; Garrido i Trocóniz, 1999*).

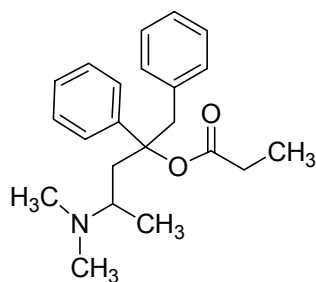
U prisustvu metadona, injekcija morfina ili heroina ne izaziva očekivanu euforiju, a odsustvo apstinencijalnog sindroma omogućava da se zavisnici odviknu od opijata pomoću redovnih oralnih doza metadona (*Rang i sar., 2003*).

Metadon se primenjuje i kao analgetik, za smanjenje intenzivnih bolova različitog porekla. Analgetičko dejstvo je praćeno hipnozom i depresijom disanja, ali u manjoj meri u odnosu na morfin. Metadon ima izraženo lokalno anestetičko dejstvo, kao i dejstvo na refleks kašlja.

Neželjeni efekti metadona se ispoljavaju kao vrtoglavica, muka, povraćanje, a ređe se javljaju sanjivost, suvoća usta, znojenje i mentalna depresija (*Bogdanović, 1981*).

Metadonski preparat dugog dejstva l- α -acetilmetadol (LAAM), se isključivo koristi u terapiji održavanja kod teških zavisnika od opijata. Ima znatnu prednost u odnosu na metadon, zbog toga što pojedinačna oralna doza LAAM-a uspešno potiskuje većinu neprijatnih apstinencijalnih simptoma u toku 72 sata (*Petrović, 2003*).

2.4.15. PROPOKSIFEN



Slika 2.35. Struktura propoksifena

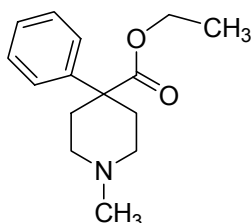
Sintetički opijatni analgetik, propoksifen (slika 2.35.) ispoljava slabije analgetičko dejstvo u odnosu na kodein, a ne suzbija kašalj.

Propoksifen se primenjuje oralno, za suzbijanje slabijih do umereno jakih bolova. Neželjena dejstva su slična kao kod kodeina, osim što se nauzeja, anoreksija i opstipacija ređe javljaju. Umerene toksične doze prouzrokuju sanjivost, pa i depresiju disanja. Depresivni efekti propoksifena na disanje se pojačavaju u kombinaciji sa alkoholom i drugim depresorima CNS-a.

U većim količinama može da dovede do stvaranja zavisnosti, tolerancije i apstinencijalnih sindroma (Bogdanović, 1981).

FENILPIPERIDINI

2.4.16. MEPERIDIN (PETIDIN)



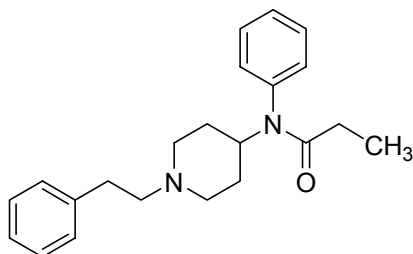
Slika 2.36. Struktura meperidina

Sintetički opijatni analgetik, meperidin (slika 2.36.) je sličan morfinu po farmakološkom dejstvu, ali ispoljava slabije i kraće analgetičko dejstvo. Ima širok spektar primene kao analgetičko sredstvo umesto morfina, čak i za analgeziju tokom porođaja.

Biotransformacijom meperidina u jetri nastaje aktivni metabolit norpetidin, koji ispoljava halucinogene i konvulzivne efekte. Ako se uzmu velike oralne doze, nastaje sindrom predoziranja koji se prilično razlikuje od morfinskog.

Meperidin izaziva slična euforična stanja i može da izazove zavisnost u istoj meri kao morfin (Bogdanović, 1981; Rang i sar., 2003).

2.4.17. FENTANIL



Slika 2.37. Struktura fentanila

Sintetički opijatni analgetik, fentanil (slika 2.37.) ima 80 puta jače analgetičko dejstvo od morfina. Primjenjuje se uglavnom intravenski kao anestetik ili analgetik.

Farmakološko dejstvo fentanila je slično heroinu, izuzev manje izražene euforije i jačeg analgetičkog efekta.

Sredinom 1970. god. se fentanil počeo koristiti u svrhu uživanja. Na ilegalnom tržištu se često prodaje kao heroin, a s obzirom da može biti i do 100 puta potentniji, brzo dovodi do stanja predoziranja sa fatalnim ishodom. Takođe, fentanil se meša sa heroinom da bi mu se pojačalo dejstvo ili masa u cilju prodaje.

Početakom 1980. god. na ilegalnom tržištu u SAD se pojavio analog fentanila, poznat kao "china white", koji ima dva puta jače dejstvo. Čak i u veoma malim dozama izaziva izraženo *high* raspoloženje.

Vreme poluživota fentanila je kraće u odnosu na heroin, uglavnom se uzima oralno, intranasalno, pušenjem ili injekcionim putem (Petrović, 2003; Rang i sar., 2003).

2.5. BIOTRANSFORMACIJA OPIJATA

Proces biotransformacije obuhvata sve reakcije kojima podleže neka supstanca u biološkom organizmu. Reakcijama biotransformacije se lipofilna jedinjenja prevode u hidrosolubilne metabolite. Na taj način se smanjuje sposobnost metabolita da prođu kroz biološke membrane, ograničava im se distribucija u neka tkiva, smanjuje ponovna resorpcija u bubrežnim tubulama i crevima, a ubrzava se ekskrecija putem urina i žuči. U reakcijama biotransformacije učestvuju veliki broj enzima. Ove reakcije se obično dele na *reakcije prve faze*, koje obuhvataju oksidaciju, redukciju i hidrolizu jedinjenja i *reakcije druge faze* u koje spadaju reakcije konjugacije (Jokanović, 2001).

2.5.1. BIOTRANSFORMACIJA MORFINA

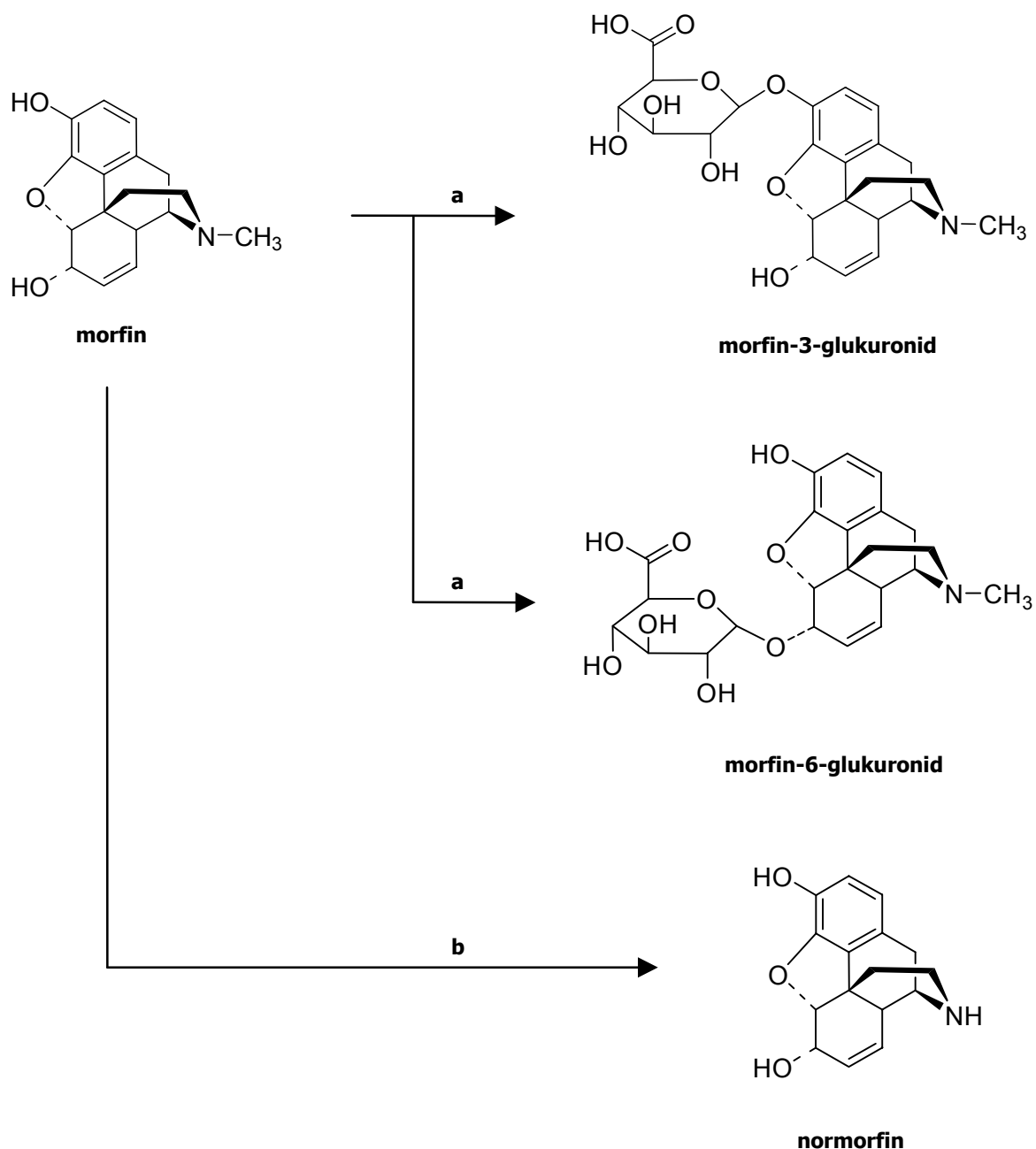
Biotransformacija morfina se odvija u dve faze. U prvoj fazi, koja traje samo par minuta, vezuje se za proteine plazme i veoma brzo distribuira kroz najprokrvljenija tkiva, tj. pluća, bubrege, jetru, slezinu i mišiće (Brunk i Delle, 1974; Stanski i Greenblatt, 1978). Vreme poluživota morfina u krvi iznosi 2 - 3 sata (Rang i sar., 2003).

U drugoj fazi, morfin podleže reakcijama N-dealkilovanja (normorfin), konjugacije (glukuronidi, sulfati) i oksidacije. Reakcije konjugacije morfina sa glukuronskom kiselinom su katalizovane enzimom UDPGT2B7 (uridindifosfoglukuronoziltransferaza-2B7), pri čemu nastaje glavni metabolit morfina, morfin-3-glukuronid, a nešto sporije nastaje i morfin-6-glukuronid (Green i sar., 1997). Reakcija N-demetilovanja morfina se odvija uz prisustvo enzima CYP3A4, koji pripada familiji citohrom P450 (CYP) enzima, pri čemu nastaje normorfin (Projean i sar., 2003) (slika 2.38.).

Morfin-3-glukuronid ne ispoljava analgetičko dejstvo, za razliku od morfin-6-glukuronida koji je aktivniji analgetik od morfina i ispoljava duže dejstvo (Paul i sar., 1989; Schänzle i sar., 1999; Rang i sar., 2003). Rezultati eksperimenata na životinjama ukazuju da morfin-3-glukuronid jednim delom antagonizuje izvesne efekte morfina i morfin-6-glukuronida, tako da se pretpostavlja da ima ulogu u razvoju tolerancije i zavisnosti prema morfinu (Osborne i Joel, 1990; Smith i sar., 1990; Salem i Hope, 1997).

Izvesna grupa naučnika sugerise da će analgetičko dejstvo morfina (koji se daje pacijentima za ublaženje bola) zavisiti od međusobnog odnosa njegovih metabolita: morfin-3-glukuronid / morfin-6-glukuronid i da je pojava efekta koji se naziva "paradoksalna bol" moguća, ukoliko međusobni odnos metabolita morfina nije odgovarajući. Međutim, za ovu pretpostavku su klinički dokazi još uvek nedovoljni (Bowsher, 1993; Wolff i sar., 1996).

Biotransformacija morfina se odvija najvećim delom u jetri, jednim delom u mozgu i bubrežima, traje nekoliko sati, pri čemu nastaju i zanemarljivo male količine drugih metabolita morfina.



Slika 2.38. Biotransformacija morfina
 a) konjugacija, enzim UDPGT2B7;
 b) N-demetilovanje, enzim CYP3A4

Manje od 10 % uzete doze morfina se izlučuje u nepromenjenom obliku. Najveća količina morfina, oko 70 %, se prevodi u glukuronide (57 % morfin-3-glukuronida i 10 % morfin-6-glukuronida) i izlučuje preko žuči i urinom (*Hasselstrom i Säwe, 1993*). Zbog enterohepatičkog puta eliminacije, metaboliti se najduže zadržavaju u žuči, gde se dejstvom bakterija mogu dekonjugovati i ponovo resorbovati preko sluznice creva. Tako, od poslednje uzete doze morfina, morfin-glukuronidi se mogu danima i nedeljama izlučivati u urinu (*Parker i Hirom, 1980*).

Ostali metaboliti morfina, kao što su morfin-3,6-diglukuronid i normorfin-3-glukuronid, nastaju u veoma malim količinama i ne ispoljavaju fiziološke efekte (*Yeh i Krebs, 1979*).

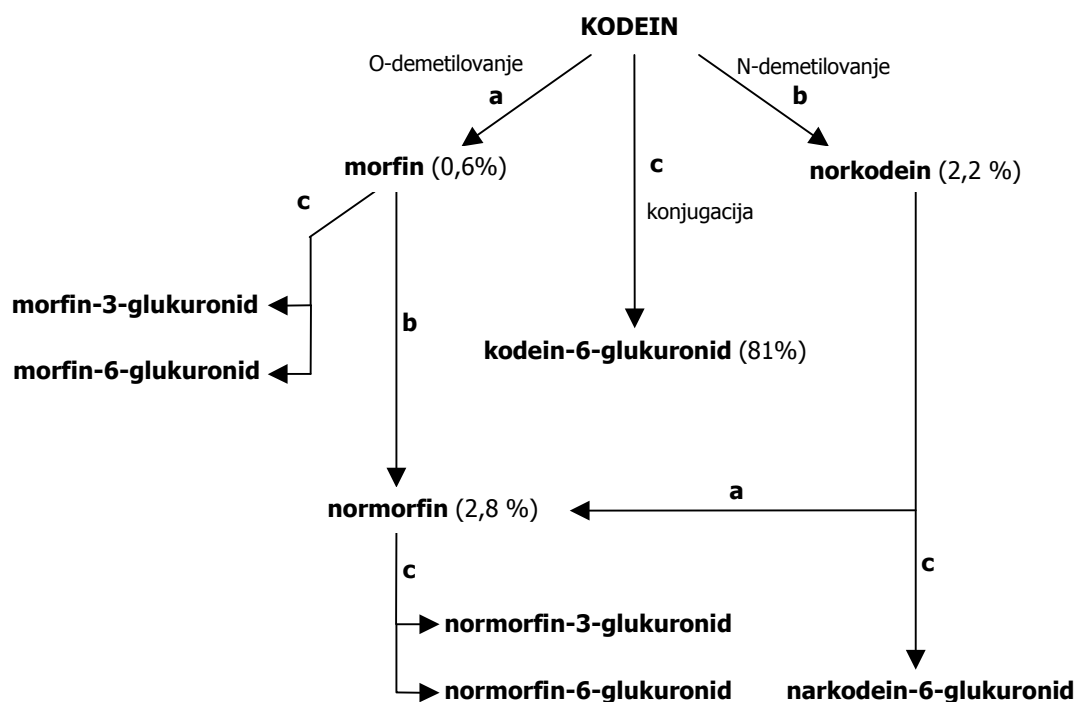
Morfin se ne prevodi u kodein, kako se ranije mislilo. Prisustvo kodeina u urinu nakon konzumiranja morfina ili heroina se može objasniti njegovim prisustvom kao nečistoće, a može se detektovati čak i u morfinu farmaceutske čistoće (*Cone i Welch, 1991*).

2.5.2. BIOTRANSFORMACIJA KODEINA

Osnovni procesi biotransformacije kodeina su konjugacija se glukuronskom kiselinom uz prisustvo enzima UDPGT2B7 i O- i N-demetilovanje, katalizovano citohrom P450 enzimima: CYP2D6 i CYP3A4 (*Green i sar., 1997; Xu i sar., 1997*). Najveći deo kodeina (81 %) se prevodi u kodein-6-glukuronid za koji se pretpostavlja da ispoljava psihoaktivno dejstvo. Jedan deo kodeina se prevodi u norkodein (2,2 %), koji se zatim reakcijom konjugacije (uz prisustvo enzima UDPGT2B7) prevodi u norkodein-6-glukuronid, odnosno O-demetilovanjem (uz prisustvo enzima CYP2D6) u normorfin. Znatno manji deo kodeina se prevodi u morfin (0,6 %), a morfin u morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid (uz prisustvo enzima UDPGT2B7) i normorfin (uz prisustvo enzima CYP3A4). Normorfin zatim podleže konjugaciji sa glukuronskom kiselinom (uz prisustvo enzima UDPGT2B7) pri čemu nastaju normorfin-3-glukuronid i normorfin-6-glukuronid (slika 2.39.) (*Fraser i Isbell, 1960*).

Svi metaboliti kodeina se izlučuju u urinu, a u toku 48 časova se izluči oko 90 % poslednje uzete doze kodeina, uglavnom kao kodein-6-glukuronid (*Chen i Somogyi, 1991; Hedenmalm i Sundgren, 1997*).

Utvrđeno je da aktivnost enzima CYP2D6 (uz čije prisustvo se kodein prevodi u morfin) varira u zavisnosti od osobe, što utiče na različito ispoljavanje analgetičkog efekta kodeina. Eksperimentalnim podacima je utvrđeno da je kod 6 - 10 % populacije sa Kavkaza, 2 % azijata i 1 % arapa aktivnost enzima CYP2D6 veoma mala, tako da kodein ispoljava veoma malo, ili pak ne ispoljava analgetičko dejstvo. Međutim, pretpostavlja se da se kod ovih pacijenata ipak izvesan stepen analgezije ispoljava aktivnošću glavnog metabolita kodeina, kodein-6-glukuronida (*Srinivasan i sar., 1997; Vree i sar., 2000*).



Slika 2.39. Biotransformacija kodeina
 a) O-demetilovanje, enzim CYP2D6;
 b) N-demetilovanje, enzim CYP3A4;
 c) konjugacija, enzim UDPGT2B7

2.5.3. BIOTRANSFORMACIJA HEROINA

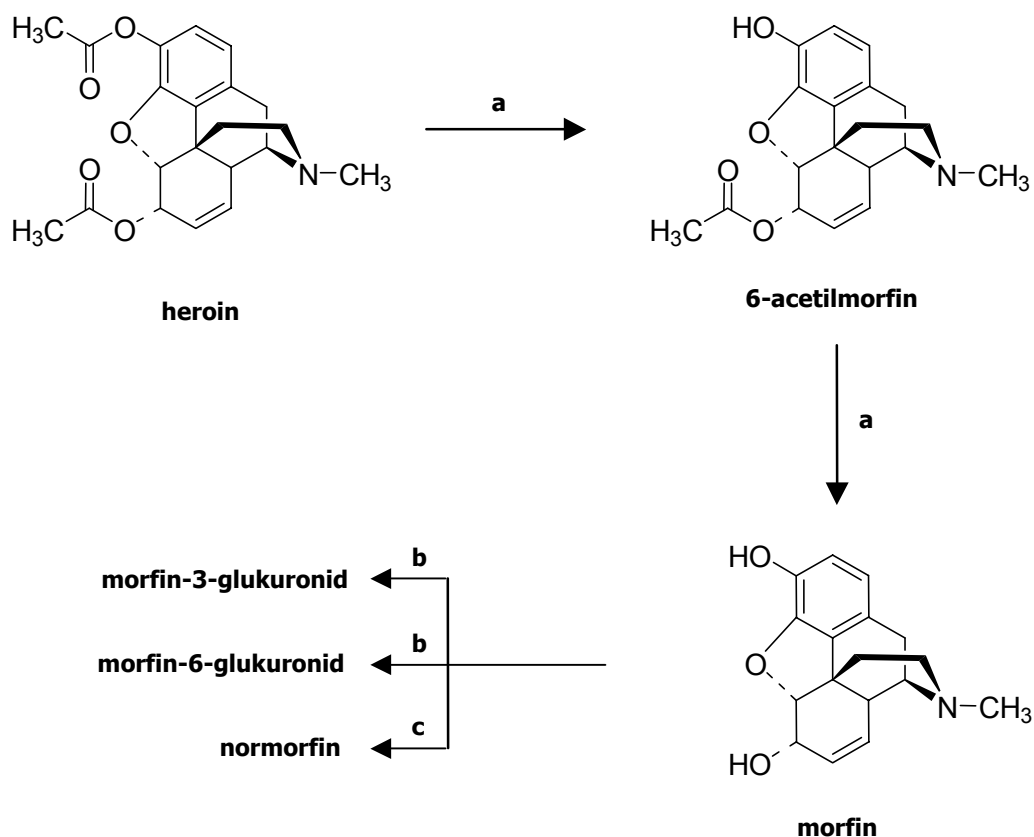
Biotransformacija heroina započinje brzim deacetilovanjem uz prisustvo enzima AChE (acetilholinesteraza), pri čemu u toku 10 - 15 minuta nastaje 6-acetilmorfin, a u toku nekoliko sati, morfin (*Salmon i sar., 1999*) (slika 2.40.). Morfin, kao što je prethodno opisano (slika 2.38.), podleže biotransformaciji u morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid i normorfin.

Hidroliza heroina je katalizovana enzimima koji se nalaze u većini tkiva, uključujući mozak, veoma je brza, tako da je vreme poluživota heroina u krvi svega 2,5 do 3 minuta (*Inturrisi i sar., 1984; Rentsch i sar., 2001; Hutchinson i sar., 2002*).

Heroin (3,6-diacetilmorfin) i 6-acetilmorfin su liposolubilni molekuli, tako da znatno lakše i brže prolaze hematoencefalnu barijeru. Utvrđeno je da heroin i do 100 puta brže prolazi hematoencefalnu barijeru u odnosu na morfin (*Bodor i Buchwald, 1999*). U mozgu se heroin i 6-acetilmorfin prevode u morfin, koji ispoljava moćniji i brži efekat na moždane ćelije.

Oko 50 - 70 % injektovane doze heroina se izlučuje u urinu u obliku morfin-glukuronida. Procenjeno je da se u organizmu čoveka metaboliše oko 6 mg heroina za jedan sat (*Rang i sar., 2003*).

Metaboliti heroina se mogu detektovati u urinu 24 - 48 sati nakon uzimanja poslednje doze. Slično kokainu, 6-acetilmorfin se deponuje u kosi, gde mesecima može ostati nepromenjen (Karch, 2002).



Slika 2.40. Biotransformacija heroina
 a) acetilovanje, enzim AChE;
 b) konjugacija, enzim UDPGT2B7;
 c) N-demetilovanje, enzim CYP3A4

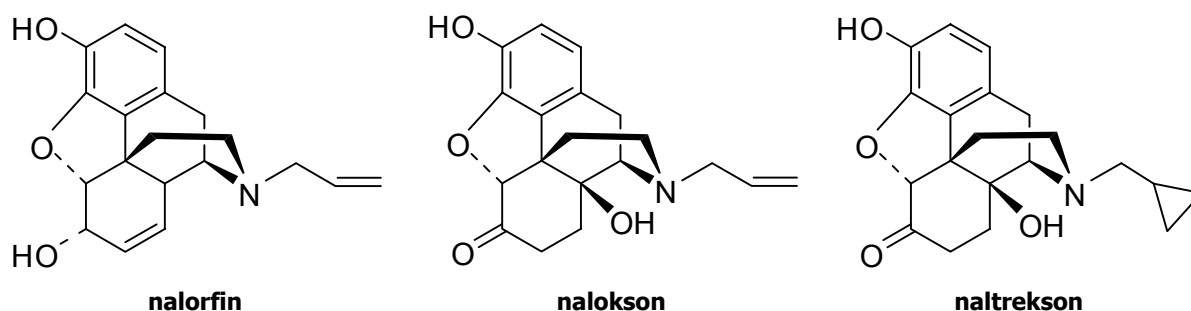
2.5.4. BIOTRANSFORMACIJA METADONA

Metadon se najvećim delom biotransformiše u jetri gde podleže reakciji N-demetilovanja uz prisustvo enzima CYP3A4, pri čemu nastaje neaktivan metabolit 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin (EDDP).

Utvrđeno je da se farmakokinetika metadona znatno razlikuje kod pacijenata koji uzimaju istu dozu i da farmakološki efekti mogu biti suviše mali, veoma jaki ili prolongirani. Aktivnost pomenutog enzima CYP3A4 varira u zavisnosti od osobe, što direktno utiče na različite farmakološke efekte metadona, tako da je često neophodno primeniti i druge lekove, kao što su različite psihotropne supstance, antibiotici, antikonvulzanti u terapiji odvikavanja od opijata (Ferrari i sar., 2004).

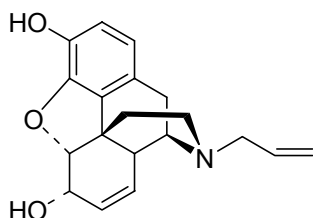
2.6. OPIJATNI ANTAGONISTI

Opijatni antagonisti predstavljaju grupu sintetičkih jedinjenja (slika 2.41.), koja se sa visokim afinitetom vezuju za opijatne receptore i na taj način blokiraju dejstvo opijata. Ovi efekti mogu biti spasonosni u lečenju farmakološke predoziranosti opijatima, a mogu poslužiti i u dijagnostifikovanju diskretno izražene zavisnosti od opijata, izazivajući simptome apstinencijalne krize (*Petrović, 2003*).



Slika 2.41. Opijatni antagonisti

2.6.1. NALORFIN



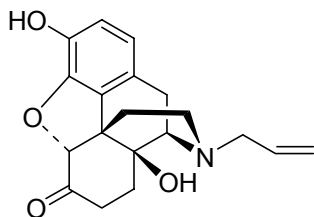
Slika 2.42. Struktura nalorfina

Polusintetski derivat, nalorfin (slika 2.42.) je slične hemijske strukture morfinu. Predstavlja prvi otkriveni specifični opijatni antagonist (1950. god.), čije je otkriće doprinelo uspešnom istraživanju endogenih medijatora.

Nalorfin ispoljava složenije dejstvo u poređenju sa jednostavnim kompetitivnim antagonistima. U malim dozama je kompetitivni antagonist i blokira delovanje morfina, a u većim dozama ispoljava analgetičko dejstvo, slično morfinu. Nalorfin može sam da izazove fizičku zavisnost, ali i apstinencijalni sindrom kod zavisnika od morfina ili heroina. Nalorfin antagonizuje i depresivna dejstva kodeina, dihidromorfinona, meperidina, metadona i njihovih derivata.

Danas se malo koristi u kliničkoj praksi, a najviše se primenjuje u lečenju akutnog trovanja morfinom i srodnim jedinjenjima i u suzbijanju depresivnog dejstva morfina na respiratorni centar novorođenčadi čije su majke konzumirale morfin (*Bogdanović, 1981; Rang i sar., 2003*).

2.6.2. NALOKSON



Slika 2.43. Struktura naloksona

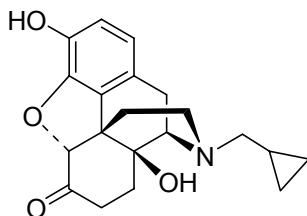
Polusintetski derivat tebaina, nalokson (slika 2.43.) predstavlja prvi čist opijatni antagonist sa afinitetom za sve tri vrste opijatnih receptora. Blokira delovanje endogenih opijatnih peptida kao i lekova sličnih morfinu.

Uglavnom se daje intravenski, pri čemu skoro trenutno prekida sve depresivne efekte opijata. Brzo se metaboliše u jetri, a njegovo dejstvo traje samo 2 - 4 sata, što je znatno kraće u odnosu na većinu lekova sličnih morfinu. Shodno tome, često je neophodno da se doze ponavljaju, kako bi se postigao pun terapijski efekat.

Kod zdravih osoba koje nisu izložene dejstvu opijata, nalokson je u terapijskim dozama inertna supstanca. Međutim, ako se primeni kod osoba koje su pod dejstvom morfina ili nekog drugog opijata, nalokson otklanja sve efekte opijata u toku 1 - 2 minuta (normalizovanje disanja, širine zenica i crevne peristaltike). Kod osoba zavisnih od opijata, nalokson trenutno prouzrokuje apstinencijalni sindrom (*Varagić, 2002; Rang i sar., 2003*).

Najvažnija oblast kliničke primene naloksona je terapija depresije disanja izazvana predoziranjem opijatima, a povremeno i da bi se suzbio efekat opijatnih analgetika na respiraciju novorođenčadi.

2.6.3. NALTREKSON



Slika 2.44. Struktura naltreksona

Polusintetski derivat morfina, naltrekson (slika 2.44.) ispoljava iste farmakološke efekte kao nalokson, ali je njegova prednost u znatno dužem delovanju.

Naltrekson se dobro resorbuje posle oralne primene. Njegovo vreme poluživota iznosi oko 4 sata, a vreme poluživota njegovog aktivnog metabolita 6-β-naltreksola oko 13 sati, tako da jedna oralna doza od 100 mg može da blokira dejstvo ubrizganog heroina čak i do 48 sati.

Zbog svog dugotrajnog delovanja, naltrekson je podesan kao lek za "održavanje" u programu odvikavanja od zavisnosti. Jedna doza naltreksona svaki drugi dan može biti dovoljna da blokira sve efekte heroina. U nekim zemljama je odobrena primena naltreksona i u svrhu lečenja od alkoholizma (*Schmitz i sar., 2001; Varagić, 2002; Rang i sar., 2003*).

2.7. ENDOGENI OPIJATI

2.7.1. OPIJATNI PEPTIDI

Hughes i Kosterlitz su 1975. god. izolovali iz moždanog tkiva dva pentapeptida koji su se sa velikim afinitetom vezivali za opijatne receptore u mozgu i čije je farmakološko dejstvo slično dejstvu samog morfina. Ovo izuzetno otkriće je pokazalo da do tada nepoznato delovanje morfina potiče od njegove sposobnosti da imitira aktivnost familije endogenih medijatora, tj. opijatnih peptida. Do danas, lekovi srodni morfinu su jedina klasa za koju se zna da deluje tako što imitira endogene peptide (*Cooper i sar., 1996; Nestler i sar., 2001*).

Biološki aktivni peptidi se nalaze u centralnom nervnom sistemu i ispoljavaju farmakološke efekte koji liče na efekte opijata, tj. morfina (po kom su dobili ime endogeni morfini ili endorfini).

Najpoznatije su tri klase ovih peptida: enkefalini, endorfini i dinorfini.

Enkefalini (metionin-enkefalin i leucin-enkefalin) su prvi izolovani opijatni peptidi, nakon kojih su izolovani **endorfini** (β -endorfin) sa većim brojem aminokiselina u molekulu, za koje je dokazano eksperimentima *in vivo* i *in vitro*, da su potentniji u odnosu na enkefaline (*Cox i sar., 1976; Goldstein, 1976*) i potom su izolovani **dinorfini** (*Goldstein i sar., 1981*).

Svaka od ovih klasa endogenih opijata potiče od posebnog polipeptidnog prekursora, a to su: prodinorfin, proenkefalin i proopiomelanokortin. Iz ovog poslednjeg, pored β -endorfina, nastaju još i melano-stimulantni hormon (MSH) i adrenokortikotropni hormon (ACTH) (*Varagić, 2002*).

Brojni opijatni peptidi su izolovani iz različitih izvora. Izuzetno potentni heptapeptidi - dermorfini su izolovani iz kože izvesne južnoameričke žabe (*Broccardo i sar., 1981*).

Utvrđeno je da produkti hidrolize velikog broja proteina sadrže opijatne peptide. Tako je, digestijom kazeina (osnovnog proteina mleka) iz govečeta dobijen veliki broj peptida koji ispoljavaju opijatnu aktivnost, kao što su morfeptin, β -kazomorfini (koji su prisutni i kod čoveka) i laktorfini (*Max, 1992*).

Nedavno su otkrivene i dve nove klase opijatnih peptida: nociceptin ili orfanin i endomorfini (endomorfin-1 i endomorfin-2) (*Henderson i McKnight, 1997; Bodnar i Klein, 2004*).

Ispitivanjem na eksperimentalnim životinjama, utvrđeno je da svi endogeni polipeptidi ispoljavaju analgetičko dejstvo kao i morfin (*Simon, 1991*). Opijatni antagonisti (npr. nalokson) podjednako poništavaju dejstva morfina i opijatnih peptida. Ponovljenim davanjem ovih endogenih opijata stvara se tolerancija kao i prema morfinu (*Hosztafi i Fürst, 1995*).

Prekursori opijatnih peptida su prisutni u CNS-u, ali i u nekim perifernim tkivima. *Proenkefalin* i *prodinorfin* se nalaze u velikom broju struktura CNS-a, ali je od posebnog značaja njihovo prisustvo u strukturama za modulaciju bola (laminae I i II kičmene moždine),

u strukturama koje učestvuju u modulaciji afektivnog ponašanja (amigdala, hipokampus, moždana kora) kao i u strukturama koje regulišu autonomni nervni sistem (produžena moždina). Osim u CNS-u, opijatni peptidi iz *proenkefalina* se nalaze i u perifernim tkivima, npr. u srži nadbubrežne žlezde i nervnim pleksusima želuca i creva (Varagić, 2002). Opijatne peptide stvaraju i ćelije imunog sistema. Takođe, ovi peptidi nastaju i u delovima mozga gde učestvuju u regulaciji brojnih fizioloških sistema, što se ogleda u kompleksnim farmakološkim karakteristikama egzogenih opijata (Sibinga i Goldstein, 1988; Simon, 1991; House i sar., 1997).

2.7.2. ENDOGENI MORFIN

Nedavna istraživanja su potvrdila da je morfin, osim u biljkama, prisutan i u tkivima životinjskog porekla. Opšteprihvaćeno mišljenje je bilo da morfin identifikovan u ljudskim i životinjskim tkivima potiče iz dijetetskih proizvoda, s obzirom da je njegovo prisustvo utvrđeno u senu, zelenoj salati, kravljem i ljudskom mleku (200 - 500 ng/l), kao i u komercijalnoj hrani za pacove i zečeve (Hazum i sar., 1981; Hofmann i sar., 1999).

Endogeni morfin je izolovan u veoma malim količinama i identifikovan biohemijskim tehnikama, uključujući metodu gasne hromatografije i masene spektrometrije (GC/MS) (Horak i sar., 1993) iz specifičnih organa i fluida kičmenjaka, kao što je koža žabe (Oka i sar., 1985), mozak i nadbubrežna žlezda govečeta (Goldstein i sar., 1985; Weitz i sar., 1986), mozak i nadbubrežna žlezda pacova (Donnerer i sar., 1987; Goumon i Stefano, 2000), srce (Zhu i sar., 2001) i urin čoveka (Matsubara i sar., 1992; Mikus i sar., 1994). Prisustvo morfina u moždanom tkivu sisara je utvrđeno još 1976. godine (Gintzler i sar., 1976), a zatim ponovo devedesetih godina prošlog veka (Bianchi i sar., 1993).

Opijatni alkaloidi, morfin i kodein su identifikovani u tkivima sisara koja imaju sposobnost da sintetišu ove alkaloidne *in vivo* (Goldstein i sar., 1985; Donnerer i sar., 1987) i *in vitro* (Kodaira i Spector, 1989).

Donnerer i saradnici (1986) su utvrdili prisustvo morfina i kodeina u različitim tkivima pacova, pri čemu su detektovali najveće koncentracije ovih jedinjenja u moždanom tkivu. Sličnost biosinteze morfina u organizmu sisara i opijumskom maku su potvrdili eksperimentom, tako što su salutaridin, tebain i kodein davali pacovima intravenski. Navedena jedinjenja (intermedijeri u biosintezi morfina) su uslovia značajno povećanje koncentracije kodeina i morfina u tkivima pacova.

U cilju dokaza endogenog porekla morfina u sisarima, izvedeni su eksperimenti na životinjskim i ljudskim ćelijskim kulturama, primenom markiranog potencijalnog prekursora (kao što je $^{18}\text{O}_2$ ili ^{13}C -tirozin) u biosintezi morfina, što je omogućilo markiranje intermedijera kao i samog morfina na specifičnim mestima. Utvrđeno je da su intermedijeri, tj. endogeni prekursori morfina: norlaudanozolin, (S)-retikulin i tebain. Na ovaj način je dokazano prisustvo morfina u ljudskim ćelijama u nanomolskoj količini (Poeaknapo i sar., 2004).

Prisustvo morfina je utvrđeno u različitim tkivima kičmenjaka, uključujući nervni sistem sisara. Ustanovljeno je da je endogeni alkaloid lokalizovan u neuronima, odakle se

može osloboditi pod uslovima pod kojima se oslobađaju i drugi neurotransmiteri (*Bianchi i sar., 1999*) i da ispoljava dejstvo kao neuromodulator (*Cardinale i sar., 1987; Kosterlitz, 1987; Weitz i sar., 1987; Kodaira i sar., 1989; Bianchi i sar., 1993; Guarna i sar., 1998*). Nedavnim istraživanjima je dokazano prisustvo endogenog morfina u imunom sistemu (*Liu i sar., 1996; Stefano i sar., 1996*).

Utvrđeno je da bol, stres, izgladnjivanje i imunostimulanti povećavaju koncentraciju endogenog morfina i kodeina u mozgu (*Lee i Spector, 1991; Spector i sar., 1998*).

Dijetetsko poreklo morfina ili eventualna kontaminacija se mogu isključiti, a prihvatiti da morfin nastaje kako u biljnom svetu, tako i u ljudskim i životinjskim ćelijama. Endogeni morfin nastaje u višestepenom biosintetskom procesu, a izgradnju ugljenikovog skeleta započinje iz aminokiseline L-tirozina i metil grupe L-metionina (*Poeaknapo i sar., 2004*).

Biosinteza morfina u opijumskom maku kao i u humanim ćelijama započinje iz dva molekula L-tirozina (slika 2.45.). Hidroksilovanjem L-tirozina uz prisustvo enzima TH (tirozin hidroksilaza) nastaje L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin), koji dalje podleže dekarboksilaciji uz prisustvo enzima DDC (DOPA-dekarboksilaza) do dopamina i deaminaciji katalizovanoj enzimom MAO (monoamin-oksidaza) do 3,4-dihidroksifenilpiruvata, koji se dekarboksilovanjem uz prisustvo enzima DDC prevodi u DOPAL (3,4-dihidroksifenilacetaldehid).

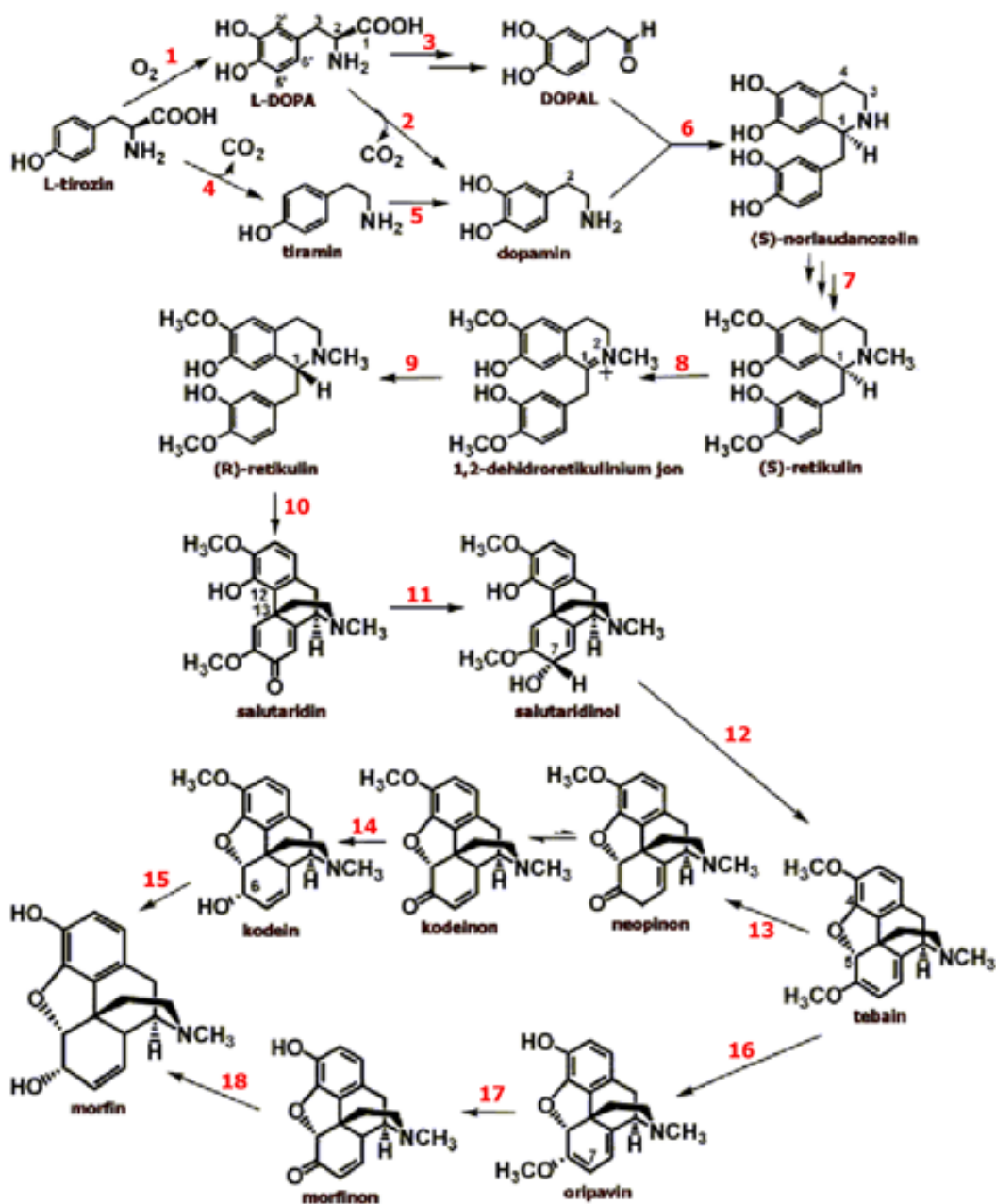
Decarboksilacijom L-tirozina uz prisustvo enzima TDC (tirozin-dekarboksilaza) nastaje tiramin koji se hidroksilovanjem, katalizovanim enzimom CYP2D6 (koji pripada porodici citohrom P450 (CYP) enzima), prevodi u dopamin. DOPAL i dopamin podležu spontanoj Pictet - Spengler-ovoj kondenzaciji pri čemu nastaje (S)-norlaudanozolin, tj. (S)-tetrahidropapaverolin. Ovo je prvi tetraoksi izohinolinski alkaloid u biosintezi endogenog morfina, koji dalje u tri faze podleže reakcijama metilovanja, uključujući S-adenozil-L-metionin kao donora metil grupe, pri čemu nastaje (S)-retikulin.

Neophodna promena konfiguracije u cilju nastajanja biološki aktivnog (-) morfina (9R)-konfiguracije, ostvaruje se stereoselektivnim oksido-redukcionim procesima kojima podleže (S)-retikulin i intermedijer 1,2-dehidroretikulinijum jon. Naime, stereoselektivnom oksidacijom, uz prisustvo enzima 1,2-dehidroretikulinijum sintetaza, (S)-retikulin se prevodi u 1,2-dehidroretikulinijum jon, koji podleže procesu stereoselektivne redukcije, katalizovanom enzimom 1,2-dehidroretikulinijum reduktaza, pri čemu nastaje (R)-retikulin.

(R)-Retikulin predstavlja supstrat za intramolekularno C12-C13 fenol oksidativno kuplovanje, katalizovano citohrom P450-zavisnim enzimom CYP2D6, pri čemu nastaje salutaridin. Salutaridinol nastaje stereospecifičnom redukcijom karbonilne grupe salutaridina, katalizovanom enzimom SalR (salutaridin-reduktaza), a u narednoj fazi reakcijom nukleofilne supstitucije (S_N2) nastaje etarska veza u molekulu tebaina. Ciklizacija se odvija acetilovanjem salutaridinola uz prisustvo enzima SalAT (salutaridinol 7-O-acetiltransferaza) i eliminacijom hidroksilne, odnosno acetatne grupe.

Tebain dalje podleže enol-etar (C-6) i fenol-etar (C-3) reakcijama demetilovanja, pri čemu nastaje kodeinon odnosno oripavin. Stereospecifičnom redukcijom karbonilne grupe kodeinona, uz prisustvo enzima COR (kodeinon-reduktaza) nastaje kodein.

Kodein i oripavin predstavljaju supstrate za poslednju fazu demetilovanja u biosintetskom putu morfina. Kodein podleže demetilovanju katalizovanom enzimom CYP2D6, a oripavin se enol-etar (C-6) reakcijom demetilovanja prevodi u morfinon, koji podleže stereospecifičnoj redukciji karbonilne grupe uz prisustvo enzima morfin-6-dehidrogenaza, pri čemu nastaje (-) morfin (*Brochmann-Hanssen, 1985; Facchini and De Luca, 1995; Hiroi i sar., 1998; Kutcnan, 1998; De-Eknamkul, 1999; Hirata i sar., 2004; Hoover i sar., 2004; Weid i sar., 2004; Alcantara i sar., 2005; Boettcher i sar., 2005; Page, 2005; Geissler i sar., 2007*).



Slika 2.45. Biosinteza morfina (*Boettcher i sar., 2005*)

1. hidroksilovanje, enzim TH; 2. dekarboksilacija, enzim DDC; 3. a) deaminacija, enzim MAO; b) dekarboksilacija, enzim DDC; 4. dekarboksilacija, enzim TDC; 5. hidroksilovanje, enzim CYP2D6; 6. spontana Pictet - Spengler-ova kondenzacija; 7. a), b), c), metilovanje; 8. stereoselektivna oksidacija, enzim 1,2-dehidroretikulinijum sintetaza; 9. stereoselektivna redukcija, enzim 1,2-dehidroretikulinijum reduktaza; 10. intramolekularno C12-C13 fenol oksidativno kuplovanje, enzim CYP2D6; 11. stereospecifična redukcija karbonilne grupe, enzim SalR; 12. a) acilovanje, enzim SalAT; b) SN₂ nukleofilni napad sa acetatom kao odlazećom grupom; 13. enol-etar (C-6) demetilovanje; 14. stereospecifična redukcija karbonilne grupe, enzim COR; 15. demetilovanje, enzim CYP2D6; 16. fenol-etar (C-3) demetilovanje; 17. enol-etar (C-6) demetilovanje; 18. stereospecifična redukcija karbonilne grupe, enzim morfin-6-dehidrogenaza

2.8. OPIJATNI RECEPTORI

Morfin i njemu srodna jedinjenja se selektivno vezuju za specifična mesta u organizmu i na taj način prouzrokuju farmakološke efekte. Ta mesta, opijatni receptori, se prvenstveno nalaze u mozgu i najznačajnija su jer se u njima vrši obrada osećaja za bol, a postoje i u nivou kičmene moždine. Sva mesta koja ispoljavaju visok afinitet prema egzogenim opijatnim ligandima istovremeno sadrže i visoke koncentracije endogenih opijatnih peptida.

Na postojanje opijatnih receptora ukazuje strukturna sličnost velikog broja jedinjenja iz grupe opijata, njihova stereospecifičnost, kao i postojanje specifičnih opijatnih antagonista koji deluju kompetitivno sa opijatnim analgeticima, vezujući se za opijatne receptore.

2.8.1. KLASIFIKACIJA OPIJATNIH RECEPTORA

Kloniranjem receptora potvrđena su farmakološka istraživanja da se najvažniji farmakološki efekti opijata odigravaju preko tri osnovne klase opijatnih receptora μ (*mi*), κ (*kapa*) i δ (*delta*), od kojih svaka sadrži nekoliko podklasa ($\mu_1, \mu_2, \mu_3; \kappa_1, \kappa_2, \kappa_3; \delta_1, \delta_2$).

Receptori su dobili ime koristeći prvo slovo, prvo-otkrivenog liganda koji se vezuje za njih, primenom grčkog alfabeta. Tako su *mi* receptori nazvani po morfinu, a *kapa* receptori po ketociklazocinu (Aggrawal, 1995; Dhawan i sar., 1996).

Na kongresu međunarodnog udruženja farmakologa 1998. godine je usvojen klasifikacioni sistem koji se zasniva na redosledu otkrića receptora, koji se označavaju kao OP_1 (*delta*), OP_2 (*kapa*) i OP_3 (*mi*) (Varagić, 2002).

Funkcionalni efekti koji se odnose na glavne klase opijatnih receptora su prikazani u tabeli 2.1. (Rang i sar., 2003).

Tabela 2.1. Funkcionalni efekti koji se odnose na glavne klase opijatnih receptora

	μ	δ	κ
Supraspinalna analgezija	+++	-	-
Spinalna analgezija	++	++	+
Periferna analgezija	++	-	++
Respiratorna depresija	+++	++	-
Suženje zenica	++	-	+
Smanjen motilitet gastrointestinalnog trakta	++	++	+
Euforija	+++	-	-
Disforija	-	-	+++
Sedacija	++	-	++
Fizička zavisnost	+++	-	+

Pretpostavljeno je postojanje i četvrte klase opijatnih σ (*sigma*) receptora, čime bi se objasnili efekti disforije nekih opijata (anksioznost, halucinacije, košmarni snovi). σ -Receptori

ipak nisu pravi opijatni receptori, pošto sa njima stupaju u interakciju i mnoge druge psihotropne supstance, a njihova biološka uloga nije u potpunosti razjašnjena. Od opijatnih lekova, samo benzomorfini (pentazocin) se vezuju prevashodno za σ -receptore, što je u skladu sa njihovim psihotomimetskim svojstvima (*Walker i sar., 1990*).

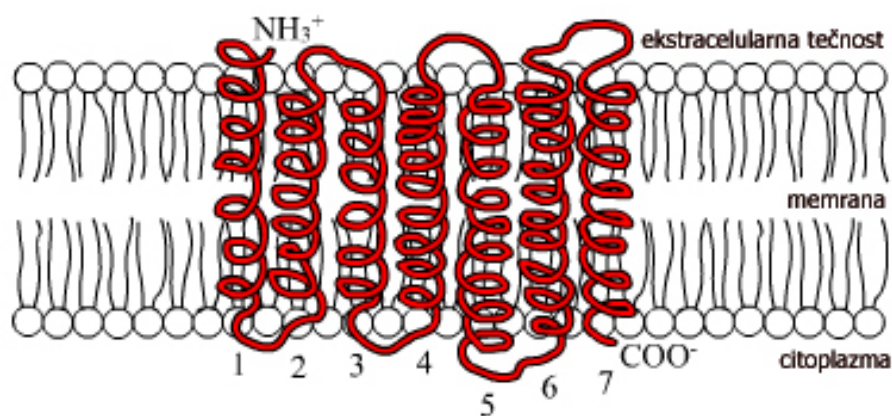
Nedavno otkriveni *orfan* opijatni receptor - ORL₁ (opiate receptor-like) je svrstan u opijatne receptore, na osnovu strukturne sličnosti sa njima. Endogeni ligand za ove receptore je nociceptin ili orfanin. ORL₁ - agonisti se ispituju u cilju primene za lečenje migrene i u slučajevima prestanka rada srca, dok antagonisti mogu imati svojstva antidepresanata. Utvrđeno je da je buprenorfin ORL₁ - parcijalni agonist, dok je njegov metabolit norbuprenorfin potpuni ORL₁ - agonist (*Henderson i McKnight, 1997*).

Pretpostavljeno je postojanje opijatnih receptora ϵ (*epsilon*), λ (*lamda*), ι (*iota*) i ζ (*zeta*), ali još uvek nisu u potpunosti okarakterisani i u fazi su ispitivanja (*Rang i sar., 2003*).

2.8.2. STRUKTURA OPIJATNIH RECEPTORA

Opijatni receptori pripadaju grupi lipoproteina iz membrane nervnih ćelija, nalaze se isključivo u nervnim strukturama rasprostranjenim u mozgu.

Na molekularnom nivou, opijatni receptori pripadaju velikoj porodici receptora vezanih za G-proteine (GPCRs - G protein-coupled receptors). Sastoje se od polipeptidnog lanca koji ima do 1100 aminokiselina, sadrži sedam transmembranskih α -spiral, sa ekstracelularnim N-terminalnim delom različite dužine i intracelularnim C-terminalnim delom (slika 2.46.).



Slika 2.46. Struktura opijatnih receptora

Struktura različitih klasa opijatnih receptora je oko 70 % identična, a razlike se javljaju na N- i C-terminalnom delu (*Schwartz, 1996*).

Vezivanjem liganda za receptor, vrši se prenos (transdukcija) ekstracelularnog u intracelularni signal aktivacijom G-proteina (guanine nucleotide binding proteins). G-proteini posreduju između receptora i efektorskih enzima ili jonskih kanala, zamenom vezanog

guanozin difosfata (GDP), guanozin trifosfatom (GTP), prouzrokujući na taj način aktivaciju ili inaktivaciju.

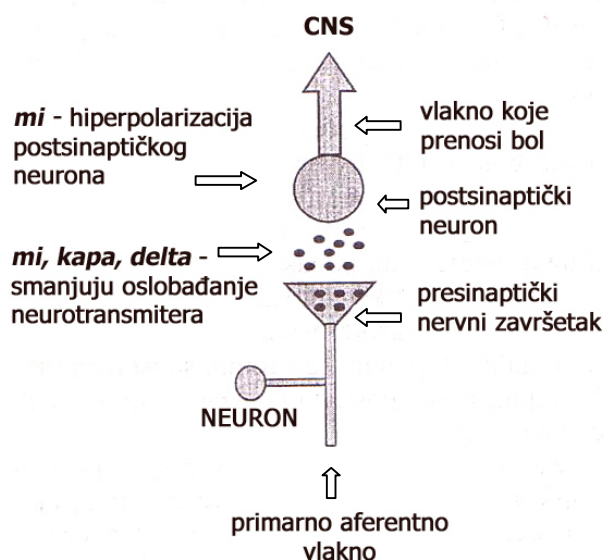
Opijati nakon jednokratne upotrebe inhibiraju adenilat-ciklazu preko G-proteina i smanjujući sadržaj intracelularnog medijatora cAMP (ciklični 3,5-adenozin monofosfat) u ćeliji, utiču na fosforilaciju, raspodelu intracelularnog kalcijuma i otvaranje i zatvaranje jonskih kanala (*Dolphin, 1996; Simonds, 1999*). Međutim, utvrđeno je da se hroničnom upotrebom opijata povećava sadržaj cAMP, što se objašnjava povećanjem koncentracije specifičnih G-proteina. Stepennavedenih promena zavisi od dela moždanog tkiva gde se vrši merenje (*Ecriba i sar., 1994; Hashimoto i Ozawa, 1994; Shichinohe i Ozawa, 1998; Büttner i sar., 2000*).

Opijati deluju na opijatne receptore kao agonisti, parcijalni agonisti ili antagonisti (tabela 2.2.) (*Rang i sar., 2003*).

Tabela 2.2. Dejstvo opijata na razne tipove opijatnih receptora

	μ	δ	κ
Endogeni peptidi			
β -Endorfin	+++	+++	+++
Enkefalini	++	+++	-
Dinorfini	++	+	+++
Opijati - agonisti			
Morfin	+++	+	+
Kodein	+++	+	+
Oksimorfon	+++	+	+
Dekstropropoksifen	+++	+	+
Metadon	+++	-	-
Meperidin	++	+	+
Etorfin	+++	+++	+++
Fentanil	+++	+	-
Opijati - parcijalni agonisti			
Pentazocin	*	+	++
Buprenorfin	(+++)	-	**
Opijati - antagonisti			
Nalokson	***	*	**
Nalorfin	***	*	***
Napomena: + agonistička aktivnost (+) parcijalna agonistička aktivnost * antagonistička aktivnost - mala aktivnost ili inaktivnost			

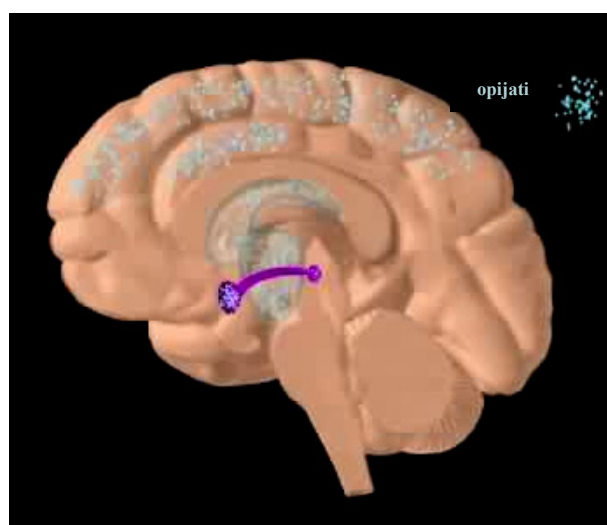
Opijatni agonisti inhibiraju oslobađanje ekscitatornih neurotransmitera (acetilholina, noradrenalina, dopamina, serotonina i supstance P) iz primarnih aferentnih vlakana, što znači da presinaptički deluju na neurotransmisiju, tj. direktno inhibiraju neuron za transmisiju bola u dorzalnom rogu kičmene moždine. Ovo je spinalno dejstvo opijata, za razliku od njihovog supraspinalnog dejstva koje se ispoljava u CNS-u i prouzrokuje depresiju disanja, nauzeju i povraćanje (slika 2.47.).



Slika 2.47. Spinalna mesta opijatnog dejstva

2.8.3. LOKALIZACIJA OPIJATNIH RECEPTORA

Metodom specifičnog vezivanja radioaktivno obeleženih opijatnih agonista, lokalizovane su sve klase opijatnih receptora (slika 2.48.).



Slika 2.48. Mesta nalaženja opijatnih receptora u mozgu

Najveća gustina tri osnovne klase opijatnih receptora je utvrđena u dorzalnim rogovima kičmene moždine. Receptori su takođe prisutni na neuronima kičmene moždine preko kojih se prenosi bol, kao i na primarnim aferentnim vlaknima preko kojih se osećaj bola prenosi do neurona (*Varagić, 2002*).

OP₁ (*delta*) receptori se nalaze u centralnom nervnom sistemu, posebno u *Bulbus olfactorius*, neokorteksu, kaudatusu u *Nucleus accumbens-u*, a nešto manji broj u talamusu, hipotalamusu i moždanom stablu. Ovi receptori imaju ulogu u analgeziji, motilitetu gastrointestinalnog trakta, raspoloženju, ponašanju i regulaciji kardiovaskularnog sistema. Endogeni ligandi za ove receptore su enkefalini.

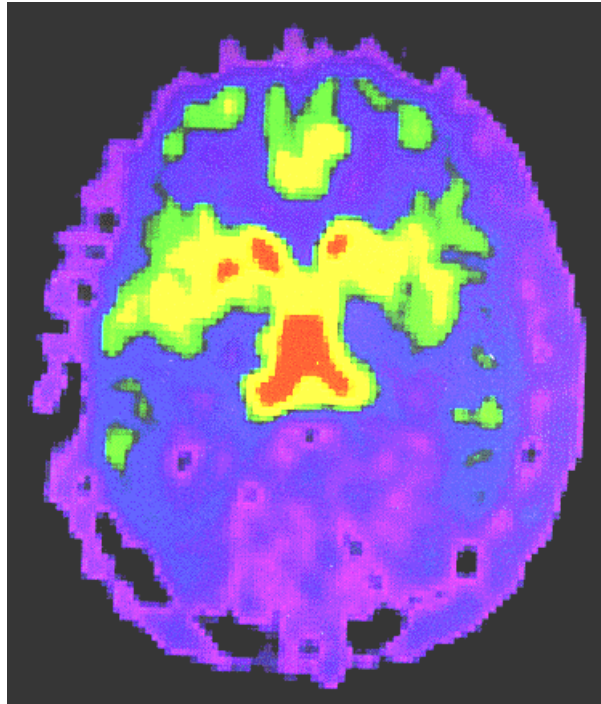
OP₂ (*kapa*) receptori se predominantno nalaze u moždanoj kori, *Nucleus accumbens-u* i interpedunkularnom nukleusu. Ovi receptori učestvuju u regulaciji nocicepcije, diureze, ishrane i neuroendokrine sekrecije. Endogeni ligandi za ove receptore su dinorfini.

OP₃ (*mi*) receptori su ravnomerno raspoređeni duž cele neuroosovine, sa najvećom gustinom u kaudatusu, neokorteksu, hipokampusu i amigdali. Ovi receptori imaju značajnu ulogu u bolu i analgeziji, respiratornim i kardiovaskularnim funkcijama, peristaltici, ishrani, raspoloženju, termoregulaciji, sekreciji hormona i regulaciji imunih funkcija. Endogeni ligandi za ove receptore su endomorfina-1 i endomorfina-2 (*Gabilondo i sar., 1994; Wehner i sar., 2000; Schmidt i sar., 2001; García-Sevilla i sar., 2004*). Utvrđeno je da morfin ispoljava svoje osnovno farmakološko dejstvo aktivacijom, odnosno vezivanjem za *mi* receptore (*Nestler, 1996; Tejwani i sar., 1998; Viganó i sar., 2003*).

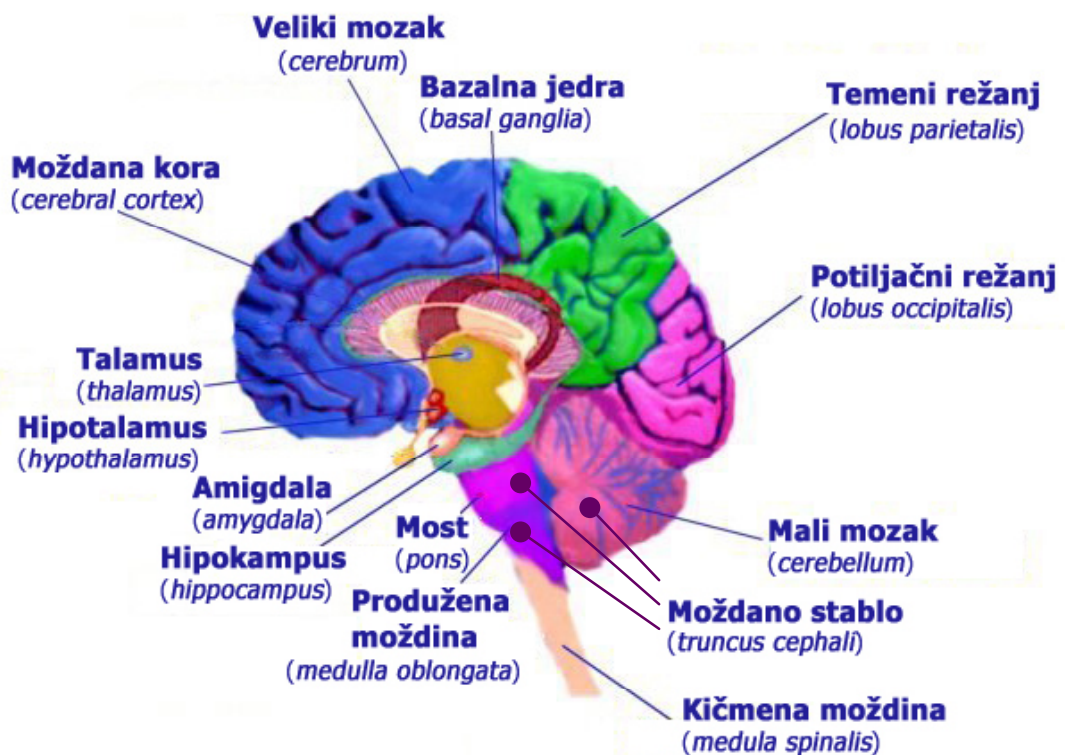
Metodom pozitron emisije tomografije (positron emission tomography - PET) je izvršeno skeniranje μ -opijatnih receptora u ljudskom mozgu (slika 2.49.), pri čemu su najveće koncentracije određene u talamusu (crvena boja) koji je odgovoran za bol, nešto manje u moždanoj kori (zelena boja) i bazalnim jedrima (žuta boja), odgovornim za emocije i kretanje, a najmanje koncentracije su određene u vizuelnoj kori (ljubičasta boja) (*Ariniello, 1994*).

Takođe, najveće koncentracije μ -opijatnih receptora su određene u limbičkom sistemu, hipotalamusu, srednjem mozgu i kičmenoj moždini (*Simon i Miller, 1978; Snyder, 1978; Siddiqui i sar., 1995*).

Imunohistohemijskim ispitivanjem humanog mozga, u smrtnim slučajevima usled prekomerno uzete doze morfina, utvrđeno je da se morfin lokalizuje u citoplazmi neurona moždane kore, bazalnih jedara, moždanog stabla, malog mozga i dela limbičkog sistema - hipokampusa i amigdale (slika 2.50.) (*Kuhar i sar., 1973; Bero i sar., 1988; Bidlac i sar., 1988; Roy i sar., 1988; Mansour i Watson, 1993; Schmidt i sar., 1994; Liu i sar., 1996; Atweh i Kuhar, 1997a; 1997b; 1997c*).



Slika 2.49. PET sken μ opijatnih receptora (Ariniello, 1994)



Slika 2.50. Struktura moždanog tkiva

Poređenjem koncentracije morfina u moždanom stablu i malom mozgu dobijaju se informacije o periodu proteklom od uzimanja morfina do smrti. Naime, ako je period kratak, odnos koncentracije morfina u moždanom stablu i malom mozgu je manji od 1. Ukoliko je odnos veći od 1, smatra se da je proteklo nekoliko sati od uzimanja morfina do smrti (Vycudilik, 1988).

2.8.4. PROMENA GUSTINE μ -OPIJATNIH RECEPTORA

Molekularni mehanizam razvoja tolerancije i zavisnosti usled hronične upotrebe opijata još uvek nije u potpunosti razjašnjen.

Brojnim *in vivo* i *in vitro* eksperimentima se pokušalo utvrditi da li je promena gustine μ -opijatnih receptora odgovorna za fenomen tolerancije, zavisnosti i širok raspon koncentracija morfina određenih u slučajevima fatalne intoksikacije (Loh i sar., 1988; Johnson i Fleming, 1989; Staub i sar., 1990; Kaa i Teige, 1993; Skopp i sar., 1996).

U izvesnim slučajevima, npr. dugotrajnim davanjem morfina zamorcima i pacovima, uočeno je smanjenje broja μ -opijatnih receptora (Rogers i El-Fakahany, 1986; Werling i McMahon, 1989; Tao i sar., 1990). Pretpostavlja se da gustina μ -receptora značajno opada i starenjem, što je povezano sa smanjenom osetljivošću na opijatne agoniste (Jha i sar., 2004).

Nasuprot tome, raniji eksperimenti sa miševima (Pert i sar., 1973; Rothman i sar., 1986) i kvantitativna autoradiografska analiza mozga pacova (Brady i sar., 1989) pokazali su povećanje gustine μ -opijatnih receptora, nakon dugotrajnog tretmana morfinom.

Poređenjem efekata morfina i heroina na mozak pacova, povećanje broja μ -opijatnih receptora je potvrđeno kod grupe životinja zavisnih od heroina, ali ne i kod grupe životinja zavisnih od morfina (Bolger i sar., 1988).

Imunohistohemijska ispitivanja humanog mozga (Gabilondo i sar., 1994; García-Sevilla i sar., 1997; Büttner i sar., 2000; Schmidt i sar., 2001) su u saglasnosti sa ranijim eksperimentima vezivanja liganada (Klee i Streaty, 1974; Brunello i sar., 1984), autoradiografskim analizama (Geary i Wooten, 1985) i *in vitro* eksperimentima na ćelijskim kulturama, u kojima nije dokazana promena gustine μ -opijatnih receptora, nakon dugotrajnog tretmana morfinom.

Moglo bi se reći da se dužom upotrebom egzogenih opijata receptori "troše", tj. menja im se konformacija i na taj način smanjuje osetljivost, što uslovljava veće doze opijata da bi se postigao isti efekat (Rogers i sar., 1981).

Za razliku od opijatnih agonista, ispitivanjem uticaja opijatnih antagonista na regulaciju μ -opijatnih receptora dobijeni su identični rezultati. Dugotrajna upotreba opijatnih antagonista naloksona i naltreksona prouzrokuje "superosetljivost" receptora prema opijatnim agonistima (Bardo i sar., 1984; Tempel i sar., 1984; 1985; Yoburn i sar., 1988; Morris i sar., 1992; De Vries i sar., 1993) kao i povećanje njihove gustine (Bardo i sar., 1983; Yoburn i sar., 1985; Brodsky i sar., 1995).

2.9. RAZLIKE U OSETLJIVOSTI NA OPIJATE KOD SUPROTNIH POLOVA

Malobrojna su istraživanja o načinu na koji pripadnici različitih polova reaguju na lekove, ali skorašnjim eksperimentima je dokazano da nikotin, alkohol i narkotici prouzrokuju različite posledice na muški i ženski pol.

Najnovijim istraživanjima je utvrđeno da opijati (heroin i morfin), ispoljavaju različite efekte na suprotne polove kod pacova, miševa, majmuna, kao i kod ljudi (*D'Souza i sar., 2002*). Naime, utvrđene su suštinske razlike u osetljivosti moždanog tkiva kod suprotnih polova na morfin (*Cicero i sar., 2002b*).

Razlike nisu uočene samo u slučaju analgetičkog dejstva morfina, nego i u njegovom stimulativnom dejstvu i razvoju fizičke zavisnosti (*Craft i sar., 1996; 1998; 1999*).

Eksperimentima sa pacovima je utvrđeno da morfin prouzrokuje znatno veći nivo analgezije kod mužjaka, u odnosu na ženke. Takođe, ženke više uživaju u pozitivnim efektima morfina, čije dejstvo znatno duže i doživljavaju kao pozitivno, u odnosu na mužjake. Eksperimentalnim podacima je dokazano da ženke mogu podneti znatno veće doze morfina, u poređenju sa mužjacima, pri čemu su izmerene koncentracije morfina u krvi i mozgu kod oba pola jednake (*Cicero i sar., 1996; 1997; Nock i sar., 1997*).

Craft i saradnici (1996; 1998) su utvrdili da morfin pri nižim dozama ispoljava isključivo stimulatивно dejstvo na ženke, za razliku od mužjaka.

Mušjaci su osetljiviji od ženki na dejstvo različitih opijatnih agonista (*Cicero i sar., 1996; Bartok i Craft, 1997; Cicero i sar., 1997*), izuzev na opijatne analgetike koji se vezuju za *kapa*-opijatne receptore, na čije dejstvo su ženke osetljivije (*Bartok i Craft, 1997*).

Eksperimentalni podaci ukazuju da je tokom spontanog odvikavanja od morfina, fizička zavisnost izraženija kod mužjaka u odnosu na ženke (*Craft i sar., 1999*). Međutim, razlike u polovima nisu uočene prilikom odvikavanja od morfina davanjem naloksona, što sugerise da postoji isti stepen fizičke zavisnosti kod pripadnika različitih polova tokom hronične upotrebe morfina. Razlike među polovima koje se javljaju pri spontanom odvikavanju nisu u potpunosti razjašnjene. Moguća objašnjenja su da postoje razlike u gustini ili afinitetu opijatnih receptora, ili u post-receptorskim procesima (pr. transdukcija signala) (*Loh i sar., 1988; Fleming i Taylor, 1995*), ili se pak odnose na uticaj polnih hormona (*Cicero i sar., 2002a*).

Humani mozak muškarca i žene se različito razvija, što uslovljava pojavu anatomskih razlika, koje se ogledaju i u ponašanju, a što prouzrokuje različit način upotrebe i zloupotrebe opijata. Utvrđeno je da su polni hormoni odgovorni za anatomske razlike moždanog tkiva pripadnika suprotnih polova (*Weiss, 2002*).

Pretpostavlja se da postoji različita organizaciona struktura mozga mužjaka i ženki pacova. Polni hormoni, kao što su estrogen i testosteron utiču na organizacionu strukturu

mozga, čime se mogu objasniti različite reakcije mužjaka i ženki na dejstvo opijata. Iako je mozak oba pola skoro identične veličine i strukture, polni hormoni imaju značajan uticaj na komunikaciju moždanih neurona.

Poznata su dva osnovna mehanizma po kojima polni hormoni mogu uticati na različito reagovanje suprotnih polova na dejstvo morfina: akutni ("aktivacioni") i dugotrajni ("organizacioni") (*Arnold i Breedlove, 1985; Breedlove, 1992; 1994; Cooke i sar., 1998*).

Polni hormoni, posredstvom organizacionih efekata utiču na polne razlike koje se odnose na morfologiju i neurobiologiju moždanog tkiva, u veoma kasnom prenatalnom i veoma ranom postnatalnom periodu kod pacova. Posledica njihovog dejstva definiše mušku i žensku polnu fiziologiju i ponašanje, čini mozak osetljivijim na akutne aktivacione efekte steroida tokom puberteta i odgovorna je za razvoj seksualnosti. U zreloj dobi polni hormoni su neophodni za razvoj tipičnog muškog i ženskog seksualnog, kao i drugog ponašanja, posredstvom akutnih, tj. aktivacionih efekata.

Pretpostavlja se da su organizacioni efekti polnih hormona odgovorni za različito ponašanje suprotnih polova pod dejstvom morfina, a koji se moraju ispoljiti tokom kritične postnatalne diferencijacije muškog i ženskog mozga (*Limonta i sar., 1991; Cicero i sar., 2000*).

Kod humanog genetski predodređenog muškog pola, testosteron se u mozgu fetusa, dejstvom enzima aromataze, prevodi u estrogen (*Weiss, 2002*).

Kod pacova je utvrđeno da je organizaciona struktura mozga u osnovi ženska, sve dok testosteron ne izvrši maskulinizaciju na kritičnim mestima. Tako, testosteron i najverovatnije njegova aromatizacija u estrogen, određuje znatan stepen razvoja polno različitog mozga pacova.

Polni dimorfizam je uočen u mnogim regijama moždanog tkiva i javlja se na molekularnom, ultrastrukturnom, ćelijskom nivou i na nivou nervnog sistema.

Kod pacova, proistekle polne razlike u anatomiji moždanog tkiva uključuju jedro (nukleus) koje je znatno veće u hipotalamusu mužjaka i tanji sloj izvesnih ćelija u hipokampusu, ključnoj strukturi za memoriju. Utvrđeno je i da postoje razlike kod suprotnih polova u stepenu asimetrije između leve i desne polovine moždane kore. Kod mužjaka pacova, moždana kora je tanja na desnoj polovini, a kod ženki na levoj (*Weiss, 2002*).

Polni hormoni su usko povezani sa osetljivošću neurona na morfin. Priroda različite osetljivosti neurona suprotnih polova na morfin je još uvek nepoznata. Jedna od hipoteza je da navedene razlike kod suprotnih polova potiču od različitog broja ili afiniteta opijatnih receptora (*Cicero i sar., 2002b*).

Shodno navedenom, Hammer (1984; 1985) je uočio različit broj i regionalnu distribuciju opijatnih receptora kod pripadnika različitih polova, u polno dimorfnim regijama moždanog tkiva. Treba naglasiti da su navedene razlike ograničene na nekoliko posebnih lokusa (specifično mesto gena na hromozomu) i da je profil opijatnih receptora u moždanom tkivu mužjaka i ženki pacova primetno sličan (*Hammer, 1984; 1985; 1990*).

Pretpostavlja se da polni hormoni mogu menjati populaciju opijatnih receptora na izvesnim regijama mozga (*Hammer i sar., 1994; Brown i sar., 1996; Quinones-Jenab i sar., 1997; Eckersell i sar., 1998*).

Opijatni i receptori gonadotropnih steroida su ko-lokalizovani na neuronima u centralnom i perifernom nervnom sistemu i mogu regulisati jedni druge. Oba α - i β -estrogen receptora su nađena na senzornim neuronima i u CNS-u i endogeni opijatni sistem se reguliše pomoću estrogena i testosterona (*Wiesenfeld-Hallin, 2005*).

U regijama hipotalamusa je dokazano prisustvo velikog broja opijatnih receptora i opijatnih peptida (*Mansour i sar., 1987; Tempel i Zukin, 1987*). Pretpostavlja se da endogeni opijatni peptidi učestvuju u pozitivnim i negativnim efektima povratne sprege polnih hormona, konkretno estradiola i testosterona, na sekreciju gonadotropina (*Bhanot i Wilkinson, 1983*).

Estrogen reguliše endogene opijatne peptide u hipotalamusu, povećavajući sadržaj met-enkefalina (*Dupont i sar., 1980*) i smanjujući sadržaj β -endorfina (*Wardlaw i sar., 1982*). Takođe, estrogen redukuje μ -opijatnu inhibiciju hiperpolarizacije neurona (*Lagrange i sar., 1994*), oslobađanje norepinerfina (*Vathy i Etgen, 1996*) i utiče na gustinu μ -opijatnih receptora u hipotalamusu (*Weiland i Wise, 1990; Dondi i sar., 1992; Mateo i sar., 1992; Joshi i sar., 1993; Piva i sar., 1995*). Na taj način hormoni jajne ćelije mogu uticati na sistem endogenih opijata, menjajući im funkciju i/ili broj membranskih receptora u hipotalamusu (*Brown i sar., 1996; Zubieta i sar., 1999*).

Eksperimentima je utvrđeno da je prisustvo ili odsustvo pojave različitih reakcija kod suprotnih polova na bol i osetljivosti na morfin, u potpunosti zavisno od genotipa (*Mogil i sar., 2000*). Posmatranje polno - genetskih interakcija na ovaj način, osvetljava važnost celovitog pristupa proučavanju varijabilnosti u bolu i analgeziji. Zato je važno razmotriti genetsku pozadinu prilikom proučavanja polnih i hormonskih faktora i uključiti oba pola u genetska istraživanja u cilju kompletnijeg razumevanja varijabilnosti i inhibicije bola (*Sternberg i Mogil, 2001*).

Ukoliko se sa sigurnošću dokaže da su navedene razlike u polovima u osetljivosti na opijate validne i kod ljudi, dosadašnja otkrića bi mogla imati izuzetan značaj sa aspekta različitog programa lečenja, tj. odvikavanja od opijata, pripadnika suprotnih polova (*Cicero i sar., 2002b*).

2.10. UTICAJ OPIJATA NA OKSIDATIVNI STRES

Morfin i drugi opijati ispoljavaju citotoksično dejstvo i predstavljaju smetnju imunom sistemu bilo indirektno preko centralnog nervnog sistema ili direktno interakcijom sa imunocitima (*Nelson i sar., 2004*). Upotreba morfina u većim količinama u odnosu na terapijske, prouzrokuje povećanje karcinogeneze (*Tejwani i sar., 1991*) i rasta tumora (*Lewis i sar., 1984*).

Ovi, kao i mnogi drugi štetni efekti opijata mogu biti posledica njihovog pro-oksidativnog dejstva, odnosno direktnog uticaja na pojavu oksidativnog stresa organizma.

Pojava oksidativnog stresa se manifestuje kada postoji neuravnoteženost između formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS - Reactive Oxygen Species) i njihovog uklanjanja iz organizma, posredstvom endogenih antioksidanasa (*Payabvash i sar., 2006*).

Reaktivne kiseonične vrste se kontinualno produkuju tokom normalnih metaboličkih procesa u aerobnim organizmima. Utvrđeno je da se 0,4 - 4 % ukupnog kiseonika koji koristi respiratorni sistem prevodi u superoksid slobodne radikale (*Turrens i Boveris, 2002*).

Mozak, u odnosu na druge organe, produkuje znatno veće količine ROS zbog visoke koncentracije lipida, velike potrebe za kiseonikom (20 % ukupnog kiseonika) i relativno slabog antioksidantnog odbrambenog sistema (*Halliwel, 1989; Reiter, 1995*).

Poznato je da endogeni opijat met-enkefalin i njegovi analozi posreduju u uslobođanju ROS iz različitih ćelija (*Kowalski, 1998*). Ispitivanjem moždanog tkiva eksperimentalnih životinja je utvrđeno da met-enkefalin smanjuje otpornost na oksidativni stres i da se stepen lipidne peroksidacije povećava starenjem kod pripadnika suprotnih polova, pri čemu je povećanje značajnije kod mužjaka miševa u odnosu na ženke (*Navaro i sar., 2002; Balog i sar., 2004*). Potvrđeno je da estrogene, a ne i testosteron, štite ćelijske membrane tokom oksidativnog stresa (*Barp i sar., 2002*).

Eksperimentalni podaci dobijeni analizom humanog moždanog tkiva, nakon autopsije intravenskih korisnika heroina, ukazuju na promene u oksidativnom statusu različitih delova moždanog tkiva: moždanoj kori, moždanom stablu, hipokampusu i beloj materiji. Naime, uočeno je smanjenje kapaciteta "hvatanja" peroksi radikala, faktora koji ukazuje na vezu između količine ROS i antioksidantne efikasnosti (ukupni antioksidantni status). Intoksikacija heroinom menja antioksidantni status u humanom moždanom tkivu, povećanjem količine organskih peroksida. Najveći nivo oksidativnog stresa, prouzrokovan lipidnom peroksidacijom i oksidacijom proteina je uočen u moždanom stablu. Pretpostavlja se da su navedeni procesi odgovorni za nastupanje kome, depresije disanja i smrti kod heroin - zavisnih osoba (*Gutowicz i sar., 2006*).

Istraživanjima je utvrđeno da opijati indukuju formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta u izvesnim ćelijama (*Sharp i sar., 1985; Oliveira i sar., 2002*), povećavaju lipidnu peroksidaciju (*Zhou i sar., 2000*), prouzrokuju oksidativni stres u imunom sistemu (*Di*

Francesco i sar, 1998), bubrežima (*Patel i sar., 2003 a, b*), epitelnim ćelijama (*Macchia i sar., 1999*), centralnom nervnom sistemu (*Goudas i sar., 1999*) i jetri koja predstavlja osnovni organ odgovoran za metabolizam, detoksikaciju i odbranu organizma od slobodnih radikala (*Payabvash i sar., 2006*).

2.10.1. ULOGA JETRE U METABOLIZMU

Smeštena između digestivnog trakta i sistemskog krvotoka, jetra predstavlja "centralnu laboratoriju organizma". Jetru karakteriše veliki broj raznovrsnih funkcija, kao što su: sekrecija žuči, deponovanje krvi, sinteza i deponovanje glikogena, masnih kiselina, sinteza i razgradnja belančevina, deponovanje i metabolizam vitamina, odbrana organizma stvaranjem antitela, detoksikacija organizma biotransformacijom endogenih i egzogenih materija (ksenobiotici).

Osnovnu funkcionalnu jedinicu jetrenog tkiva čini *hepatocit*. Hepatociti sadrže brojne organele tako da obavljaju različite funkcije, kao što su: sinteza masti, ugljenih hidrata, proteina, privremeno deponovanje nekih hormona, ugljenih hidrata, masti i vitamina. Jedna od najznačajnijih funkcija hepatocita je neutralizacija i razgradnja ksenobiotika (*Stošić-Bogdanović, 1984; Gibson i Skett, 1986*).

Reakcije biohemijske transformacije ksenobiotika se odigravaju u prisustvu velikog broja enzima i mogu se podeliti na:

- reakcije prve faze biotransformacije, koje obuhvataju oksidaciju, redukciju i hidrolizu i
- reakcije druge faze biotransformacije u koje su uključene reakcije konjugacije.

Reakcijama prve faze biotransformacije, koje se najčešće odigravaju u mikrozomima ćelija, a ređe u citosolu i mitohondrijama, uvode se nove funkcionalne grupe (-OH, -SH, -NH₂, -COOH) u molekule ksenobiotika čime im se povećava hidrosolubilnost. Nastali primarni metaboliti mogu biti manje (detoksikacija) ili više toksični (bioaktivacija).

U reakcijama druge faze koje su biosintetske, primarni metaboliti se kovalentno vezuju za endogene molekule, kao što su: glukuronska, sirćetna, sumporna kiselina i aminokiseline, stvarajući konjugate koji su hidrosolubila jedinjenja, brzo se eliminišu iz organizma i najčešće ne izazivaju toksične efekte (*Timbrell, 1993; Jokanović, 2001*).

Brojni eksperimentalni podaci ukazuju da razlike u hormonalnom statusu među životinjama suprotnog pola značajno utiču na biotransformaciju i toksičnost ksenobiotika. Ove razlike su utvrđene i kod ljudi. Na biotransformaciju ksenobiotika utiču i razlike u starosnoj dobi, način ishrane kao i zdravstveno stanje organizma (*Jokanović, 2001*).

2.10.2. ENZIMI OKSIDATIVNOG STRESA

Kod čoveka, kao i kod drugih aerobnih organizama razvijen je niz mehanizama zaštite od potencijalno štetnog dejstva reaktivnih kiseoničnih vrsta (aktivirani i redukovani oblici

kiseonika) koje imaju sposobnost da reaguju sa osnovnim ćelijskim strukturama i biomolekulima (tabela 2.3.) (*Mimica-Dukić, 1997*).

Mehanizmi zaštite organizama se sastoje od **enzimskih** (superoksid-dizmutaza - SOD, katalaza - CAT, glutation-peroksidaza - GSH-Px, peroksidaza - Px, ksantin-oksidaža - XOD) i **ne-enzimskih antioksidanasa** (glutation - GSH, mokraćna kiselina, bilirubin, ubihinoni, peptidi, proteini), prisutnih u ćelijskom i vanćelijskom prostoru, sa zadatkom detoksikacije reaktivnih kiseoničnih vrsta (*Chen i sar., 1998; Powers i Hamilton, 1999*).

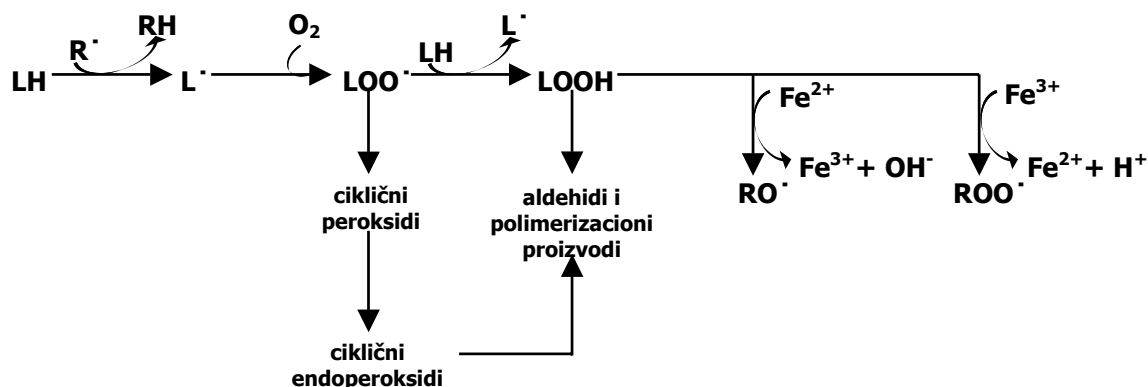
Enzimska detoksifikacija se uglavnom odnosi na superoksid anjon radikal, perokside i epokside, kao više ili manje stabilne redukovane kiseonične vrste, dok se ne-enzimska detoksifikacija odnosi na singlet kiseonik, hidroksi-, alkoksi-, peroksi- i hidroperoksi radikal (*Hippeli i Elstner, 1999*).

Tabela 2.3. Reaktivne kiseonične vrste (ROS)

SLOBODNI RADIKALI		NE-RADIKALSKE VRSTE	
superoksi radikal anjon	O_2^-	singlet kiseonik	1O_2
hidroperoksi radikal	HOO^\cdot	vodonik-peroksid	H_2O_2
hidroksi radikal	HO^\cdot	organski peroksidi	$ROOH$
alkil i alkoksi radikal	R^\cdot, RO^\cdot	peroksinitri anjon	$ONOO^-$
peroksi radikal	ROO^\cdot		
azot oksid radikal	NO^\cdot		

2.10.2.1. LIPIDNA PEROKSIDACIJA (LP)

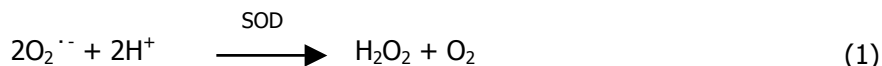
Lipidna peroksidacija (LP) je proces peroksidacije nezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav lipidnih membrana ćelije, koji prouzrokuje razaranje ćelijske membrane. Ovaj proces može biti indukovano različitim reaktivnim kiseoničnim vrstama, pri čemu nastaju nove radikalske vrste, kao što su L^\cdot , LOO^\cdot , RO^\cdot , ROO^\cdot i različiti degradacioni proizvodi (ciklični peroksidi i endoperoksidi, aldehidi i polimerizacioni proizvodi) (slika 2.51.) (*Haraguchi i sar., 1995*). Malondialdehid (MDA) može nastati kao jedan od degradacionih proizvoda, čija se količina koristi za kvantitativno određivanje lipidne peroksidacije (*Buege i Aust, 1978*).



Slika 2.51. Lipidna peroksidacija indukovana slobodnim radikalima

2.10.2.2. SUPEROKSID-DIZMUTAZA (SOD)

Superoksid-dizmutaza je enzim koji razgrađuje superoksid radikal u vodonik-peroksid (reakcija 1) i deluje preventivno na dalje generisanje slobodnih radikala, pri čemu ima glavnu kontrolu nad radikalskim reakcijama u ćeliji.



Superoksid-dizmutaze se dele u tri klase u zavisnosti od metala koji sadrže (Cu/ZnSOD, MnSOD i FeSOD): ekstracelularna (najmanje zastupljena), mitohondrijalna (MnSOD) i citosolna (Cu/ZnSOD). Najveća SOD aktivnost je utvrđena u jetri, nadbubrežnoj žlezdi, bubrezima i slezini (*Winterbourn, 1995*).

2.10.2.3. KATALAZA (CAT)

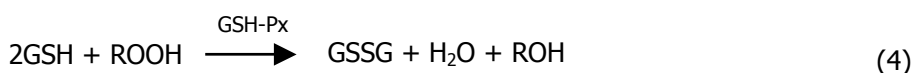
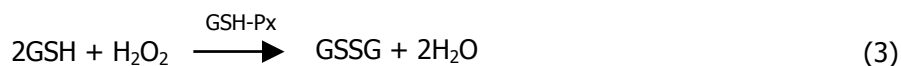
Katalaza je jedan od najrasprostranjenijih enzima u prirodi koji katalizuje razgradnju vodonik-peroksida do vode (reakcija 2).



Katalaza je prisutna u svim tkivima sisara, pri čemu su najveće koncentracije utvrđene u jetri, bubrezima i eritrocitima (*Jones, 1982*).

2.10.2.4. GLUTATION-PEROKSIDAZA (GSH-Px)

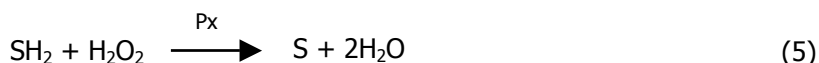
Selen-zavisna i selen-nezavisna glutation-peroksidaza štiti ćelije od slobodnih radikala redukcijom peroksida i organskih hidroperoksida do vode, odnosno alkohola, u prisustvu redukovanog glutationa (GSH) (reakcije 3 i 4).



Glutation-peroksidaza je smeštena intracelularno u mitohondrijama i citosolu. Ima veoma važnu ulogu u inhibiciji lipidne peroksidacije intracelularnih membrana inicirane vodonik-peroksidom (*Thomas i sar., 1990*).

2.10.2.5. PEROKSIDAZA (Px)

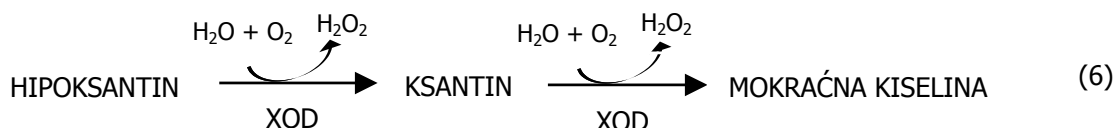
Peroksidaza katalizuje oksidaciju različitih supstrata (S) pomoću vodonik-peroksida (reakcija 5).



Peroksidaza je otkrivena u različitim biljnim tkivima, kravljem mleku, mijelocitima (leukocitima, trombocitima), hepatocitima i drugim ćelijama koje imaju ulogu u metabolizmu ksenobiotika (*Murry i sar., 1997*).

2.10.2.6. KSANTIN-OKSIDAZA (XOD)

Ksantin-oksidadaza oksiduje C-mono- i disupstituisana heterociklična jedinjenja, pri čemu ima veći afinitet prema okso- nego amino-supstituentima (N-supstituenti smanjuju aktivnost XOD). XOD učestvuje u konverziji purinskih baza u mokraćnu kiselinu, uvodeći hidroksilnu grupu u purinski prsten pri čemu nastaje vodonik-peroksid (reakcija 6).



XOD je intracelularni enzim, u tkivima sisara se nalazi pretežno u jetri, tankom crevu i bubrezima (*Hippeli i Elstner, 1999*).

2.10.2.7. GLUTATION (GSH)

Glutation (γ -glutamilcisteinilglicin) predstavlja najzastupljeniji intracelularni tripeptidni tiol (čini 90 % neproteinskog tiola jetre). U ćeliji se glutacion nalazi u redukovanom (GSH) i oksidovanom obliku (GSSG).

Glutation deluje kao redoks sistem, povećava rastvorljivost lekova u vodi, učestvuje u transportu aminokiselina kroz ćelijske membrane, služi kao kofaktor enzimskih reakcija i omogućava stvaranje disulfidnih mostova u molekulima proteina. GSH kao supstrat učestvuje u uklanjanju vodonik-peroksida iz ćelije uz pomoć enzima glutation-peroksidaze.

U jetri se GSH najvećim delom nalazi u citosolu hepatocita, zatim u mitohondrijama, jedru i endoplazmatičnom retikulumu (*Hothersall i sar., 1997*).

2.10.3. HEPATOTOKSIČNO DEJSTVO OPIJATA

Katalaza, superoksid-dizmutaza i glutation-peroksidaza zajedno čine endogeni enzimski antioksidantni odbrambeni mehanizam organizma. SOD vrši detoksifikaciju superoksid anjona u manje toksični vodonik-peroksid, koji se dalje razlaže dejstvom CAT i GSH-Px. Osim toga, GSH-Px učestvuje u smanjenju lipidne peroksidacije.

Eksperimentalnim podacima je utvrđeno da se hroničnom upotrebom morfina i heroina smanjuje antioksidantna odbrana jetrenih ćelija i indukuje lipidna peroksidacija i razgradnja hepatocita (*Panchenko i sar., 1999*). Takođe, morfin se može metabolisati u slobodne radikale čija prekomerna produkcija prouzrokuje oksidativna oštećenja (*Di Bello i sar., 1998*). Pro-oksidativni efekti morfina su dokazani kako pri visokim akutnim dozama, tako i pri ponovljenim niskim dozama (*Payabvash i sar., 2006*).

Hroničnom davanjem niskih doza morfina (5 - 10 mg/kg) eksperimentalnim životinjama, registrovano je značajno smanjenje aktivnosti jetrene GSH-Px i SOD. Ove promene prouzrokovane posredovanjem opijatnih receptora se mogu pripisati povećanom formiranju reaktivnih kiseoničnih vrsta (*Fujii i Taniguchi, 1999*). Za razliku od GSH-Px i SOD, uočen je značajan porast aktivnosti jetrene CAT. Ovaj fenomen je naročito značajan u slučaju ograničene količine glutaciona, kada katalaza preuzima glavnu ulogu u adaptaciji ćelija na oksidativni stres (*Meilhac i sar., 2000*).

Navedene promene u jetrenom antioksidantnom odbrambenom sistemu potvrđuju indukovanje ROS hroničnom upotrebom morfina, odnosno promene u aktivnosti GSH-Px, SOD i CAT objašnjavaju povećanje oksidativnog stresa praćeno hroničnom aktivacijom opijatnih receptora.

Ovaj fenomen ukazuje da je potrebno povećati unos glutaciona kao hvatača slobodnih radikala, iako će njegova potrošnja biti redukovana aktivnošću jetrene glutacion-peroksidaze, nakon hronične upotrebe morfina. Smanjenje koncentracije jetrenog GSH hroničnom upotrebom morfina, a posredstvom opijatnih receptora, može se objasniti smanjenim snabdevanjem cisteinom (neophodnim za sintezu GSH) i povećanom upotrebom GSH za direktno hvatanje slobodnih radikala (*Payabvash i sar., 2006*).

Utvrđeno je da se davanjem visokih doza morfina (50 - 100 mg/kg) eksperimentalnim životinjama smanjuje koncentracija jetrenog glutaciona. Pretpostavlja se da je formiranje glutacionimorfina u jetri delom odgovorno za ovaj fenomen (*Correia i sar., 1984*), međutim dokazano je da samo neznatan procenat morfina stvara ovakvu vrstu jedinjenja (*Kumagai i sar., 1990*). Nasuprot tome, uočeno je da opijatni antagonist naltrekson antagonizuje smanjenje koncentracije GSH indukovano morfinom (*James i sar., 1982*). Takođe, utvrđeno je da kortikosteroidi imaju znatnu ulogu u procesu smanjenja koncentracije GSH indukovane morfinom (*Roberts i sar., 1987*).

Oksidativni stres prouzrokovan morfinom se ispoljava u povećanom oksidativnom oštećenju deoksiribonukleinske kiseline (DNK), proteina, lipida, opadanju aktivnosti antioksidanasa SOD, CAT i GSH-Px, dok se oksidativno oštećenje biomolekula i hepatocita može sprečiti konzumiranjem egzogenih antioksidanasa.

Tretiranjem eksperimentalnih životinja (miševa) morfinom u kombinaciji sa egzogenim antioksidansima glutacionom i askorbinskom kiselinom, nije zapažena promena aktivnosti enzima oksidativnog stresa (*Zhang i sar., 2004*).

Ispitivanjima je utvrđeno da kod heroin - zavisnih životinja, produkcija ROS i oksidativno oštećenje proteina i lipida raste, kao što ukupni antioksidativni kapacitet opada. Zaštita od oksidativnog oštećenja biomolekula i neprijatnih apstinencijalnih pojava prilikom odvikavanja od heroina, može se ostvariti konzumiranjem relativno niskih koncentracija egzogenih antioksidanasa. Eksperimentima je dokazana korelacija između apstinencijalnih pojava i oksidativnog stresa, što može imati značajnu ulogu sa aspekta programa lečenja osoba zavisnih od opijata (*Pan i sar., 2005*).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

U današnje vreme, sve je više smrtnih slučajeva prouzrokovanih konzumiranjem opijata. Toksikološka laboratorija na Institutu za sudsku medicinu u Novom Sadu ima dugogodišnje iskustvo u analiziranju bioloških uzoraka kao što su krv, urin, želudačni sadržaj, žuč, jetra, u cilju identifikacije opijata kao uzročnika smrti. S obzirom na specifičan metabolizam opijatnih alkaloida, rezultati navedenih analiza često ne mogu u potpunosti da se povežu sa uzrokom smrti. Zato se ukazala potreba za uvođenjem specifičnih analiza određenih delova moždanog tkiva, gde se može naći najveća koncentracija opijata.

3.1. MATERIJAL I METODE

Humani biološki uzorci su uzimani za analizu sa autopsije izvršene na Institutu za sudsku medicinu - Klinički centar Novi Sad.

Eksperimentalne životinje su dobijene sa Departmana za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Tretiranje eksperimentalnih životinja opijatima i njihova dekapitacija je izvedena na Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, gde se nalazi adekvatna prostorija za laboratorijske životinje sa potrebnim konstantnim uslovima za njihov boravak i uzgoj, kao i laboratorija sa neophodnom opremom.

Čuvanje uzoraka, priprema biološkog materijala, ekstrakcija opijatnih alkaloida, kao i kvalitativna i kvantitativna GC-MS analiza pripremljenog biološkog materijala je izvedena u toksikološkoj laboratoriji Instituta za sudsku medicinu u Novom Sadu.

Analiza uzoraka jetre eksperimentalnih životinja je izvedena u laboratoriji Zavoda za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

Hemikalije

- K_2CO_3 (CENTROHEM - Jugoslavija),
- $NaHCO_3$ (CENTROHEM - Jugoslavija),
- $NaCl$ (CENTROHEM - Jugoslavija),
- anhidrovani Na_2SO_4 (CENTROHEM - Jugoslavija),

- anhidrovani K_2HPO_4 (Fluka - Nemačka),
- $CuSO_4 \times 5H_2O$ (CENTROHEM - Jugoslavija),
- KI (CENTROHEM - Jugoslavija),
- NH_4OH (CENTROHEM - Jugoslavija),
- H_3PO_4 (CENTROHEM - Jugoslavija),
- H_2SO_4 (CENTROHEM - Jugoslavija),
- NaOH (CENTROHEM - Jugoslavija),
- H_2O_2 (CENTROHEM - Jugoslavija),
- $HClO_4$ (Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Kvarcni pesak (CENTROHEM - Jugoslavija),
- Natrijum-acetat (Fluka - Nemačka),
- Kodein (1 mg/ml; Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Morfin (1 mg/ml; Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Acetilkodein (1 mg/ml; Sigma-Aldrich - Nemačka),
- 6-Acetilmorfin (1 mg/ml; Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Heroin (0,1 mg/ml; Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Meperidin (1 mg/ml; Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Limunska kiselina (CENTROHEM - Jugoslavija),
- K, Na-tartarat (CENTROHEM - Jugoslavija),
- EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina) (CENTROHEM - Jugoslavija),
- Tiobarbiturna kiselina (Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Trihlorsirćetna kiselina (Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Glutation (Sigma-Aldrich - Nemačka),
- DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina) (Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Gvajakol (Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Sirćetna kiselina (CENTROHEM - Jugoslavija),
- Metilenhlorid (HPLC - grade; Merck - Nemačka),
- Metanol (HPLC - grade; Merck - Nemačka),
- n-Heksan (HPLC - grade; Merck - Nemačka),
- Etil-acetat (HPLC - grade; Merck - Nemačka),
- izo-Propanol (HPLC - grade; Merck - Nemačka),
- α -Tokoferol (Sigma-Aldrich - Nemačka),
- TRIS-HCl (trishidroksimetilaminometan-HCl) (CENTROHEM - Jugoslavija),
- Kumol-hidroperoksid (Sigma-Aldrich - Nemačka),
- Sulfosalicilna kiselina (Sigma-Aldrich - Nemačka) i
- Ksantin (Sigma-Aldrich - Nemačka).

SPE kolone

- Extrelut-NT20 (Merck - Nemačka) i
- AccuBOND EVIDEX^{II} 400 mg/6 ml (Agilent Technologies - USA).

3.1.1. HUMANI BIOLOŠKI UZORCI

Humani biološki uzorci krvi, urina, žuči i moždanog tkiva su uzimani za analizu istog dana ili dana nakon smrti osoba, sa autopsije izvršene na Institutu za sudsku medicinu - Klinički centar Novi Sad, u toku 2005 - 2006 godine. Po uzimanju, uzorci su čuvani na temperaturi od -18 °C (u zamrzivaču) do analize.

Analizirani su biološki uzorci 29 osoba (24 muškarca i 5 žena) starosne dobi 18 - 35 godina, za koje se pretpostavljalo (od strane obducenta) da je uzrok smrti intoksikacija drogama ili lekovima. Selekcioni kriterijum za analizu delova moždanog tkiva je bio identifikacija:

- određenih opijatnih alkaloida (morfina, kodeina, 6-acetilmorfina, acetilkodeina, heroina, tj. 3,6-diacetilmorfina, mekonina, papaverina, noskapina),
- antidepresanata (diazepam, bromazepam, flurazepam),
- narkoanalgetika (tramadola, metadona) ili
- psihostimulansa kokaina u uzorcima krvi, urina ili žuči.

Analizom je utvrđeno prisustvo:

- opijatnih alkaloida i benzodiazepinskih preparata u 17 slučajeva,
- opijatnih alkaloida, benzodiazepinskih preparata i tramadola ili metadona u 3 slučajeva,
- opijatnih alkaloida, benzodiazepinskih preparata i kokaina u 1 slučaju,
- benzodiazepinskih preparata i metadona u 1 slučaju,
- metadona u 1 slučaju,
- opijatnih alkaloida u 2 slučajeva i
- benzodiazepinskih preparata u 4 slučajeva.

Analizirani su i uzorci krvi, urina, žuči i moždanog tkiva 6 osoba (4 muškarca i 2 žene) starosne dobi 22 - 50 godina, koje su predstavljale kontrolnu grupu, čija je smrt nastupila usled mehaničkih povreda, saobraćajne nesreće ili bolesti, tako da u navedenim uzorcima nije utvrđena intoksikacija drogama ili lekovima.

3.1.1.1. POSTUPAK ČVRSTO-TEČNE EKSTRAKCIJE (SPE-SOLID PHASE EXTRACTION) HUMANIH BIOLOŠKIH UZORAKA ZA ISPITIVANJE OPIJATNIH ALKALOIDA**Uzorci krvi**

Uzorak krvi (5 ml) kojem je dodat čvrst pufer $K_2CO_3:NaHCO_3=2:3$ i cc NH_4OH do pH 9, razblažen je destilovanom vodom do 20 ml i prenet na SPE kolonu Extrelut-NT20. Nakon 20 minuta je vršeno eluiranje (2×20 ml) smešom rastvarača

metilenhlorid:metanol=9:1. Eluat je uparen do suva na vazdušnom kupatilu (80 °C), potom rastvoren u 0,2 ml metilenhlorida i 1 µl je injektiran za GC-MS analizu.

Uzorci urina i žuči

Uzorci urina (20 ml) i žuči (5 ml) kojima je dodata 2M H₂SO₄ do pH 2, su podvrgnuti hidrolizi na 80 °C u toku 3 sata, a potom im je dodat čvrst pufer K₂CO₃:NaHCO₃=2:3 i cc NH₄OH do pH 9. Uzorci urina i žuči (nakon razblaženja destilovanom vodom do 20 ml) su preneti na SPE kolonu Extrelut-NT20 i po isteku 20 minuta je vršeno eluiranje (2 × 20 ml) smešom rastvarača metilenhlorid:metanol=9:1. Eluat je uparen do suva na vazdušnom kupatilu (80 °C), potom rastvoren u 0,2 ml metilenhlorida i 1 µl je injektiran za GC-MS analizu.

Uzorci moždanog tkiva

Uzorci moždane kore, moždanog stabla, amigdale i bazalnih jedara (oko 2 g) su homogenizovani u avanu sa kvarcnim peskom (1 g) i natrijum-hloridom (1,5 g). Homogenatu je potom dodata destilovana voda (15 ml; kojoj je prethodno podešen pH 2 sa 2M H₂SO₄) i vršena je ekstrakcija *n*-heksanom (5 ml) radi uklanjanja viših masnih kiselina i holesterola, u trajanju 2 minuta na aparatu Vortex T-Genie 2. Zatim je vršeno centrifugiranje 10 minuta na 3000 o/min (Tehnica - Železniki), organski sloj je odbačen, a vodeni sloj je, nakon dodatka čvrstog pufera K₂CO₃:NaHCO₃=2:3 i cc NH₄OH do pH 9 i filtriranja kroz vatru, prenet na SPE kolonu Extrelut-NT20. Po isteku 20 minuta, vršeno je eluiranje (2 × 20 ml) smešom rastvarača metilenhlorid:metanol=9:1, eluat je uparen do suva na vazdušnom kupatilu (80 °C), potom rastvoren u 0,2 ml metilenhloridnog rastvora internog standarda (IS) narkoanalgetika meperidina, koncentracije 3,267 µg/ml i 1 µl je injektiran za GC-MS analizu.

3.1.2. BIOLOŠKI UZORCI EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA (PACOVA)

U ogledima su korišćeni beli laboratorijski pacovi oba pola, soja *Wistar*, telesne mase 210 - 350 grama, starosti 6 meseci, odabrani metodom slučajnog izbora iz okota 2005 godine, na Departmanu za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Novi Sad. Životinje (mužjaci i ženke) su sve do početka ogleđa boravile u odvojenim kavezima u klimatizovanoj prostoriji, temperature vazduha 20-25 °C i bile izložene dvanaestočasovnom ciklusu svetlosti i mraka, a omogućen im je slobodan pristup hrani i vodi.

3.1.2.1. POSTUPAK PRIPREME HEROINA ZA TRETIRANJE EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Za tretiranje eksperimentalnih životinja je korišćen heroin, zaplenjen od strane organa istrage na ilegalnom tržištu u Novom Sadu 2006 godine.

U cilju utvrđivanja kvalitativnog sastava, kao i količine najzastupljenijih opijatnih alkaloida (3,6-diacetilmorfina i 6-acetilmorfina), odmereno je oko 10 mg heroina - zaplenjene droge, tj. praškaste supstance svetlo-smeđe boje, dodat 1 ml destilovane vode (kojoj je

prethodno podešen pH 9 sa cc NH_4OH), 1 ml etil-acetata i vršena je ekstrakcija u trajanju 2 minuta na aparatu Vortex T-Genie 2. Zatim je vršeno centrifugiranje 5 minuta na 3000 o/min, odvojen je organski sloj kojem je dodat anhidrovani Na_2SO_4 i 1 μl je injektiran za GC-MS analizu.

Heroin (zaplenjena droga) je pripremljen za tretiranje eksperimentalnih životinja, imitirajući što vernije način pripreme od strane intravenskih uživaoca heroina. Praškastoj supstanci svetlo-smeđe boje (0,556 g) je dodata limunska kiselina (0,111 g), fiziološki rastvor - 0,9 % NaCl (5 ml) i vršeno je zagrevanje na rešou do ključanja rastvora tamno-mrke boje, koji je zatim profiltriran kroz vaticu u odmerni sud od 10 ml i dopunjen fiziološkim rastvorom do oznake. Koncentracija pripremljenog rastvora je iznosila 10 mg/ml (računato na sadržaj 3,6-diacetilmorfina i 6-acetilmorfina u smeši).

3.1.2.2. TRETIRANJE EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA HEROINOM

Životinje su prema eksperimentalnom tretmanu bile podeljene u dve osnovne grupe:

- a) *kontrolnu grupu* (10 životinja) - mužjaci i ženke pacova koji su nakon merenja primali fiziološki rastvor (oko 1 ml) i nakon 15 minuta su žrtvovani i
- b) *eksperimentalnu grupu* (40 životinja) - mužjaci i ženke pacova koji su nakon merenja primali 25 mg/kg telesne mase (oko 1ml) pripremljenog rastvora heroina - zaplenjene droge, koncentracije 10 mg/ml, nakon čega su žrtvovani u različitim vremenskim periodima: 5, 15, 45 i 120 minuta. Za svaki vremenski period je korišćeno po 5 mužjaka i 5 ženki.

Opijati su davani životinjama akutno, intraperitonealno, insulinskim špricem zapremine 1 ml.

Po isteku određenog vremenskog perioda životinje su žrtvovane dekapitacijom, pri čemu su uzimani uzorci:

- krv (u epruvete sa antikoagulansom EDTA-K3 - etilendiamintetrasirćetna kiselina - kompleksom 3),
- delovi moždanog tkiva:
 - ◆ moždana kora,
 - ◆ moždano stablo,
 - ◆ amigdala,
 - ◆ bazalna jedra i
- jetra.

Po uzimanju, uzorci su čuvani na temperaturi od $-18\text{ }^\circ\text{C}$ (u zamrzivaču) do analize. U toku eksperimenta je 67 % mužjaka i 100 % ženki preživelo dozu od 25 mg/kg heroina - zaplenjene droge.

3.1.2.3. POSTUPAK ČVRSTO-TEČNE (SPE) EKSTRAKCIJE BIOLOŠKIH UZORAKA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA ZA ISPITIVANJE OPIJATNIH ALKALOIDA

Uzorci krvi

Uzorak krvi (0,5 - 1 ml) kojem je dodat čvrst pufer $K_2CO_3:NaHCO_3=2:3$ i cc NH_4OH do pH 9, razblažen je destilovanom vodom do 5 ml i prenet na SPE kolonu AccuBOND EVIDEX^{II} (400 mg/6 ml) pri protoku od 5 ml/min, koja je prethodno postavljena na Visiprep-DL SPE vakuum manifold (*Supelco*) i kondicionirana sa 5 ml metanola i 8 ml fosfatnog pufera pH 6 (0,1 M K_2HPO_4 : 1,74 g anhidrovanog K_2HPO_4 je rastvoreno u 100 ml destilovane vode i podešen pH 6 sa cc H_3PO_4). Nakon nanošenja uzorka vršeno je ispiranje kolone sa 3 ml destilovane vode i 3 ml acetatnog pufera pH 4,5 (0,1 M CH_3COONa : 0,82 g CH_3COONa je rastvoreno u 100 ml destilovane vode i podešen pH 4,5 sa glacijalnom CH_3COOH). Zatim je kolona sušena, centrifugiranjem 10 minuta na 3000 o/min i potom je vršeno eluiranje sa 6 ml smeše rastvarača metilenhlorid:izo-propanol:amonijum-hidroksid=78:20:2. Eluat je uparen do suva na vazдушnom kupatilu (80 °C), potom rastvoren u 0,2 ml metilenhloridnog rastvora internog standarda meperidina koncentracije 3,267 µg/ml i 1 µl je injektiran za GC-MS analizu.

Uzorci moždanog tkiva

Uzorci moždane kore, moždanog stabla, amigdale i bazalnih jedara (0,1 - 0,25 g) su homogenizovani u avanu sa kvarcnim peskom (0,5 g) i natrijum-hloridom (0,5 g). Homogenatu je potom dodata destilovana voda (5 ml; kojoj je podešen pH 2 sa 2M H_2SO_4) i vršena je ekstrakcija *n*-heksanom (3 ml) radi uklanjanja viših masnih kiselina i holesterola, u trajanju 2 minuta na aparatu Vortex T-Genie 2. Zatim je vršeno centrifugiranje 10 minuta na 3000 o/min, organski sloj je odbačen, a vodeni sloj je, nakon dodatka čvrstog pufera $K_2CO_3:NaHCO_3=2:3$ i cc NH_4OH do pH 9 i filtriranja kroz vatru, prenet na SPE kolonu AccuBOND EVIDEX^{II} (400 mg/6 ml), pri protoku od 5 ml/min. SPE kolona je prethodno postavljena na Visiprep-DL SPE vakuum manifold i kondicionirana sa 5 ml metanola i 8 ml fosfatnog pufera pH 6. Nakon nanošenja uzorka vršeno je ispiranje kolone sa 3 ml destilovane vode i 3 ml acetatnog pufera pH 4,5. Zatim je kolona sušena, centrifugiranjem 10 minuta na 3000 o/min i potom je vršeno eluiranje sa 6 ml smeše rastvarača metilenhlorid:izo-propanol:amonijum-hidroksid=78:20:2. Eluat je uparen do suva na vazдушnom kupatilu (80 °C), potom rastvoren u 0,2 ml metilenhloridnog rastvora internog standarda meperidina koncentracije 3,267 µg/ml i 1 µl je injektiran za GC-MS analizu.

3.1.3. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA GC-MS ANALIZA BIOLOŠKIH UZORAKA

Gasno hromatografska analiza sa spektrometrijskom detekcijom masa (GC-MS) je urađena na gasnom hromatografu 6890 N (GC) opremljenim masenim detektorom 5973 (MS) i automatskim injektorom 7683 *Agilent Technologies*, u EI (Electron Impact) modu na

70 eV i kapilarnoj koloni DB-5MS (30 m × 0,25 mm, debljine filma 0,25 μm; *Agilent Technologies*).

Temperatura injektora je iznosila 250 °C, a temperatura detektora (interface) 280 °C. Hromatografsko razdvajanje jedinjenja je vršeno injektiranjem 1 μl metilenhloridnog ekstrakta u splitless modu (1 min) pri konstantnom protoku helijuma kao gasa nosača, od 1 ml/min. Temperaturni programi za kvalitativnu (SCAN) i kvantitativnu (SIM - Selected Ion Monitoring) GC-MS analizu bioloških uzoraka su dati u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Temperaturni programi za SCAN i SIM GC-MS analizu bioloških uzoraka

SCAN GC-MS analiza humanih bioloških uzoraka	SCAN i SIM GC-MS analiza bioloških uzoraka eksperimentalnih životinja i SIM GC-MS analiza humanih bioloških uzoraka
50 °C 0 min 22 °C/min – 130 °C 1 min 12 °C/min – 280 °C 12,86 min	50 °C 0 min 40 °C/min – 200 °C 0 min 20 °C/min – 280 °C 12,25 min

Kvalitativna GC-MS analiza bioloških uzoraka

Kvalitativna GC-MS analiza bioloških uzoraka je vršena skeniranjem masa u širokom opsegu (50-550 m/z), a dobijeni maseni spektri jedinjenja su upoređivani sa masenim spektrima komercijalne biblioteke *Wiley*. Identifikovana jedinjenja su uzimana u obzir ukoliko je, prilikom poređenja njihovih masenih spektara sa masenim spektrima komercijalne biblioteke, verovatnoća slaganja bila veća od 80 %.

Kvantitativna GC-MS analiza bioloških uzoraka

U biološkim uzorcima je određivan sadržaj opijatnih alkaloida: kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina, tj. 3,6-diacetilmorfina. Kao interni standard je korišćen narkoanalgetik meperidin.

Karakteristični joni koji su praćeni specifičnom SIM analizom su:

- m/z 299, 229 i 162 za kodein,
- m/z 285, 162 i 215 za morfin,
- m/z 341, 282 i 229 za acetilkodein,
- m/z 327, 268 i 215 za 6-acetilmorfin,
- m/z 369, 327, i 268 za heroin i
- m/z 247, 172 i 218 za interni standard meperidin.

Kvantifikacija je vršena na osnovu karakterističnih m/z jona za svaki pojedinačni opijatni alkaloid. Kalibraciona kriva je dobijena snimanjem serije kalibracionih rastvora smeše ispitivanih opijatnih alkaloida (u koje je dodat interni standard koncentracije 3,267 μg/ml) u opsegu koncentracija 0,03 - 3,0 μg/ml. Odnos površina pikova ispitivanih opijatnih alkaloida i internog standarda je prikazan kao funkcija koncentracije supstance, primenom metode linearne regresije, a koeficijent korelacije je iznosio $r^2=0,997 - 1,000$.

Kalibracioni rastvori smeše opijatnih alkaloida (u metilenhloridu) su pripremljeni razblaživanjem originalnih standardnih rastvora (u metanolu): kodeina (1 mg/ml), morfina (1 mg/ml), acetilkodeina (1 mg/ml), 6-acetilmorfina (1 mg/ml), heroina (0,1 mg/ml) i meperidina (1 mg/ml).

Granica detekcije (LOD - Limit of Detection) je definisana kao količina jedinjenja koja se može detektovati pri odnosu signal/šum=3 i za svaki opijatni alkaloid je iznosila oko 0,01 µg/ml.

Granica kvantitacije (LOQ - Limit of Quantitation) je definisana kao minimalna količina jedinjenja koja se može sa sigurnošću i preciznošću kvantifikovati i za svaki opijatni alkaloid je iznosila oko 0,03 µg/ml.

Stvarni prinost (recovery) je određen dodavanjem poznate količine (spike) opijatnih alkaloida kontrolnim biološkim uzorcima, koji su zatim obrađeni na SPE kolonama i nakon GC-MS analize je vršeno poređenje površina pikova opijatnih alkaloida sa površinama pikova iste količine opijatnih alkaloida direktno injektirane u GC-MS. Za humane biološke uzorke, obrađene na SPE kolonama Extrelut-NT 20, recovery je iznosio 70 - 80 %, a za biološke uzorke eksperimentalnih životinja, obrađene na SPE kolonama AccuBOND EVIDEX^{II} 400 mg/6 ml, recovery je iznosio 80 - 90 %.

3.1.4. ISPITIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA OKSIDATIVNOG STRESA I KOLIČINE PROTEINA U JETRI EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Aktivnost enzima oksidativnog stresa (katalaze, glutation-peroksidaze, peroksidaze, ksantin-oksidge), intenzitet lipidne peroksidacije, sadržaj glutationa i ukupnih proteina je određivan u jetri eksperimentalnih životinja.

Nakon merenja i određivanja relativne mase (masa jetre/masa životinje), jetra je homogenizovana električnim homogenizatorom (Brown) sa puferom TRIS-HCl pH 7,4, u odnosu 1:4, u staklenoj posudi za homogenizaciju sa teflonskim klipom. U toku homogenizacije posuda je hlađena na +4 °C. Homogenat je potom profiltriran kroz gazu i korišćen je za navedene pojedinačne biohemijske analize.

Sva biohemijska merenja su izvedena na dvoznačnom UV/VIS spektrofotometru 8453 *Agilent Technologies*, opsega talasnih dužina $\lambda=190-1100$ nm, u kvarcnim pravougaonim kivetama, dužine optičkog puta 10 mm.

3.1.4.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH PROTEINA

Određivanje sadržaja ukupnih proteina je vršeno biuretskom metodom (*Walfrson, 1948*), koja se zasniva na reakciji jona bakra i peptidne veze u alkalnoj sredini, pri čemu se formira kompleks ljubičaste boje, a spektrofotometrijska određivanja su vršena u vidljivoj oblasti spektra na $\lambda_{\max}=550$ nm.

Reagensi

- Biuret reagens (100 ml 2M NaOH, 4,5 g K, Na-tartarata, 0,5 g kristalnog $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ i 0,5 g KI). Biuret reagens je razblažen destilovanom vodom u odnosu 1:1 da bi se dobio radni rastvor.

Postupak

U 0,05 ml homogenata jetre je dodato 2 ml biuret radnog rastvora i nakon 30 minuta je merena apsorbanacija (A) na $\lambda=550$ nm.

$$A / 0,0040 = \text{mg proteina/ml homogenata}$$

$$\text{mg proteina/ml homogenata} \times 5 = \text{mg proteina/g jetre}$$

- (0,0040 je matematički dobijen koeficijent pravca kalibracione krive, dobijene merenjem apsorbanacije standardnih rastvora albumina, koncentracije 25 - 200 mg/ml).

3.1.4.2. ODREĐIVANJE INTENZITETA LIPIDNE PEROKSIDACIJE (LP)

Test sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA - test) je jedna od najčešće primenjivanih metoda za određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (*Buege i Aust, 1978*). Metoda se zasniva na formiranju obojenog kompleksa tiobarbiturne kiseline sa malondialdehidom koji nastaje kao proizvod lipidne peroksidacije. Spektrofotometrijska određivanja su vršena u vidljivoj oblasti spektra na $\lambda_{\text{max}}=535$ nm.

Reagensi

- reagens za LP (3,75 g tiobarbiturne kiseline, 15 g trihlorsirćetne kiseline, 20,72 ml perhlorne kiseline i 1-2 kapi α -tokoferola u 1l rastvora).

Postupak

U 0,05 ml homogenata jetre je dodato 2,5 ml rastvora za LP, zatim je vršeno zagrevanje 15 minuta na ključalom vodenom kupatilu i nakon toga centrifugiranje 10 minuta na 3000 o/min. Apsorbanacija je merena na $\lambda=535$ nm.

$$A \times 9,68 \times 10^{-6} \text{ mol} ; \text{ konačni rezultati se izražavaju u nmol/mg proteina}$$

- ($9,68 \times 10^{-6}$ mol je faktor dobijen matematičkim putem iz količine sastojaka u reakciji i apsorpcionog molarnog koeficijenta kompleksa malondialdehida i tiobarbiturne kiseline, $\epsilon=15,6 \times 10^4 \text{ dm}^3/\text{molcm}$).

3.1.4.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT)

Aktivnost CAT je određena primenom vodonik-peroksida kao supstrata (*Beers i Sizer, 1950*), a apsorbanacija uzoraka je merena u UV oblasti spektra na $\lambda_{\text{max}}=240$ nm.

Reagensi

- 50 mM fosfatni pufer pH 7,
- 30 % vodonik-peroksid i
- radni rastvor: 0,075 ml 30 % H_2O_2 u 50 ml fosfatnog pufera pH 7.

Postupak

U 0,05 ml homogenata jetre je dodato 3 ml radnog rastvora (smeše fosfatnog pufera pH 7 i vodonik-peroksida) i nakon 2-3 minuta je reakcija prekinuta, zagrevanjem na ključalom vodenom kupatilu. Zatim je vršeno centrifugiranje 10 minuta na 3000 o/min, a apsorbancija je merena na $\lambda=240$ nm.

$A \times 1,75 \times 10^{-6}$ mol ; konačni rezultati se izražavaju u nmol/mg proteina \times min

- ($1,75 \times 10^{-6}$ mol je faktor dobijen matematičkim putem iz količine sastojaka u reakciji i apsorpcionog molarnog koeficijenta adicionog kompleksa, $\epsilon=4,36 \times 10^4$ dm³/molcm).

3.1.4.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI GLUTATION-PEROKSIDAZE (GSH-Px)

Aktivnost GSH-Px je određena uz kumol-hidroperoksid kao supstrat (*Chin i sar., 1976*), a apsorbancija uzoraka je merena u vidljivoj oblasti spektra na $\lambda_{\max}=412$ nm.

Reagensi

- 50 mM pufer TRIS-HCl pH 7,6 (*pufer1*: 3,028 g 50 mM pufer TRIS-HCl pH 7,6 i 0,186 g EDTA u 50 ml destilovane vode),
- 0,4 M pufer TRIS-HCl pH 8,9 (*pufer2*: 24,23 g 0,4 M pufer TRIS-HCl pH 8,9 u 500 ml destilovane vode),
- glutation (6 mg u 10 ml *pufera 1*),
- kumol-hidroperoksid (0,05 ml u 10 ml metanola),
- DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina; 19,8 mg u 5 ml *pufera 2*) i
- 4 % sulfosalicilna kiselina.

Postupak

U 0,05 ml homogenata jetre je dodato 0,75 ml pufera 1, vršeno termostatiranje 10 minuta na 37 °C, potom dodato 0,1 ml glutationa, 0,1 ml kumol-hidroperoksida i vršeno termostatiranje 5 minuta na 37 °C. Zatim je uzorku dodat 1ml 4 % sulfosalicilne kiseline i vršeno centrifugiranje 10 minuta na 3000 o/min, a potom je u 1 ml supernatanta dodato 2 ml pufera 2, 0,05 ml rastvora DTNB i merena je apsorbancija na $\lambda=412$ nm.

$A \times 4,55 \times 10^{-6}$ mol ; konačni rezultati se izražavaju u nmol/mg proteina \times min

- ($4,55 \times 10^{-6}$ mol je faktor dobijen matematičkim putem iz količine sastojaka u reakciji i apsorpcionog molarnog koeficijenta za GSH i DTNB, $\epsilon=1,36 \times 10^4$ dm³/molcm).

3.1.4.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI PEROKSIDAZE (Px)

Aktivnost Px je određena uz vodonik-peroksid kao supstrat, na osnovu transformacije gvajakola u tetragvajakol u toku jednog minuta (*Simon i sar., 1974*). Spektrofotometrijska određivanja su vršena u vidljivoj oblasti spektra na $\lambda_{\max}=436$ nm.

Reagensi

- 0,1 M fosfatni pufer pH 7,
- gvajakol (250 mg u 100 ml destilovane vode) i
- 30 % vodonik-peroksid (0,140 ml u 100 ml destilovane vode).

Postupak

U 0,05 ml homogenata jetre je dodato 3 ml fosfatnog pufera pH 7, 0,05 ml rastvora gvajakola, 0,05 ml vodonik-peroksida i vršeno je centrifugiranje 10 minuta na 3000 o/min. Apsorbancija je merena na $\lambda=436$ nm.

$A \times 3,38 \times 10^{-6}$ mol ; konačni rezultati se izražavaju u nmol/mg proteina \times min

- ($3,38 \times 10^{-6}$ mol je faktor dobijen matematičkim putem iz količine sastojaka u reakciji i apsorpcionog molarnog koeficijenta adicionog kompleksa, $\epsilon=2,30 \times 10^4$ dm³/molcm).

3.1.4.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KSANTIN-OKSIDAZE (XOD)

Aktivnost XOD je određena uz ksantin kao supstrat, na osnovu njegovog prelaska u mokraćnu kiselinu (*Begmayer, 1970*), a spektrofotometrijska određivanja su vršena u UV oblasti spektra na $\lambda_{\max}=293$ nm.

Reagensi

- reagens za XOD (0,1 M fosfatni pufer pH 7,5, 1 mM ksantin i 1 mM EDTA).

Postupak

U 0,05 ml homogenata jetre je dodato 3 ml reagensa za XOD, zatim je nakon 10 minuta reakcija zaustavljena stavljanjem u ključalo vodeno kupatilo i vršeno je centrifugiranje 10 minuta na 3000 o/min. Apsorbancija je merena na $\lambda=293$ nm.

$A \times 6,29 \times 10^{-6}$ mol ; konačni rezultati se izražavaju u nmol/mg proteina \times min

- ($6,29 \times 10^{-6}$ mol je faktor dobijen matematičkim putem iz količine sastojaka u reakciji i apsorpcionog molarnog koeficijenta adicionog kompleksa, $\epsilon=1,20 \times 10^4$ dm³/molcm).

3.1.4.7. ODREĐIVANJE SADRŽAJA REDUKOVANOG GLUTATIONA (GSH)

Sadržaj GSH je određen na osnovu količine tiola, tj. neproteinskih sulfhidrilnih ostataka, pomoću Ellman-ovog reagensa (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina - DTNB u fosfatnom puferu) (*Kapetanović i Mičević, 1979*). Obojeni adicioni proizvod nastaje oksidacijom glutaciona u prisustvu DTNB. Apsorbancija uzoraka je merena u vidljivoj oblasti spektra na $\lambda_{\max}=412$ nm.

Reagensi

- 4 % sulfosalicilna kiselina i
- Ellman-ov reagens (0,2 mM DTNB u 0,1 M fosfatnog pufera pH 8).

Postupak

U 1 ml homogenata jetre je dodato 2 ml 4 % sulfosalicilne kiseline i vršeno je centrifugiranje 10 minuta na 3000 o/min. Zatim je u 0,2 ml supernatanta dodato 2 ml Ellman-ovog reagensa i merena je apsorbancija na $\lambda=412$ nm.

$A \times 2,48 \times 10^{-6}$ mol ; konačni rezultati se izražavaju u nmol/mg proteina

- ($2,48 \times 10^{-6}$ mol je faktor dobijen matematičkim putem iz količine sastojaka u reakciji i apsorpcionog molarog koeficijenta za DTNB, $\epsilon=1,36 \times 10^4$ dm³/molcm).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Cilj ove doktorske disertacije, kao što je u uvodnom delu rada pomenuto, je bio ispitivanje distribucije opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima) gde je utvrđena najveća gustina μ -opijatnih receptora, kako bi se izvršila selekcija delova sa najvećim sadržajem opijata, a čijom analizom bi se doprinelo razrešenju uzroka nagle smrti prouzrokovane konzumiranjem heroina.

Shodno navedenom, najpre su:

- *razrađeni postupci izolacije i pripreme opijatnih alkaloida iz humanih bioloških uzoraka,*
- *razvijene metode za kvalitativnu i kvantitativnu GC-MS analizu uzoraka i*
- *razrađeni postupci pripreme i aplikacije heroina eksperimentalnim životinjama, pri čemu je isplaniran detaljan tok istraživanja.*
- *Ispitivanja su vršena na humanim biološkim uzorcima gde ne postoji mogućnost za precizno utvrđivanje količine opijata ili medikamenata koje su osobe konzumirale neposredno pre smrtnog ishoda i na biološkim uzorcima eksperimentalnih životinja gde su omogućeni kontrolisani uslovi, s obzirom da su sve životinje primale istu dozu heroina, nakon čega su žrtvovane u određenim vremenskim periodima. Da bi se omogućilo adekvatno poređenje rezultata analize humanih i moždanih tkiva eksperimentalnih životinja, za tretiranje životinja je korišćen heroin - zaplenjena droga, što predstavlja inovaciju u odnosu na ranija istraživanja u kojima su životinje tretirane čistim supstancama heroinom ili morfinom (literaturni pregled).*
- *Sadržaj opijatnih alkaloida je, osim u uzorcima moždanog tkiva, određivan i u uzorcima krvi eksperimentalnih životinja kako bi se pratio metabolizam i distribucija opijata iz krvi u moždano tkivo.*
- *U cilju ispitivanja uticaja opijata na aktivnost enzima oksidativnog stresa, sadržaja glutaciona i ukupnih proteina, analizirani su uzorci jetre eksperimentalnih životinja.*
- *Kako bi se utvrdile eventualne razlike u osetljivosti suprotnih polova na opijate, sva ispitivanja su uporedo vršena na humanim biološkim uzorcima i biološkim uzorcima eksperimentalnih životinja suprotnih polova.*

4.1. POSTUPAK PRIPREME BIOLOŠKIH UZORAKA ZA ANALIZU

Postupak pripreme bioloških uzoraka za identifikaciju i određivanje sadržaja opijatnih alkaloida je modifikovan u odnosu na ranije objavljene metode u kojima je vršena derivatizacija ekstrakta neposredno pre GC-MS analize (*Goldstein i sar., 1985; Donnerer i sar., 1987; Kodaira i sar., 1989; Horak i sar., 1993; Guarna i sar., 1998; Allen i sar., 1999; Poeaknapo i sar., 2004*). Derivatizacijom se, u cilju lakše identifikacije i kvantifikacije, najčešće primenom reagenasa N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida - BSTFA ili N-metil-bis(trifluoroacetamida) - MBTFA, polarni opijatni alkaloidi, kao što su morfin i 6-acetilmorfin prevode u nepolarne trimetilsilil (TMS) derivate.

U okviru ovog eksperimentalnog rada derivatizacija nije vršena, čime je vreme pripreme uzoraka znatno skraćeno i izbegnuta je kontaminacija dela GC-MS sistema za unos uzoraka (inlet), veoma agresivnim reagensima za derivatizaciju. Adekvatna identifikacija i kvantifikacija polarnih opijatnih alkaloida je omogućena povećanjem vrednosti parametra EMV (electron multiplier voltage) masenog detektora za 500 i 200 jedinica u vremenskim periodima u okviru kojih se detektuju morfin, odnosno 6-acetilmorfin u toku hromatografske analize.

4.2. KVALITATIVNA GC/MS ANALIZA HUMANIH BIOLOŠKIH UZORAKA

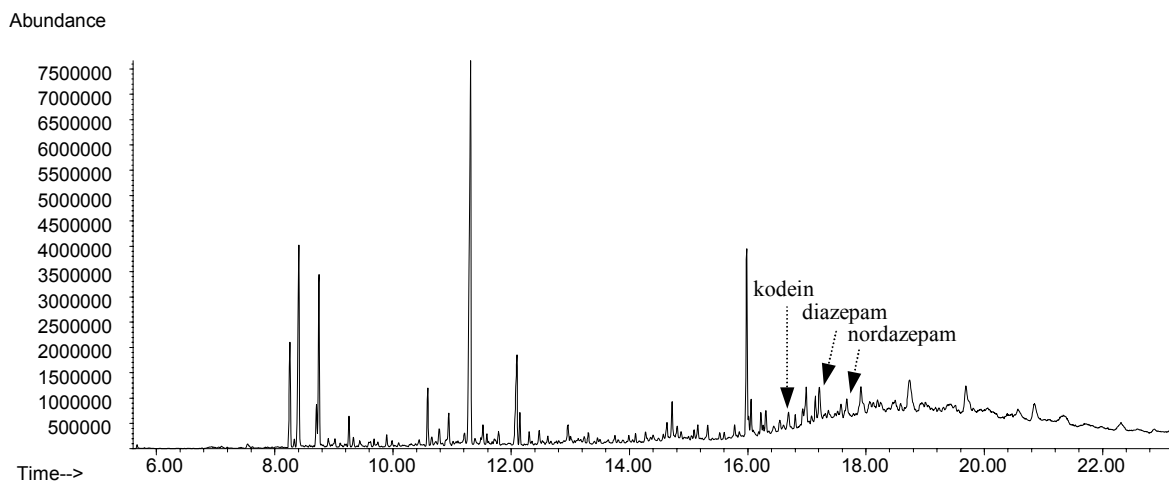
Kvalitativnom GC-MS analizom humanih bioloških uzoraka krvi, urina, žuči i delova moždanog tkiva 29 osoba (24 muškarca i 5 žena), starosne dobi 18 - 35 godina, utvrđeno je prisustvo:

- opijatnih alkaloida i benzodiazepinskih preparata u 17 slučajeva;
- opijatnih alkaloida, benzodiazepinskih preparata i tramadola u 2 slučajaja;
- opijatnih alkaloida, benzodiazepinskih preparata i metadona u 1 slučaju;
- opijatnih alkaloida, benzodiazepinskih preparata i kokaina u 1 slučaju;
- benzodiazepinskih preparata i metadona u 1 slučaju;
- benzodiazepinskih preparata u 4 slučajaja;
- metadona u 1 slučaju i
- opijatnih alkaloida u 2 slučajaja.

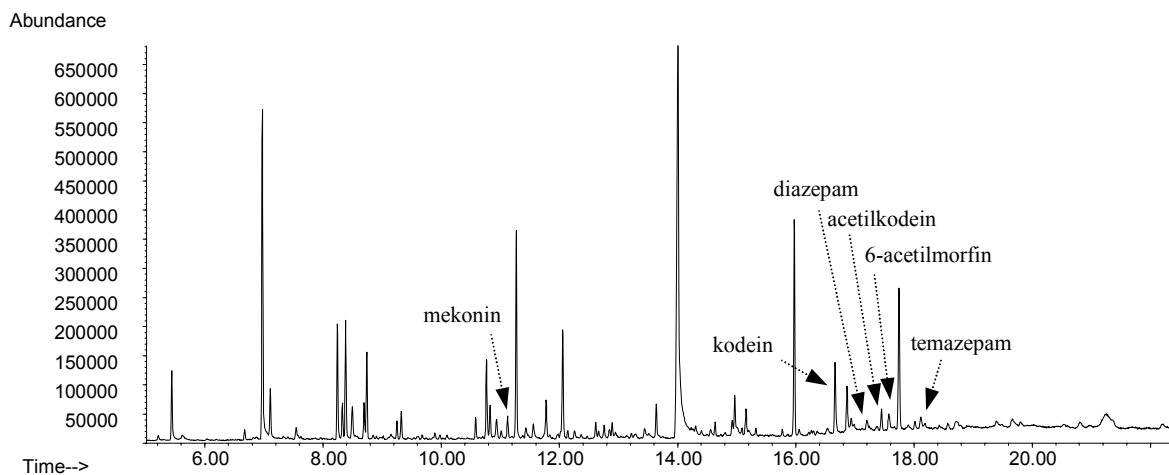
Identifikacija navedenih jedinjenja u biološkim uzorcima je predstavljala selekcionu kriterijum za kvantitativnu analizu delova moždanog tkiva 29 osoba.

Analizom kontrolnih bioloških uzoraka 6 osoba (4 muškarca i 2 žene) starosne dobi 22 - 50 godina, nije utvrđena intoksikacija drogama ili lekovima.

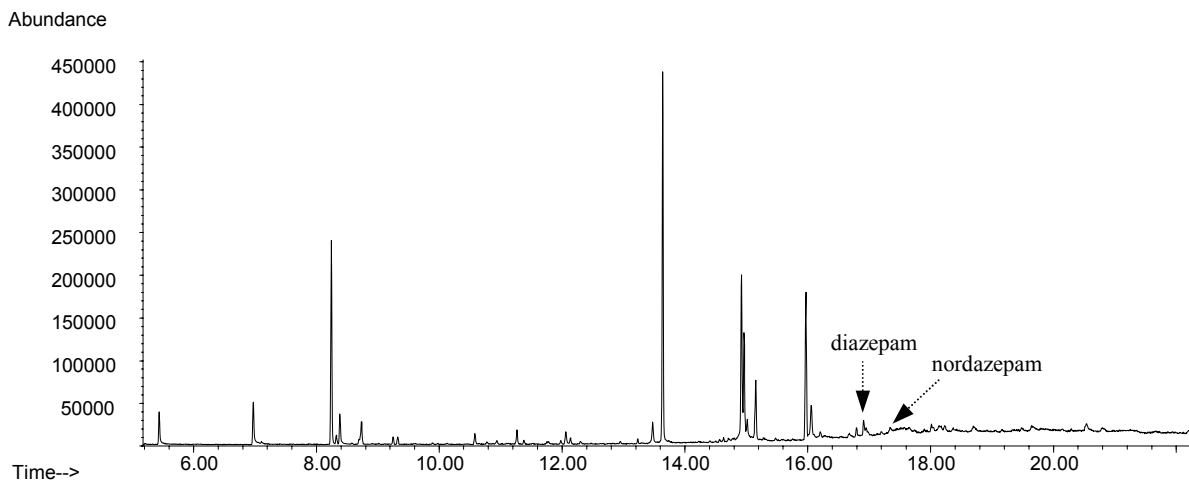
Kao primer kvalitativne analize humanih bioloških uzoraka, u kojima je utvrđeno prisustvo opijatnih alkaloida i benzodiazepinskih preparata, na slikama od 4.1. do 4.7. su prikazani hromatogrami GC-MS SCAN analize uzoraka krvi, urina, žuči i delova moždanog tkiva (moždane kore, moždanog stabla, amigdale i bazalnih jedara) muške osobe, starosnog doba 21 godine. Na osnovu izvršene autopsije (spoljašnjeg i unutrašnjeg pregleda) dan nakon smrti, odnosno pronalaza osobe, mikroskopske analize uzetih isečaka tkiva i rezultata hemijsko-toksikološke analize, utvrđeno je da postoji pretpostavka za nasilnu smrt usled prekomerno uzete droge - heroina i benzodiazepinskog preparata diazepam.



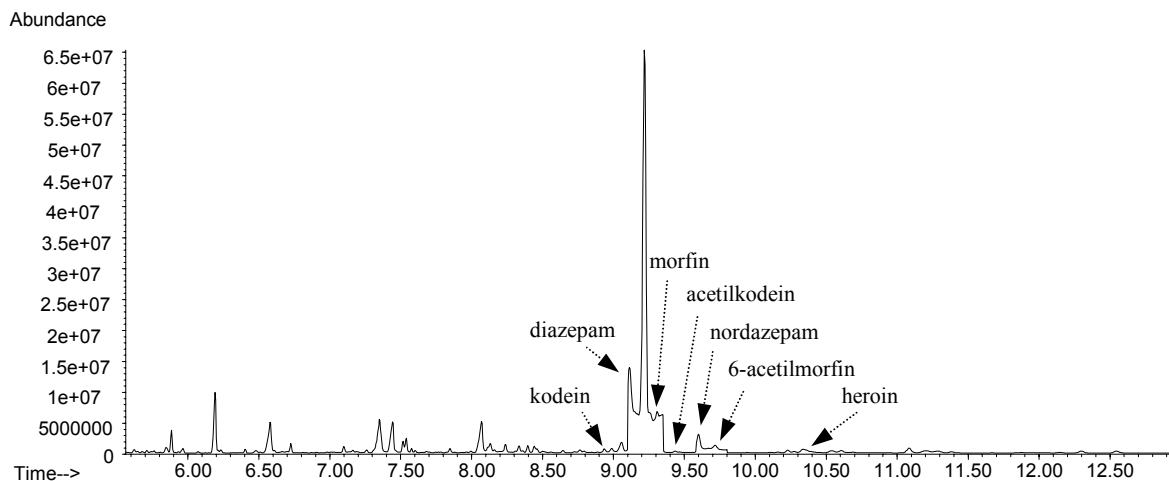
Slika 4.1. Hromatogram GC-MS SCAN analize uzorka krvi



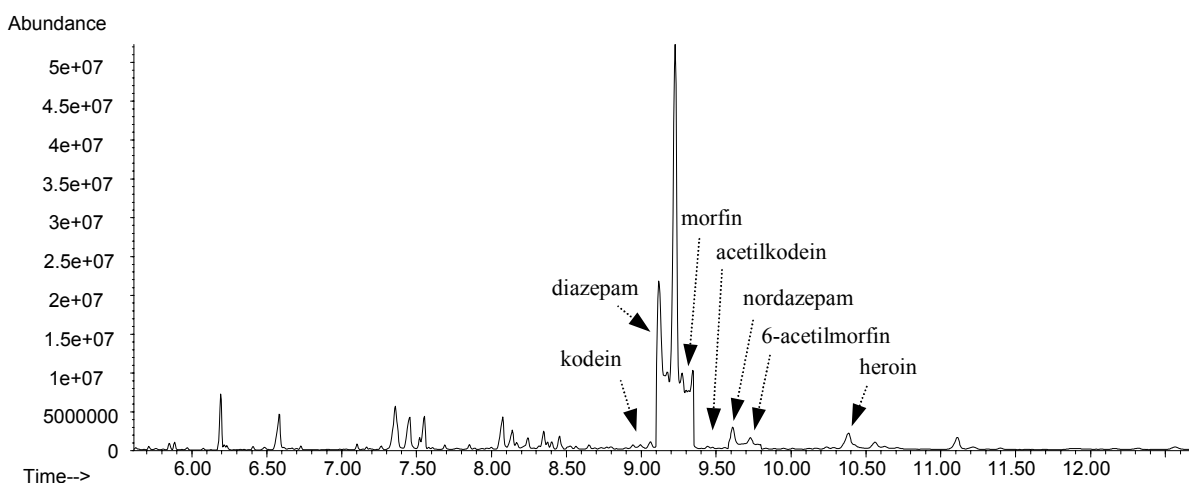
Slika 4.2. Hromatogram GC-MS SCAN analize uzorka urina



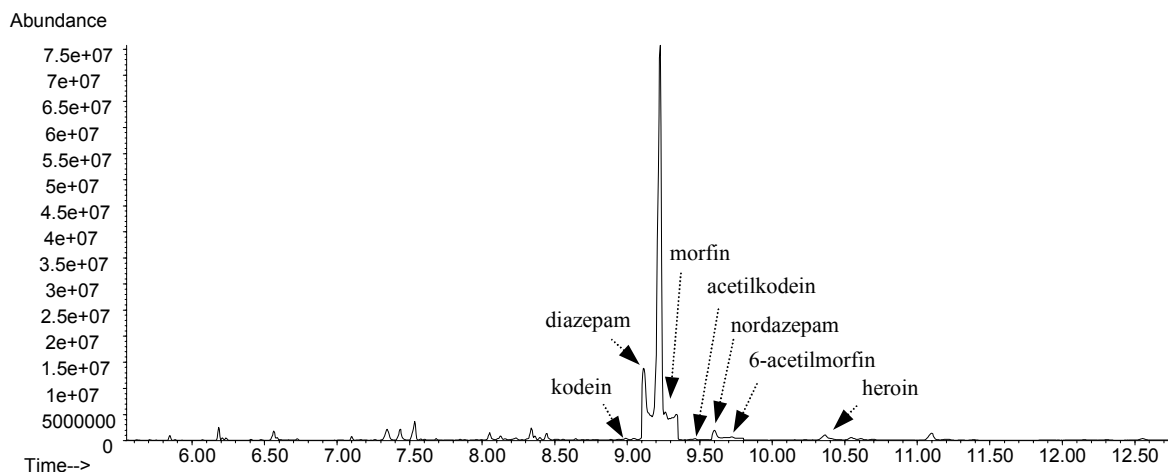
Slika 4.3. Hromatogram GC-MS SCAN analize uzorka žuči



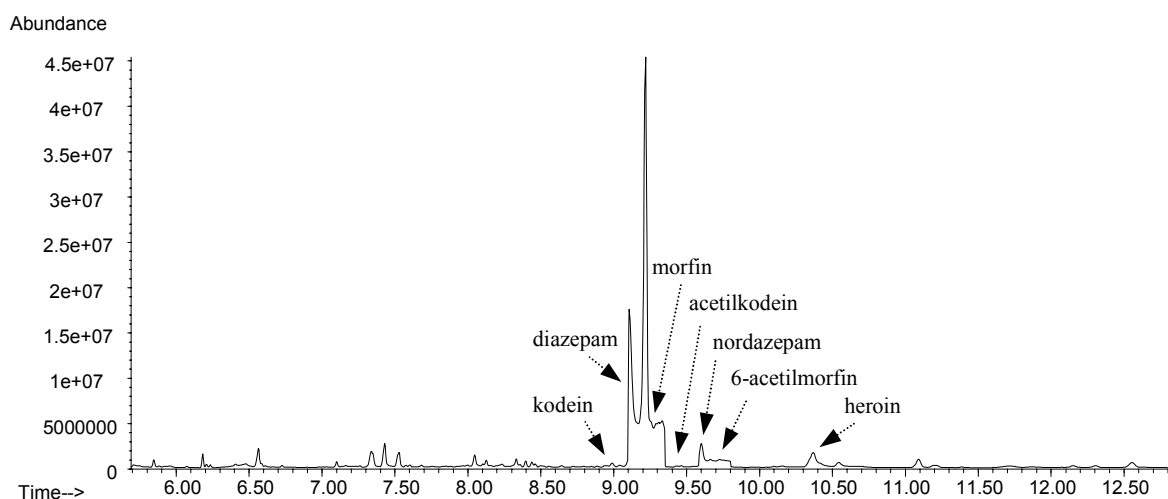
Slika 4.4. Hromatogram GC-MS SCAN analize uzorka moždane kore



Slika 4.5. Hromatogram GC-MS SCAN analize uzorka moždanog stabla



Slika 4.6. Hromatogram GC-MS SCAN analize uzorka amigdale



Slika 4.7. Hromatogram GC-MS SCAN analize uzorka bazalnih jedara

Na prikazanim hromatogramima GC-MS SCAN analize bioloških uzoraka su označena identifikovana jedinjenja u:

- krvi - benzodiazepinski preparat, tj. anksiolitik *diazepam* (bensedin, apaurin), njegov metabolit *nordazepam* i opijatni alkaloid *kodein* (slika 4.1.),
- urinu - anksiolitik *diazepam*, njegov metabolit *temazepam* (metil-oksazepam) i opijatni alkaloidi *mekonin*, *kodein*, *acetilkodein* i *6-acetilmorfin* (slika 4.2.),
- žuč - anksiolitik *diazepam* i njegov metabolit *nordazepam* (slika 4.3.) i
- moždanoj kori, stablu, amigdali i bazalnim jedrima - anksiolitik *diazepam*, njegov metabolit *nordazepam* i opijatni alkaloidi *kodein*, *morfin*, *acetilkodein*, *6-acetilmorfin* i *heroin* (slike 4.4. - 4.7.).

Ako se posmatra distribucija identifikovanih jedinjenja u analiziranim biološkim uzorcima, može se uočiti da su opijatni alkaloidi prisutni u svim delovima moždanog tkiva, za razliku od uzoraka krvi, urina i žuči. Takođe, može se uočiti da su morfin i heroin identifikovani samo u uzorcima moždanog tkiva. Prisustvo diazepama i njegovog metabolita

u delovima moždanog tkiva sa najvećom gustinom opijatnih receptora, ukazuje na sinergističko dejstvo ovog medikamenta i opijatnih alkaloida koje prouzrokuje akutnu depresiju vitalnih funkcija i brz smrtni ishod.

Kvalitativnom GC-MS analizom bioloških uzoraka 29 osoba, u 4 slučaja je u uzorcima krvi, urina i žuči utvrđeno prisustvo diazepama, u 1 slučaju diazepama i metadona i u 1 slučaju metadona, pri čemu nisu identifikovani opijatni alkaloidi. Analizom delova moždanog tkiva istih 6 osoba, pored navedenih medikamenata, identifikovani su i opijatni alkaloidi, što ukazuje na njihov brz metabolizam i distribuciju u organizmu, a duži boravak u moždanom tkivu.

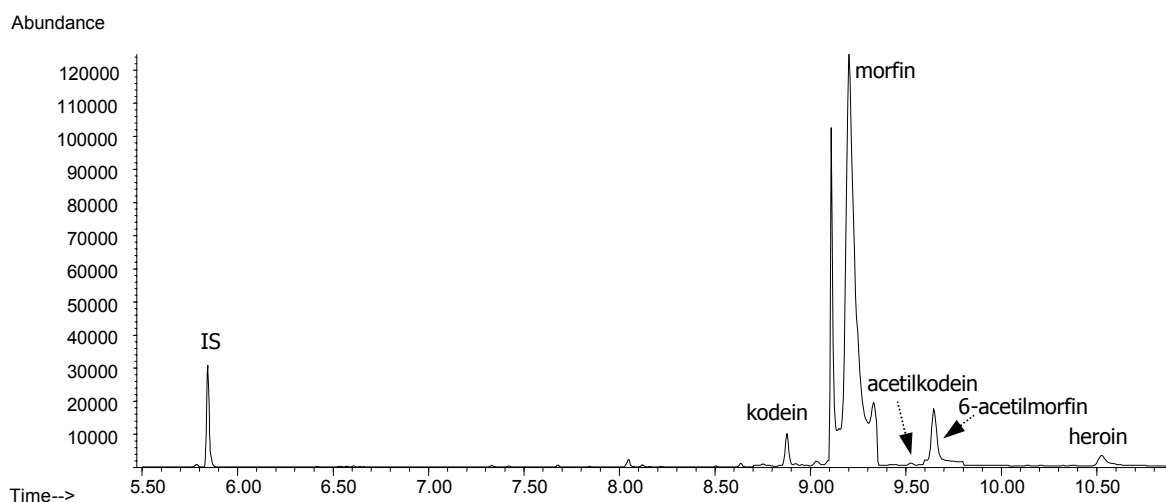
Rezultati kvalitativne hemijsko-toksikološke analize bioloških uzoraka 29 osoba ukazuju na neophodnost analize moždanog tkiva, pored uobičajenih analiza uzoraka krvi, urina i žuči u smrtnim slučajevima kada postoji sumnja na intoksikaciju opijatima.

4.3. KVANTITATIVNA GC/MS ANALIZA HUMANIH BIOLOŠKIH UZORAKA MOŽDANOG TKIVA

U cilju ispitivanja distribucije opijatnih alkaloida u moždanom tkivu, određivan je sadržaj kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u uzorcima moždane kore, moždanog stabla, amigdale i bazalnih jedara, 29 osoba (24 muškarca i 5 žena), starosne dobi 18 - 35 godina.

S obzirom da kvalitativnom GC-MS analizom bioloških uzoraka (krvi, urina, žuči i delova moždanog tkiva) 6 osoba (4 muškarca i 2 žene) starosne dobi 22 - 50 godina, nije utvrđeno prisustvo droga i lekova, navedeni uzorci delova moždanog tkiva su predstavljali kontrolnu grupu.

Kao primer kvantitativne analize humanih delova moždanog tkiva, prikazan je hromatogram GC-MS SIM analize moždane kore muške osobe, starosnog doba 21 godine, u kojoj su kvantifikovani kodein (67,0 ng/g), morfin (282,7 ng/g), acetilkodein (5,24 ng/g), 6-acetilmorfin (151,5 ng/g) i heroin (1,92 ng/g) (slika 4.8.).



Slika 4.8. Hromatogram GC-MS SIM analize uzorka moždane kore (IS - interni standard meperidin)

Od ukupno 29 analiziranih uzoraka moždanog tkiva, morfin je identifikovan u 28 uzoraka, 6-acetilmorfin u 26 uzoraka, heroin u 24 uzoraka, kodein u 20 uzoraka i acetilkodein u 7 uzoraka. Iz navedenih podataka se može zaključiti da su osobe konzumirale drogu - heroin sa najvećim sadržajem opijatnih alkaloida 6-acetilmorfina i 3,6-diacetilmorfina, tj. heroina, koji podležu biotransformaciji u morfin, dok je acetilkodein prisutan u manjoj količini i podleže biotransformaciji u kodein.

Ukupan sadržaj opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva 29 osoba, se kretao od 6,4 do 883,6 ng/g (3,3 % - 60,5 %).

Sadržaj pojedinačnih opijatnih alkaloida: **kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina** u delovima moždanog tkiva analiziranih uzoraka je redom iznosio: 0 - 342,9 ng/g (0 - 43,4 %); 0 - 358,6 ng/g (0 - 68,2 %); 0 - 51,4 ng/g (0 - 57,1 %); 0 - 149,5 ng/g (0 - 100 %) i 0 - 189,3 ng/g (0 - 100 %).

Podaci dobijeni analizom moždanih tkiva 24 muške i 5 ženskih osoba su prikazani kao procentualni sadržaj u pojedinim delovima moždanog tkiva, radi lakšeg tumačenja i međusobnog poređenja, s obzirom da je bilo nemoguće precizno odrediti vreme smrti i količinu opijata ili medikamenata koje su osobe konzumirale neposredno pre smrtnog ishoda.

4.3.1. ODREĐIVANJE UKUPNOG SADRŽAJA OPIJATNIH ALKALOIDA KOD MUŠKIH OSOBA

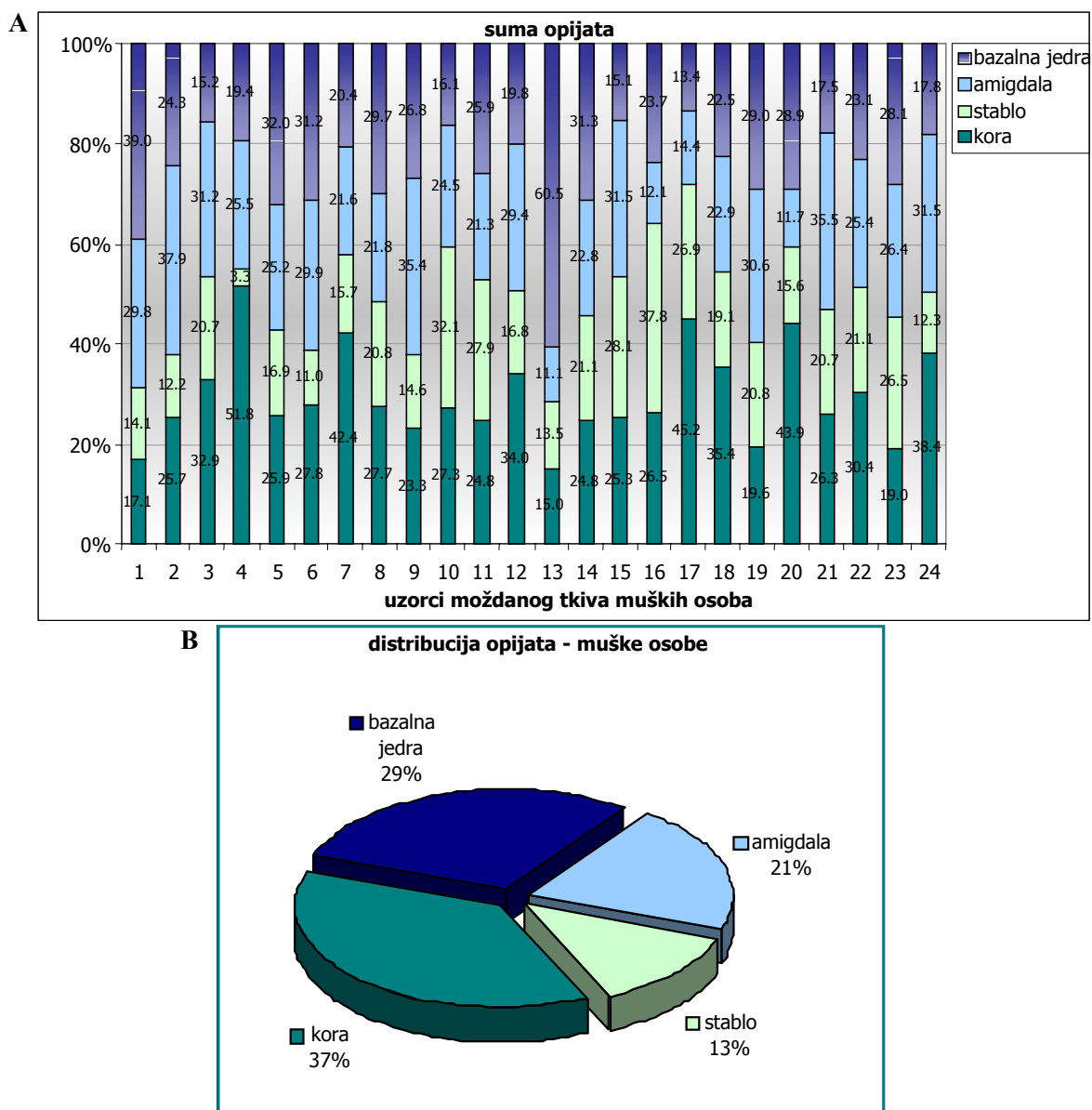
Na slici 4.9. A. je sumarno prikazan procentualni sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida u moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima 24 muške osobe. Na osnovu dobijenih rezultata, procentualni sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva muških osoba iznosi:

- 15,0 - 51,8 % u moždanoj kori (uzorci 13 i 4),
- 3,3 - 37,3 % u moždanom stablu (uzorci 4 i 16),
- 11,1 - 37,9 % u amigdali (uzorci 13 i 2) i
- 13,4 - 60,5 % u bazalnim jedrima (uzorci 17 i 13).

U cilju ispitivanja distribucije opijatnih alkaloida u moždanom tkivu, odnosno selekcije delova sa najvećim sadržajem opijata, za svaki uzorak je izdvojen deo moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću opijata. Od ukupno 24 analizirana uzorka najveći sadržaj ukupnih opijata je određen u:

- moždanoj kori - 9 uzoraka (3, 4, 7, 12, 17, 18, 20, 22 i 24),
- bazalnim jedrima - 7 uzoraka (1, 5, 6, 8, 13, 14 i 23),
- amigdali - 5 uzoraka (2, 9, 15, 19 i 21) i
- moždanom stablu - 3 uzorka (10, 11 i 16).

Navedeni rezultati ukazuju na distribuciju ukupnih opijata, odnosno delove moždanog tkiva gde se može očekivati najveći procenat njihove zastupljenosti, što je prikazano na slici 4.9. B. Najveća procentualna zastupljenost ukupnih opijatnih alkaloida se može uočiti u moždanoj kori (37 %) i bazalnim jedrima (29 %), a najmanja u moždanom stablu (13 %), dok je u amigdali njihova zastupljenost 21 % kod muških osoba.



Slika 4.9. (A) Procentualni sadržaj opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva muških osoba
(B) Distribucija opijata u moždanom tkivu muških osoba

4.3.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA POJEDINAČNIH OPIJATNIH ALKALOIDA KOD MUŠKIH OSOBA

Od ukupno 24 analiziranih uzoraka moždanog tkiva muških osoba, morfin je identifikovan u 23 uzorka, 6-acetilmorfin u 21 uzorku, heroin u 20 uzoraka, kodein u 16 uzoraka i acetilkodein u 5 uzoraka, što ukazuje da su osobe konzumirale drogu - heroin sa najvećim sadržajem 6-acetilmorfina i 3,6-diacetilmorfina u smeši, koji podleže biotransformaciji u morfin, dok je acetilkodein prisutan u manjoj količini i podleže biotransformaciji u kodein.

Sadržaj pojedinačnih opijatnih alkaloida: **kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina** u delovima moždanog tkiva analiziranih uzoraka muških osoba

je redom iznosio: 0 - 218,2 ng/g; 0 - 358,6 ng/g; 0 - 51,4 ng/g; 0 - 149,5 ng/g i 0 - 189,3 ng/g.

Procentualni sadržaj kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima muških osoba je prikazan na slikama od 4.10. A do 4.14. A., a distribucija navedenih opijatnih alkaloida u pojedinim delovima moždanog tkiva, gde se može očekivati najveći procenat njihove zastupljenosti je prikazana na slikama od 4.10. B do 4.14. B.

Kodein

Iz prikazanih rezultata se može uočiti da procentualni sadržaj kodeina u delovima moždanog tkiva muških osoba iznosi (slika 4.10. A):

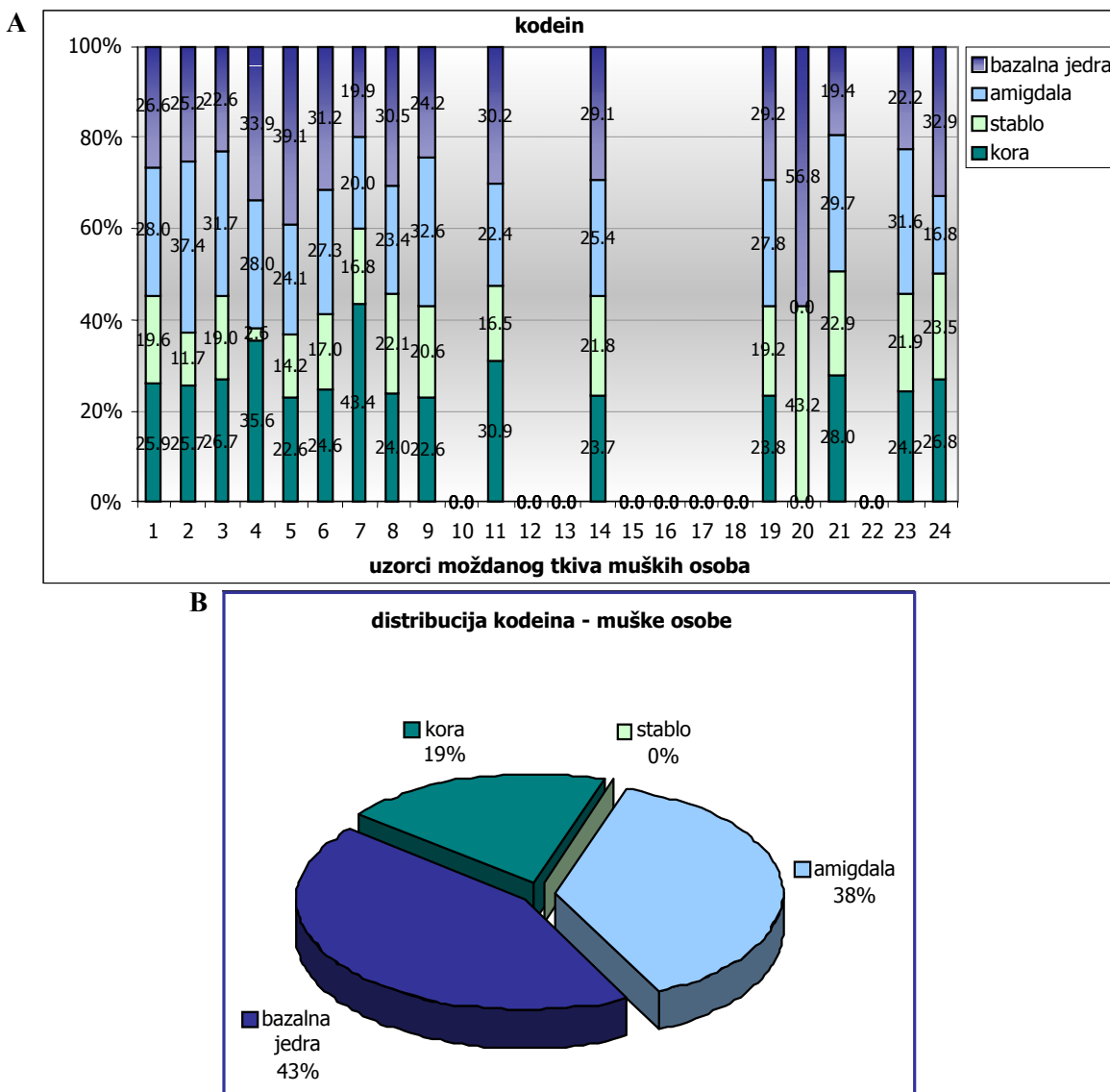
- 0 - 43,4 % u moždanoj kori (uzorci 20 i 7),
- 2,6 - 43,2 % u moždanom stablu (uzorci 4 i 20),
- 0 - 37,4 % u amigdali (uzorci 20 i 2) i
- 19,4 - 56,8 % u bazalnim jedrima (uzorci 21 i 20).

Od ukupno 24, kodein je identifikovan u 16 uzoraka, za koje su pojedinačno izdvojeni delovi moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću kodeina:

- bazalna jedra - 7 uzoraka (5, 6, 8, 14, 19, 20 i 24),
- amigdala - 6 uzoraka (1, 2, 3, 9, 21 i 23) i
- moždana kora - 3 uzorka (4, 7 i 11),

pri čemu ni u jednom uzorku nije određen najveći sadržaj kodeina u moždanom stablu.

Navedeni podaci ukazuju na distribuciju kodeina, odnosno njegovu najveću procentualnu zastupljenost u bazalnim jedrima (43 %) i amigdali (38 %), a najmanju u moždanom stablu (0 %), dok je u moždanoj kori njegova zastupljenost 19 % kod muških osoba (slika 4.10. B.).



Slika 4.10. (A) Procentualni sadržaj kodeina u delovima moždanog tkiva muških osoba
(B) Distribucija kodeina u moždanom tkivu muških osoba

Morfin

Dobijeni rezultati ukazuju da procentualni sadržaj morfina u delovima moždanog tkiva muških osoba iznosi (slika 4.11. A):

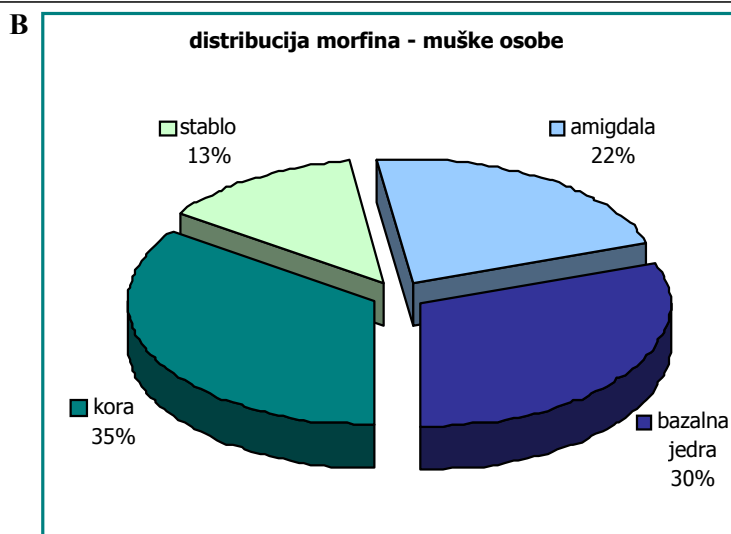
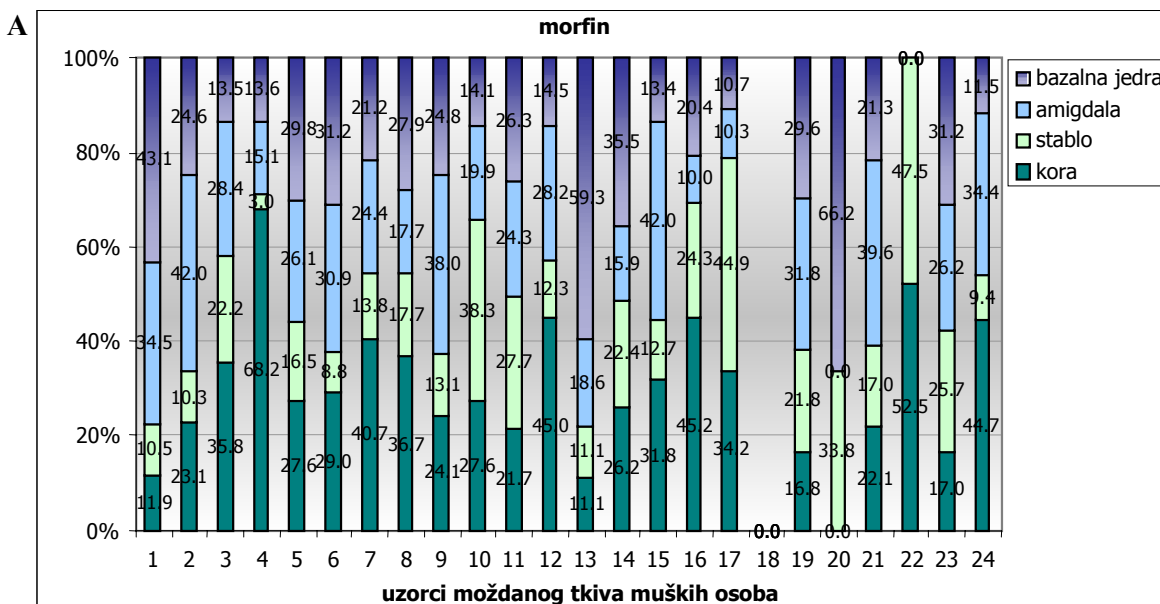
- 0 - 68,2 % u moždanoj kori (uzorci 20 i 4),
- 3,0 - 47,5 % u moždanom stablu (uzorci 4 i 22),
- 0 - 42,0 % u amigdali (uzorci 20,22 i 2, 15) i
- 0 - 66,2 % u bazalnim jedrima (uzorci 22 i 20).

Od ukupno 24, morfin je identifikovan u 23 uzorka, za koje su pojedinačno izdvojeni delovi moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću morfina:

- moždana kora - 8 uzoraka (3, 4, 7, 8, 12, 16, 22 i 24),
- bazalna jedra - 7 uzoraka (1, 5, 6, 13, 14,20 i 23),

- amigdala - 5 uzoraka (2, 9, 15, 19 i 21) i
- moždano stablo - 3 uzorka (10, 11 i 17).

Navedeni podaci ukazuju na distribuciju morfina, odnosno njegovu najveću procentualnu zastupljenost u moždanoj kori (35 %) i bazalnim jedrima (30 %), a najmanju u moždanom stablu (13 %), dok je u amigдали njegova zastupljenost 22 % kod muških osoba (slika 4.11. B.).



Slika 4.11. (A) Procentualni sadržaj morfina u delovima moždanog tkiva muških osoba
(B) Distribucija morfina u moždanom tkivu muških osoba

Acetilkodein

Na osnovu dobijenih rezultata procentualni sadržaj acetilkodeina u delovima moždanog tkiva muških osoba iznosi (slika 4.12. A):

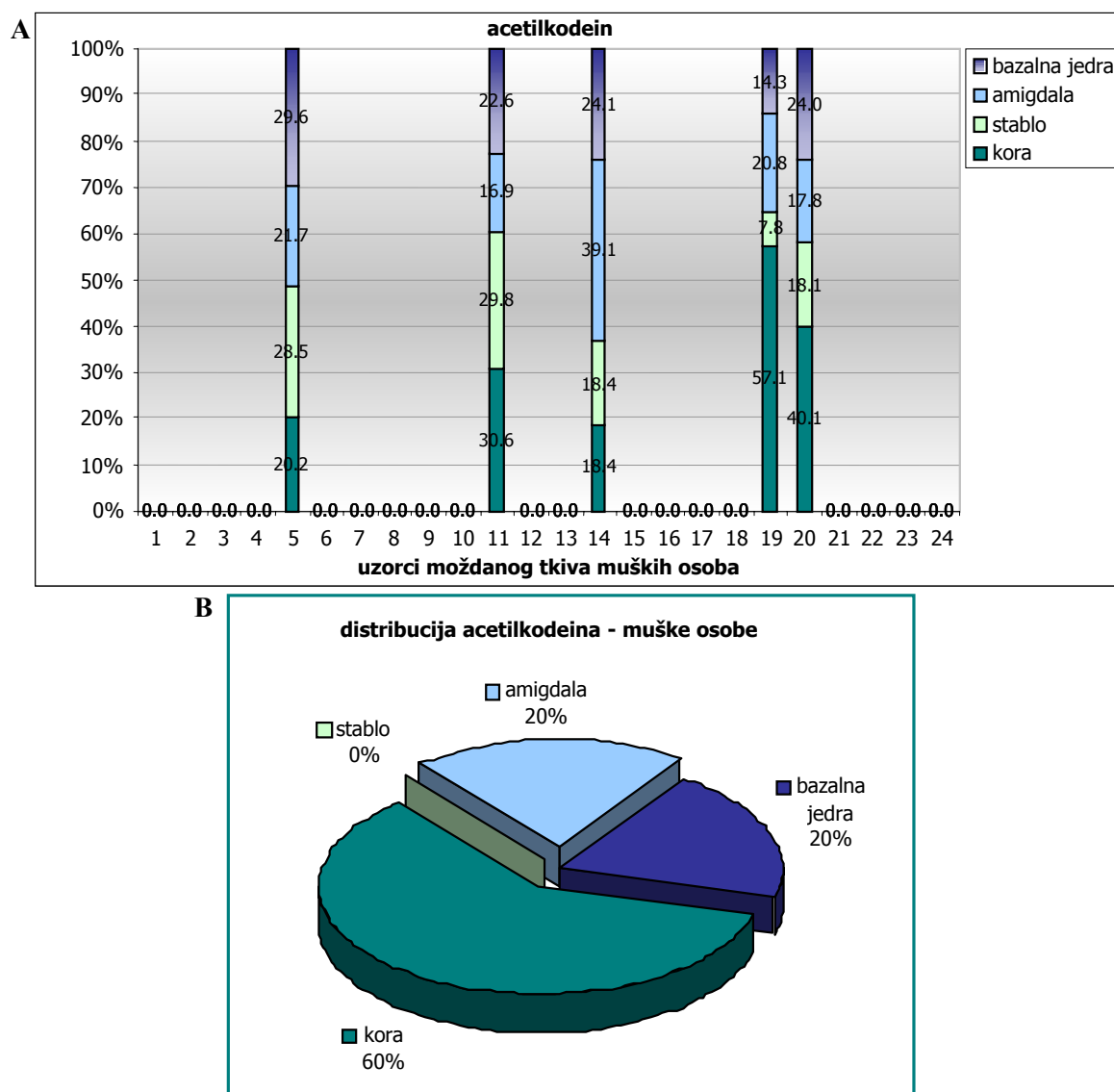
- 18,4 - 57,1 % u moždanoj kori (uzorci 14 i 19),
- 7,8 - 29,8 % u moždanom stablu (uzorci 19 i 11),

- 16,9 - 39,1 % u amigdali (uzorci 11 i 14) i
- 14,3 - 29,6 % u bazalnim jedrima (uzorci 19 i 5).

Od ukupno 24, acetilkodein je identifikovan u 5 uzoraka, za koje su pojedinačno izdvojeni delovi moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću acetilkodeina:

- moždana kora - 3 uzorka (11, 19 i 20),
- amigdala - 1 uzorak (14) i
- bazalna jedra - 1 uzorak (5),

pri čemu ni u jednom uzorku nije određen najveći sadržaj acetilkodeina u moždanom stablu.



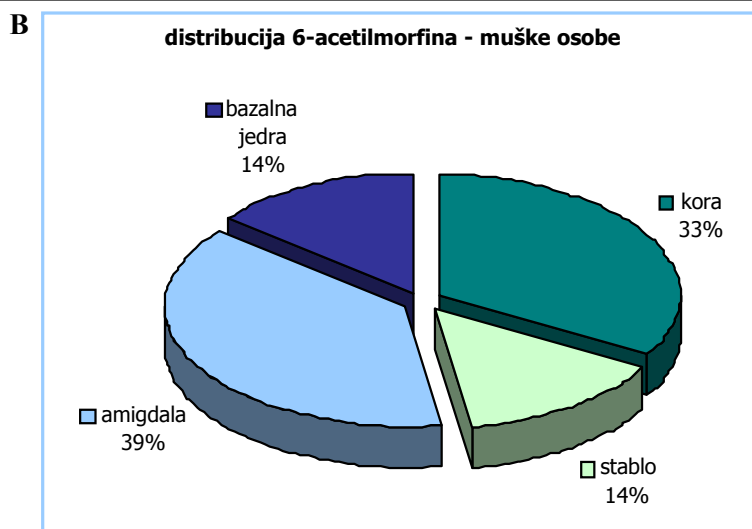
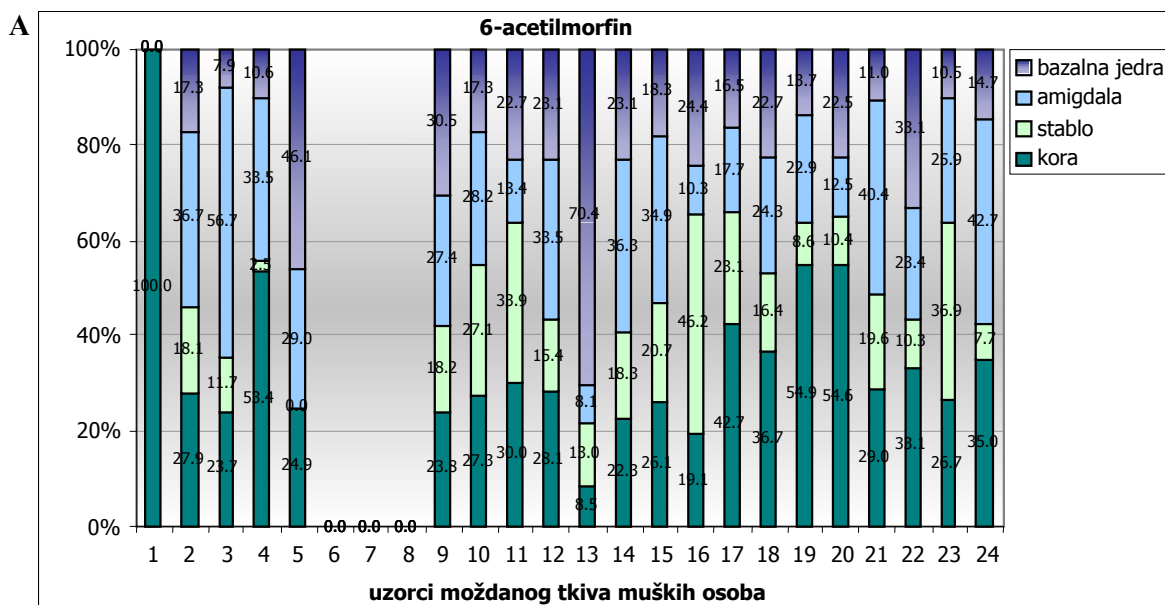
Slika 4.12. (A) Procentualni sadržaj acetilkodeina u delovima moždanog tkiva muških osoba
(B) Distribucija acetilkodeina u moždanom tkivu muških osoba

Imajući u vidu mali broj podataka, navedeni rezultati ukazuju na distribuciju acetilkodeina, odnosno njegovu najveću procentualnu zastupljenost u moždanoj kori (60 %), a najmanju u moždanom stablu (0 %), dok je u amigdali i bazalnim jedrima utvrđena njegova podjednaka zastupljenost od 20 % kod muških osoba (slika 4.12. B.).

6-Acetilmorfin

Iz dobijenih rezultata se može uočiti da procentualni sadržaj 6-acetilmorfina u delovima moždanog tkiva muških osoba iznosi (slika 4.13. A):

- 8,5 - 100 % u moždanoj kori (uzorci 13 i 1),
- 0 - 46,2 % u moždanom stablu (uzorci 1,5 i 16),
- 0 - 56,7 % u amigdali (uzorci 1 i 3) i
- 0 - 70,4 % u bazalnim jedrima (uzorci 1 i 13).



Slika 4.13. (A) Procentualni sadržaj 6-acetilmorfina u delovima moždanog tkiva muških osoba
(B) Distribucija 6-acetilmorfina u moždanom tkivu muških osoba

Od ukupno 24, 6-acetilmorfin je identifikovan u 21 uzorku, za koje su pojedinačno izdvojeni delovi moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću 6-acetilmorfina:

- amigdala - 8 uzoraka (2, 3, 10, 12, 14, 15, 21 i 24),
- moždana kora - 7 uzoraka (1, 4, 17, 18, 19, 20 i 22),
- moždano stablo - 3 uzorka (11, 16 i 23) i
- bazalna jedra - 3 uzorka (5, 9 i 13).

Ako se posmatra distribucija 6-acetilmorfina, može se uočiti njegova najveća procentualna zastupljenost u amigdali (39 %) i moždanoj kori (33 %), a podjednaka zastupljenost u moždanom stablu i bazalnim jedrima od 14 % kod muških osoba (slika 4.13. B.).

Heroin

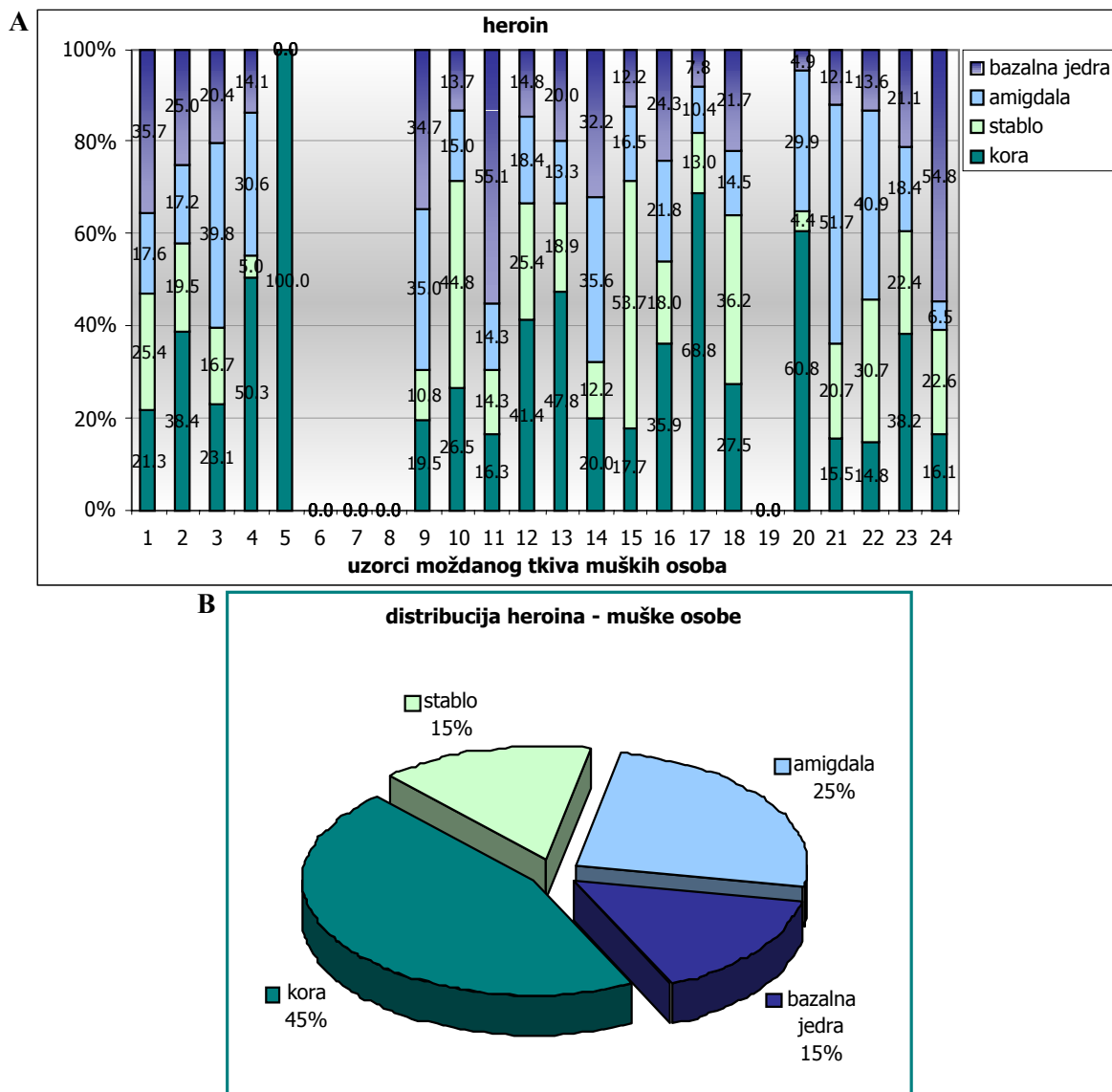
Dobijeni rezultati ukazuju da procentualni sadržaj heroina u delovima moždanog tkiva muških osoba iznosi (slika 4.14. A):

- 14,8 - 100 % u moždanoj kori (uzorci 22 i 5),
- 0 - 53,7 % u moždanom stablu (uzorci 5 i 15),
- 0 - 51,7 % u amigdali (uzorci 5 i 21) i
- 0 - 55,1 % u bazalnim jedrima (uzorci 5 i 11).

Od ukupno 24, heroin je identifikovan u 20 uzoraka, za koje su pojedinačno izdvojeni delovi moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću heroina:

- moždana kora - 9 uzoraka (2, 4, 5, 12, 13, 16, 17, 20 i 23),
- amigdala - 5 uzoraka (3, 9, 14, 21 i 22),
- moždano stablo - 3 uzorka (10, 15 i 18) i
- bazalna jedra - 3 uzorka (1, 11 i 24).

Ako se posmatra distribucija heroina, može se uočiti njegova najveća procentualna zastupljenost u moždanoj kori (45 %) i amigdali (25 %), a podjednaka zastupljenost u moždanom stablu i bazalnim jedrima od 15 % kod muških osoba (slika 4.14. B.).



Slika 4.14. (A) Procentualni sadržaj heroina u delovima moždanog tkiva muških osoba
(B) Distribucija heroina u moždanom tkivu muških osoba

Iz rezultata dobijenih analizom distribucije pojedinačnih opijatnih alkaloida: kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u moždanom tkivu muških osoba, ustanovljeno je da su navedeni opijatni alkaloidi procentualno zastupljeni:

- najviše u **moždanoj kori**: 19 - 60 % i **bazalnim jedrima**: 14 - 43 %,
- najmanje u **moždanom stablu**: 0 - 15 %,
- dok je njihova zastupljenost u **amigdali**: 20 - 39 %.

Navedeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji ukazuju na najveći sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida u moždanoj kori (37 %) i bazalnim jedrima (29 %), a najmanji u moždanom stablu (13 %), dok je u amigdali njihova zastupljenost 21 % kod muških osoba (slika 4.9. B.).

4.3.3. ODREĐIVANJE UKUPNOG SADRŽAJA OPIJATNIH ALKALOIDA KOD ŽENSKIH OSOBA

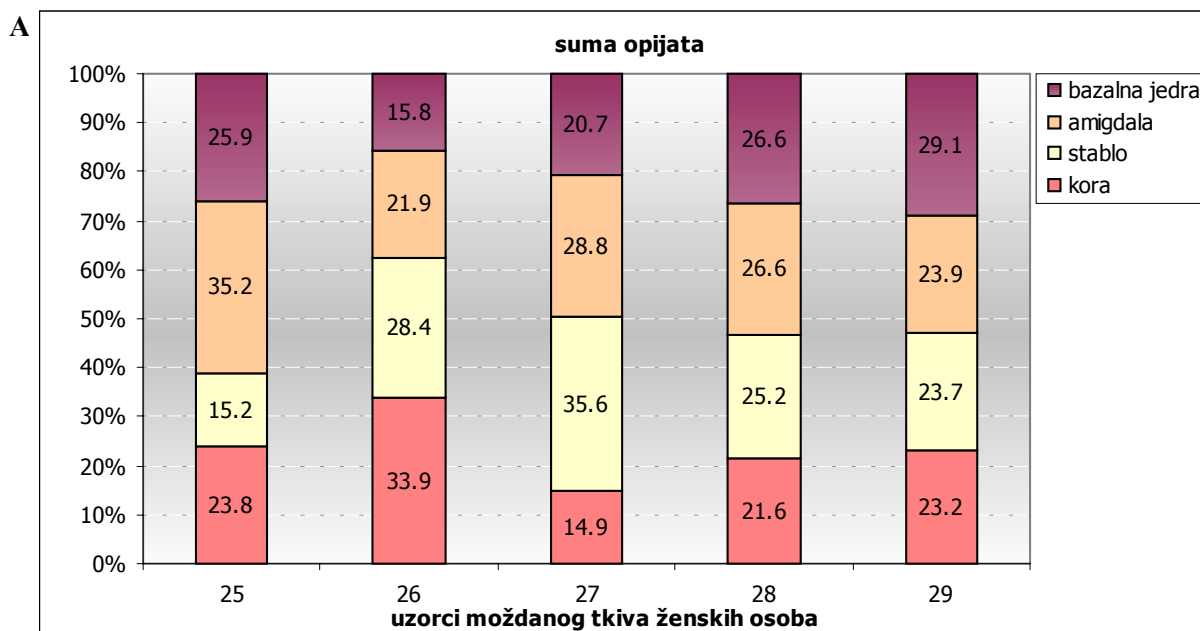
Na slici 4.15. A. je sumarno prikazan procentualni sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida u moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima 5 ženskih osoba (uzorci su obeleženi rednim brojevima od 25 do 29). Na osnovu dobijenih rezultata, procentualni sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva ženskih osoba iznosi:

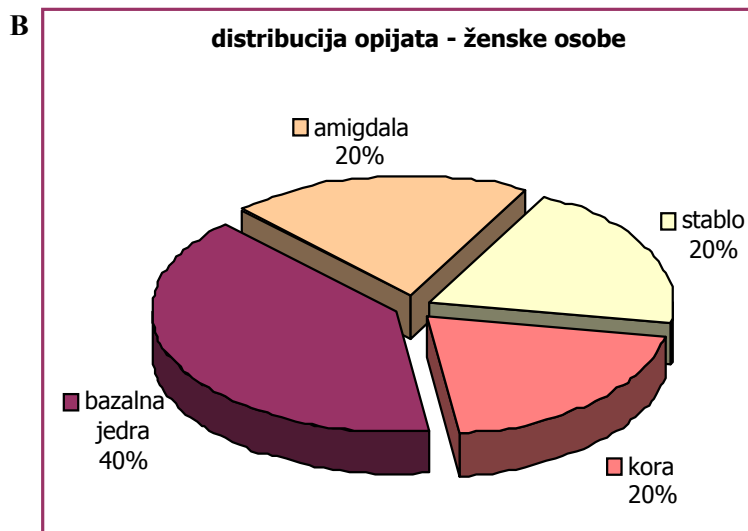
- 14,9 - 33,9 % u moždanoj kori (uzorci 27 i 26),
- 15,2 - 35,6 % u moždanom stablu (uzorci 25 i 27),
- 21,9 - 35,2 % u amigdali (uzorci 26 i 25) i
- 15,8 - 29,1 % u bazalnim jedrima (uzorci 26 i 29).

U cilju ispitivanja distribucije opijatnih alkaloida u moždanom tkivu, odnosno selekcije delova sa najvećim sadržajem opijata, za svaki uzorak je izdvojen deo moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću opijata. Od ukupno 5 analiziranih uzoraka najveći sadržaj ukupnih opijata je određen u:

- bazalnim jedrima - 2 uzorka (28 i 29),
- moždanoj kori - 1 uzorak (26),
- moždanom stablu - 1 uzorak (27) i
- amigdali - 1 uzorak (25).

Imajući u vidu mali broj podataka, navedeni rezultati ukazuju na distribuciju ukupnih opijata, odnosno delove moždanog tkiva gde se može očekivati najveći procenat njihove zastupljenosti, što je prikazano na slici 4.15. B. Najveća procentualna zastupljenost ukupnih opijatnih alkaloida se može uočiti u bazalnim jedrima (40 %), dok je u moždanoj kori, moždanom stablu i amigdali utvrđena njihova podjednaka zastupljenost od 20 % kod ženskih osoba.





Slika 4.15. (A) Procentualni sadržaj opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva ženskih osoba
(B) Distribucija opijata u moždanom tkivu ženskih osoba

4.3.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA POJEDINAČNIH OPIJATNIH ALKALOIDA KOD ŽENSKIH OSOBA

Od ukupno 5 analiziranih uzoraka moždanog tkiva ženskih osoba, morfin i 6-acetilmorfin su identifikovani u svim uzorcima, heroin i kodein u 4 uzorka i acetilkodein u 2 uzorka, što ukazuje, kako je već napomenuto, da su osobe konzumirale drogu - heroin sa najvećim sadržajem 6-acetilmorfina i 3,6-diacetilmorfina u smeši, koji podležu biotransformaciji u morfin, dok je acetilkodein prisutan u manjoj količini i podleže biotransformaciji u kodein.

Sadržaj pojedinačnih opijatnih alkaloida: **kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina** u delovima moždanog tkiva analiziranih uzoraka ženskih osoba je redom iznosio: 0 - 342,9 ng/g; 4,5 - 180,9 ng/g; 0 - 20,3 ng/g; 4,8 - 88,8 ng/g i 0 - 24,5 ng/g.

Procentualni sadržaj kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima ženskih osoba je prikazan na slikama od 4.16. A do 4.20. A., a distribucija navedenih opijatnih alkaloida u pojedinim delovima moždanog tkiva, gde se može očekivati najveći procenat njihove zastupljenosti je prikazana na slikama od 4.16. B do 4.20. B.

Kodein

Iz prikazanih rezultata se može uočiti da procentualni sadržaj kodeina u delovima moždanog tkiva ženskih osoba iznosi (slika 4.16. A):

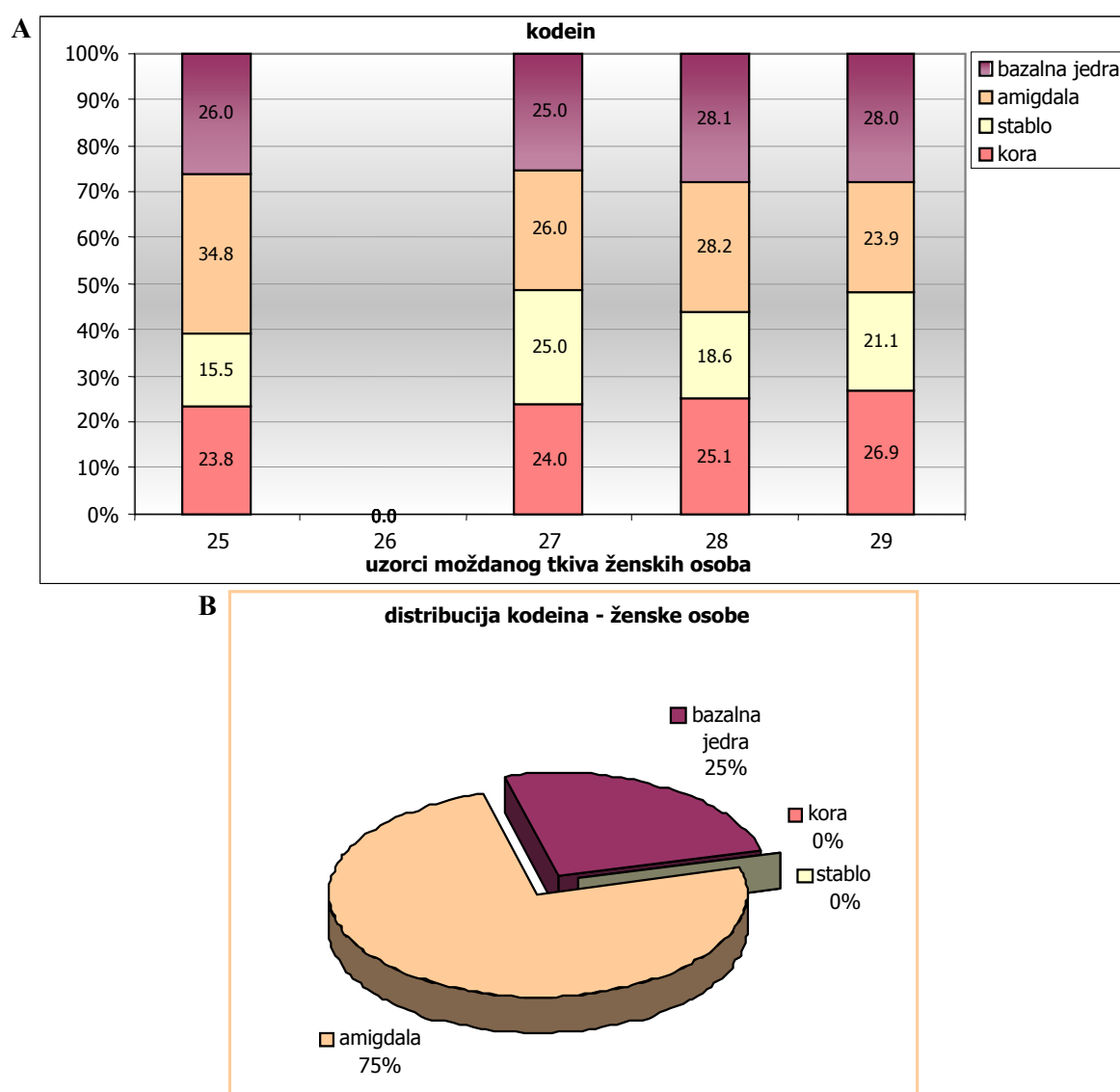
- 23,8 - 26,9 % u moždanoj kori (uzorci 25 i 29),
- 15,5 - 25,0 % u moždanom stablu (uzorci 25 i 27),
- 23,9 - 34,8 % u amigdali (uzorci 29 i 25) i
- 25,0 - 28,1 % u bazalnim jedrima (uzorci 27 i 28).

Od ukupno 5, kodein je identifikovan u 4 uzorka, za koje su pojedinačno izdvojeni delovi moždanog tkiva sa njegovom najvećom procentualnom zastupljenošću:

- amigdala - 3 uzorka (25, 27 i 28) i
- bazalna jedra - 1 uzorak (29),

pri čemu ni u jednom uzorku nije određen najveći sadržaj kodeina u moždanoj kori i moždanom stablu.

Navedeni podaci ukazuju na distribuciju kodeina, odnosno njegovu najveću procentualnu zastupljenost u amigdali (75 %), a najmanju u moždanoj kori i moždanom stablu (0 %), dok je u bazalnim jedrima njegoa zastupljenost 25 % kod ženskih osoba (slika 4.16. B.).

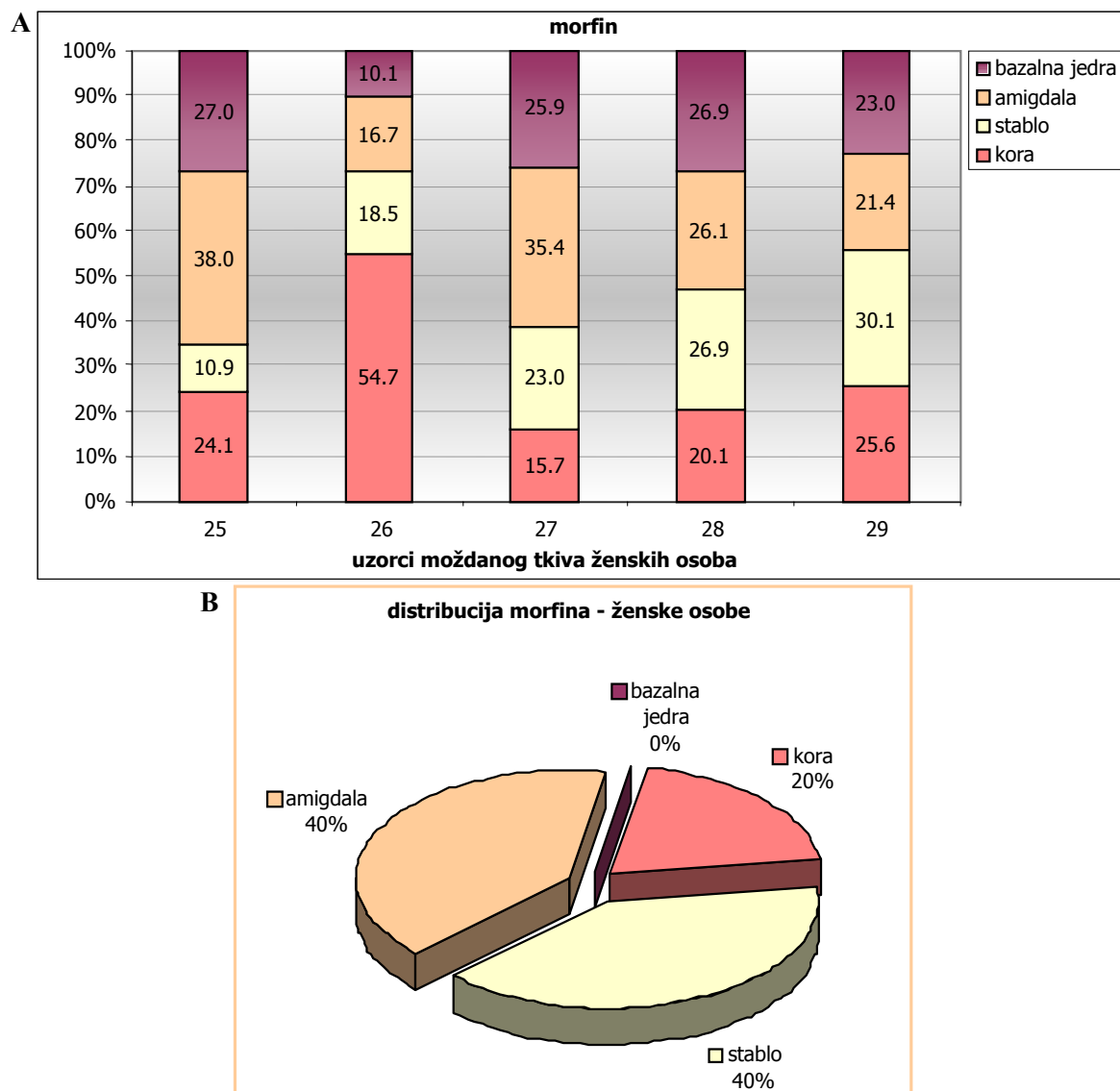


Slika 4.16. (A) Procentualni sadržaj kodeina u delovima moždanog tkiva ženskih osoba
(B) Distribucija kodeina u moždanom tkivu ženskih osoba

Morfin

Na osnovu dobijenih rezultata procentualni sadržaj morfina u delovima moždanog tkiva ženskih osoba iznosi (slika 4.17. A):

- 15,7 - 54,7 % u moždanoj kori (uzorci 27 i 26),
- 10,9 - 30,1 % u moždanom stablu (uzorci 25 i 29),
- 16,7 - 38,0 % u amigdali (uzorci 26 i 25) i
- 10,1 - 27,0 % u bazalnim jedrima (uzorci 26 i 25).



Slika 4.17. (A) Procentualni sadržaj morfina u delovima moždanog tkiva ženskih osoba
(B) Distribucija morfina u moždanom tkivu ženskih osoba

Morfin je identifikovan u svim analiziranim uzorcima, za koje su pojedinačno izdvojeni delovi moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću morfina:

- moždano stablo - 2 uzorka (28 i 29)
- amigdala - 2 uzorka (25 i 27),
- moždana kora - 1 uzorak (26) i

pri čemu ni u jednom uzorku nije određen najveći sadržaj morfina u bazalnim jedrima.

Navedeni podaci ukazuju na distribuciju morfina, odnosno njegovu najveću procentualnu zastupljenost u moždanom stablu i amigdali (40 %), a najmanju u bazalnim jedrima (0 %), dok je u moždanoj kori njegova zastupljenost 20 % kod ženskih osoba (slika 4.17. B.).

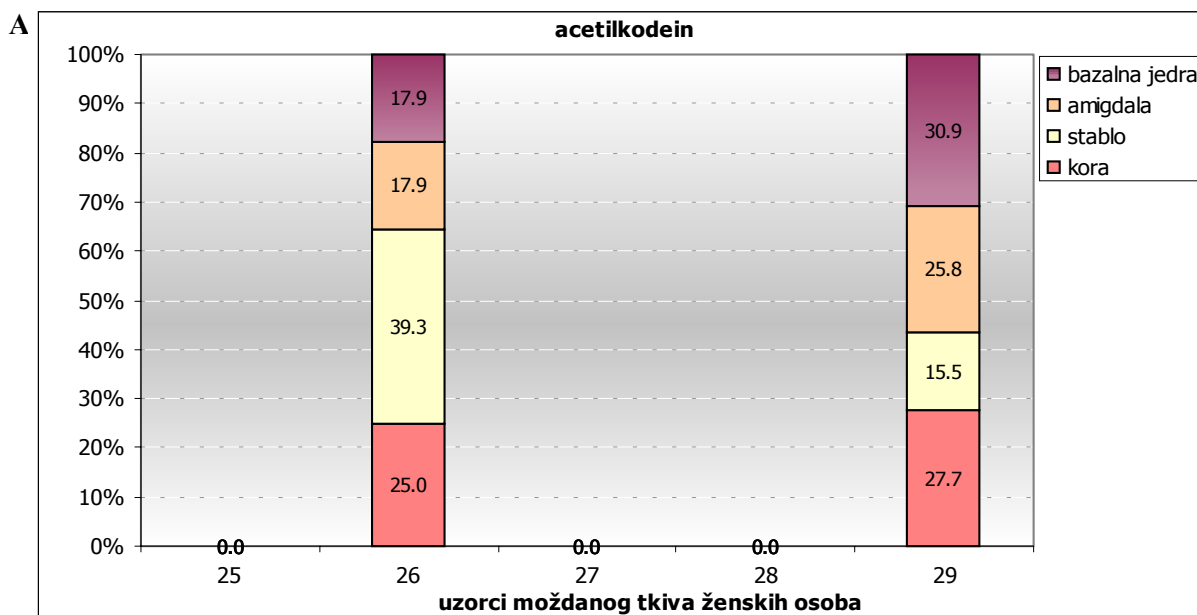
Acetilkodein

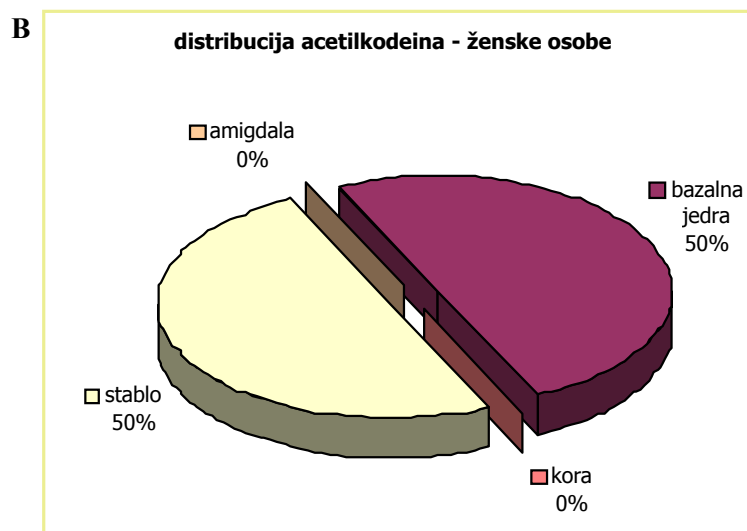
Od ukupno 5, acetilkodein je identifikovan u delovima moždanog tkiva 2 ženske osobe (uzorci 26 i 29), čijom analizom je određen njegov procentualni sadržaj, što je prikazano na slici 4.18. A.

Za 2 analizirana uzorka su izdvojeni delovi moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću acetilkodeina:

- moždano stablo - uzorak 26 i
- bazalna jedra - uzorak 29.

Imajući u vidu mali broj podataka, navedeni rezultati ukazuju na distribuciju acetilkodeina, odnosno njegovu podjednaku najveću procentualnu zastupljenost u moždanom stablu i bazalnim jedrima (50 %), a najmanju u moždanoj kori i amigdali (0 %) kod ženskih osoba (slika 4.18. B.).



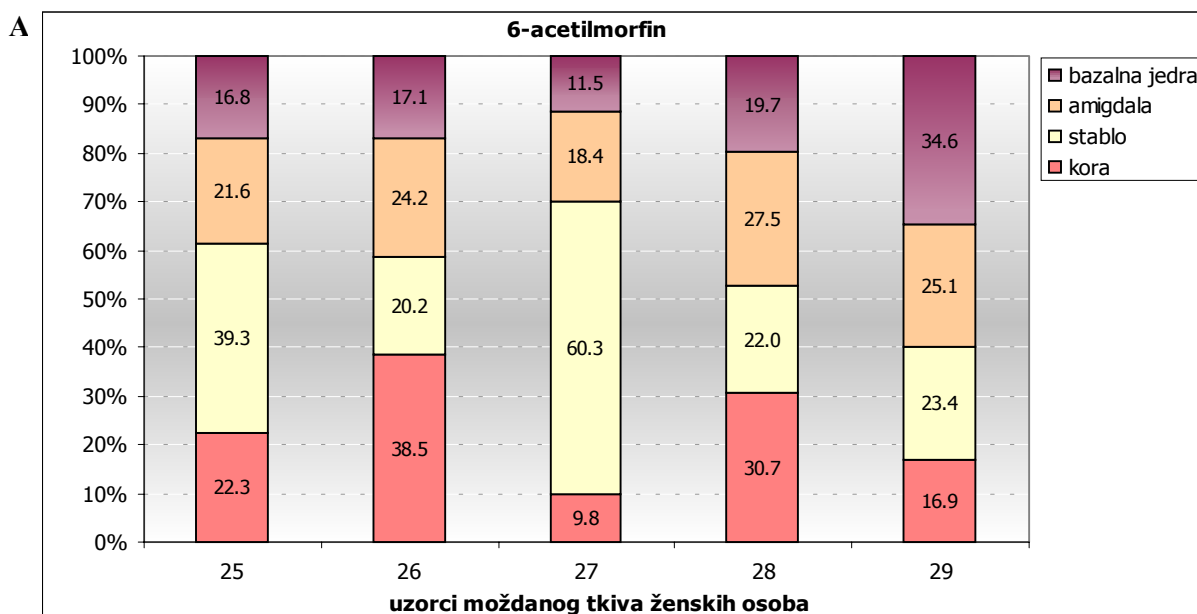


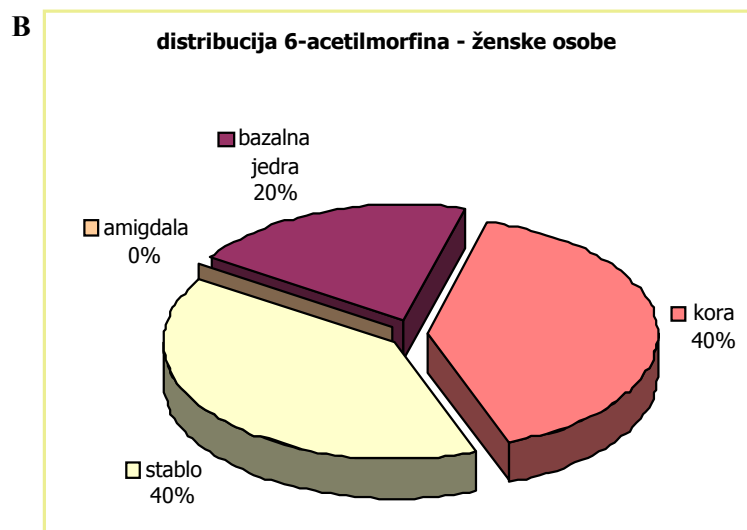
Slika 4.18. (A) Procentualni sadržaj acetilkodeina u delovima moždanog tkiva ženskih osoba
(B) Distribucija acetilkodeina u moždanom tkivu ženskih osoba

6-Acetilmorfin

Iz navedenih rezultata se može uočiti da procentualni sadržaj 6-acetilmorfina u delovima moždanog tkiva ženskih osoba iznosi (slika 4.19. A):

- 9,8 - 38,5 % u moždanoj kori (uzorci 27 i 26),
- 20,2 - 60,3 % u moždanom stablu (uzorci 26 i 27),
- 18,4 - 27,5 % u amigdali (uzorci 27 i 28) i
- 11,5 - 34,6 % u bazalnim jedrima (uzorci 27 i 29).





Slika 4.19. (A) Procentualni sadržaj 6-acetilmorfina u delovima moždanog tkiva ženskih osoba, (B) Distribucija 6-acetilmorfina u moždanom tkivu ženskih osoba

6-Acetilmorfin je identifikovan u svim analiziranim uzorcima, za koje su pojedinačno izdvojeni delovi moždanog tkiva sa najvećom procentualnom zastupljenošću 6-acetilmorfina:

- moždana kora - 2 uzorka (26 i 28),
- moždano stablo - 2 uzorka (25 i 27) i
- bazalna jedra - 1 uzorak (29),

pri čemu ni u jednom uzorku nije određen najveći sadržaj 6-acetilmorfina u amigdali.

Navedeni podaci ukazuju na distribuciju 6-acetilmorfina, odnosno njegovu podjednaku najveću procentualnu zastupljenost u moždanoj kori i moždanom stablu (40 %), a najmanju u amigdali (0 %), dok je njegova zastupljenost u bazalnim jedrima 20 % kod ženskih osoba (slika 4.19. B.).

Heroin

Navedeni rezultati ukazuju da procentualni sadržaj heroina u delovima moždanog tkiva ženskih osoba iznosi (slika 4.20. A):

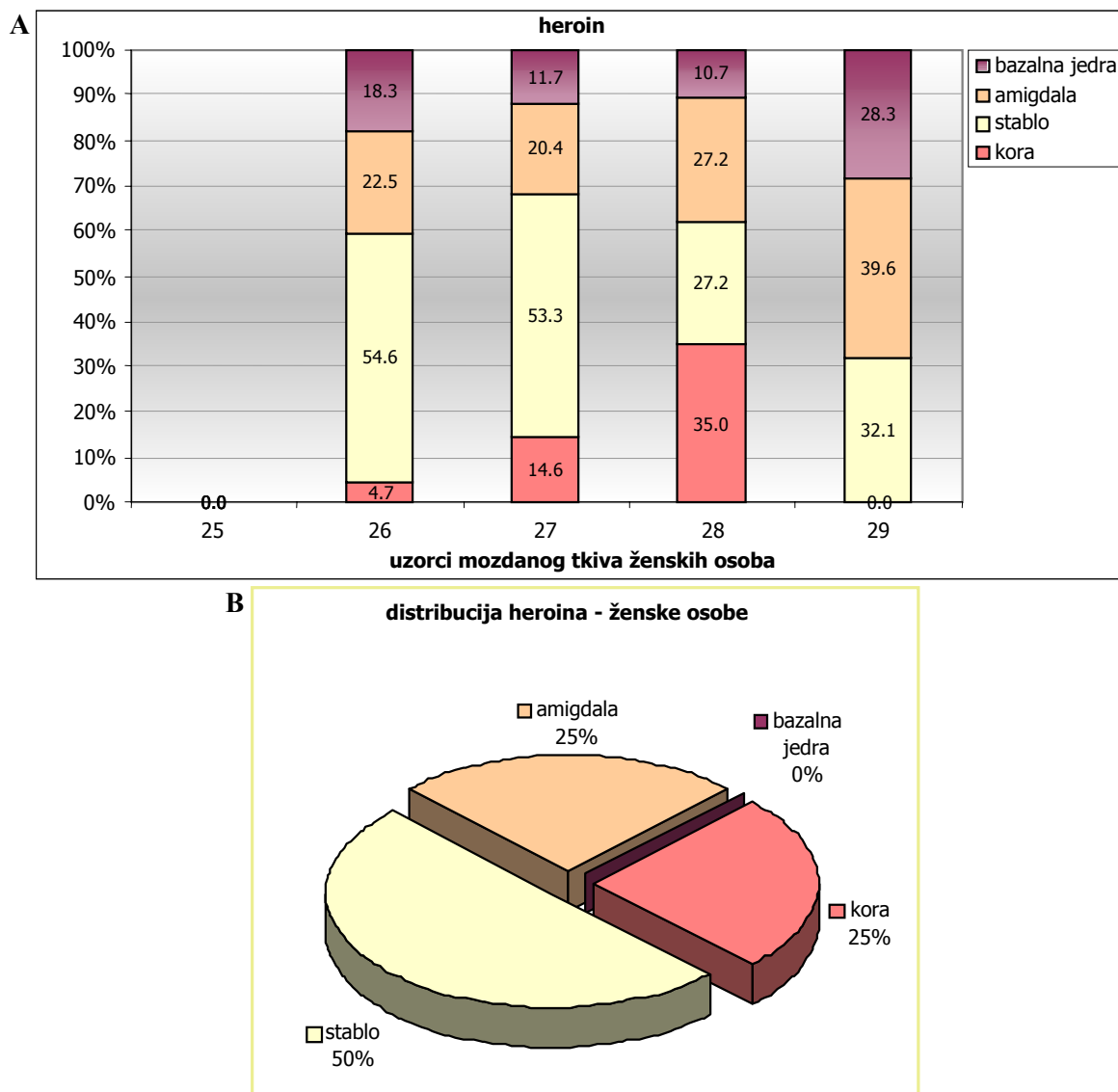
- 0 - 35,0 % u moždanoj kori (uzorci 29 i 28),
- 27,2 - 54,6 % u moždanom stablu (uzorci 28 i 26),
- 20,4 - 39,6 % u amigdali (uzorci 27 i 29) i
- 10,7 - 28,3 % u bazalnim jedrima (uzorci 28 i 29).

Od ukupno 5, heroin je identifikovan u 4 uzorka, za koje su pojedinačno izdvojeni delovi moždanog tkiva sa njegovom najvećom procentualnom zastupljenošću:

- moždano stablo - 2 uzorka (26 i 27),
- moždana kora - 1 uzorak (28) i
- amigdala - 1 uzorak (29),

pri čemu ni u jednom uzorku nije određen najveći sadržaj heroina u bazalnim jedrima.

Navedeni podaci ukazuju na distribuciju heroina, odnosno njegovu najveću procentualnu zastupljenost u moždanom stablu (50 %), a najmanju u bazalnim jedrima (0 %), dok je u moždanoj kori i amigdali njegova zastupljenost 25 % kod ženskih osoba (slika 4.20. B.).



Slika 4.20. (A) Procentualni sadržaj heroina u delovima moždanog tkiva ženskih osoba
(B) Distribucija heroina u moždanom tkivu ženskih osoba

Iz rezultata dobijenih analizom distribucije pojedinačnih opijatnih alkaloida: kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u moždanom tkivu ženskih osoba, ustanovljeno je da su navedeni opijatni alkaloidi procentualno zastupljeni:

- najviše u **amigdali**: 0 - 75 %,
- podjednako u **bazalnim jedrima** i **moždanoj kori**: 0 - 50 %, a
- najmanje u **moždanom stablu**: 0 - 40 %.

Ako se navedeni rezultati uporede sa rezultatima koji ukazuju na najveći sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida u bazalnim jedrima (40 %) i podjednaku zastupljenost u moždanoj kori, moždanom stablu i amigdali (20 %) (slika 4.15. B.), a imajući u vidu znatno manji broj analiziranih uzoraka moždanog tkiva ženskih osoba u odnosu na muške osobe, može se zaključiti da su opijatni alkaloidi procentualno zastupljeni:

- najviše u amigdali, bazalnim jedrima i moždanoj kori, a
- najmanje u moždanom stablu,

što je neophodno potvrditi analizom većeg broja uzoraka moždanog tkiva ženskih osoba.

Na osnovu istraživanja u ovom radu, poređenjem eksperimentalnih rezultata dobijenih na osnovu distribucije svih ispitivanih opijatnih alkaloida u moždanom tkivu muških i ženskih osoba, utvrđeno je da je najveća procentualna zastupljenost opijata kod muških osoba u moždanoj kori (19 - 60 %) i bazalnim jedrima (14 - 43 %), a kod ženskih osoba u amigdali (0 - 75 %) i podjednako u moždanoj kori i bazalnim jedrima (0 - 50 %).

Najmanja procentualna zastupljenost opijata je utvrđena u moždanom stablu kod pripadnika oba pola (0 - 15 % kod pripadnika muškog pola i 0 - 40 % kod pripadnica ženskog pola).

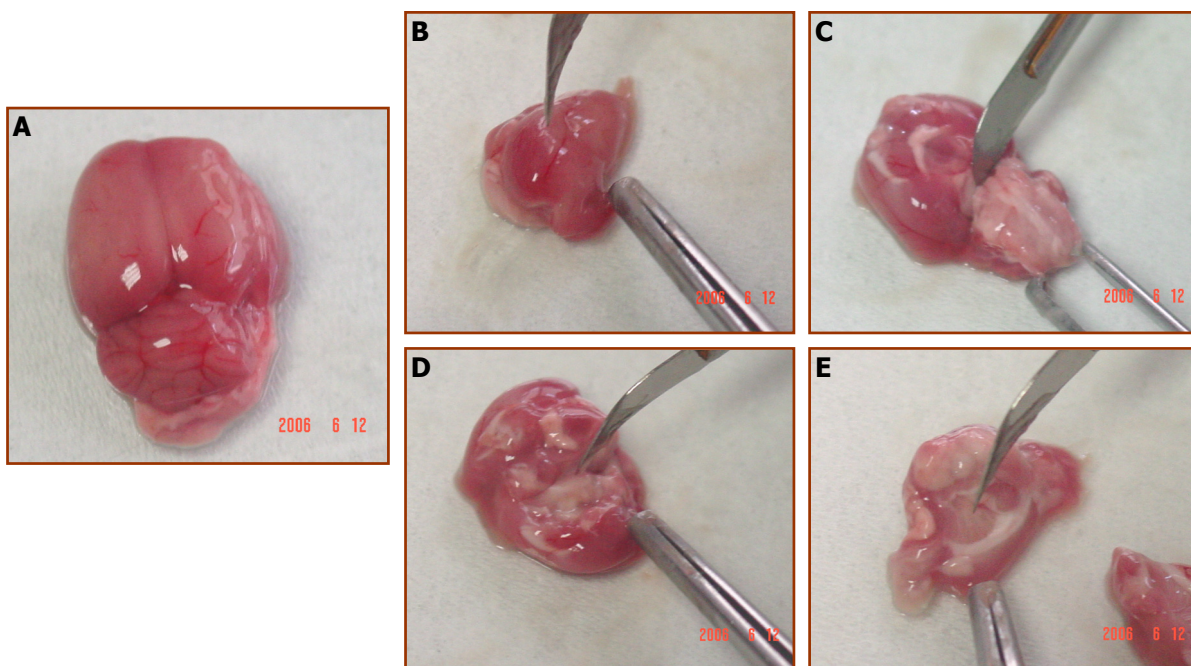
Do sada, ovakav način ispitivanja koji se odnosi na distribuciju opijatnih alkaloida kod pripadnika suprotnih polova, nije poznat u dostupnoj literaturi. Naime, u literaturi (*Hammer, 1984; 1985; Loh i sar., 1988; Hammer, 1990; Limonta i sar., 1991; Hammer i sar., 1994; Fleming i Taylor, 1995; Brown i sar., 1996; Quinones-Jenab i sar., 1997; Eckersell i sar., 1998; Cicero i sar., 2000; Cicero i sar., 2002b*) su opisana samo ispitivanja koja se odnose na osetljivost moždanog tkiva na morfin i heroin, pri čemu su uočene razlike u ponašanju pripadnika suprotnih polova pod uticajem pomenutih opijata, a koje su posledica različitog broja i regionalne distribucije opijatnih receptora ili pak organizacionih efekata polnih hormona.

Dobijeni eksperimentalni rezultati pružaju mogućnost selekcije delova moždanog tkiva kod muških osoba: moždane kore i bazalnih jedara, a kod ženskih osoba: amigdale, a takođe i moždane kore i bazalnih jedara. Ovakav način analize je od značaja jer bi se doprinelo razrešenju uzroka smrti prouzrokovane konzumiranjem heroina.

4.4. ANALIZA BIOLOŠKIH UZORAKA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Ranijim istraživanjima (*Raffa i sar., 1982*) je utvrđeno da pri akutnom, a takođe i dugotrajnom tretiranju eksperimentalnih životinja podjednakom dozom opijata, ne postoji značajna razlika u količini opijatnih alkaloida u moždanom tkivu, pa su stoga u okviru ovog eksperimentalnog rada opijati davani životinjama isključivo akutno. Posebno su istraživanja vršena na mužjacima i ženka pacova.

Imitirajući što vernije način primene opijata od strane intravenskih uživaoca, eksperimentalne životinje su tretirane heroinom (zaplenjenom drogom), koja osim 3,6-diacetilmorfina sadrži i druge opijatne alkaloide (mekonin, hidrokotarnin, tebaol, acetilkodein, 6-acetilmorfin, papaverin, noskapin), kao i aditive (paracetamol, kofein). S obzirom da je tretiranje eksperimentalnih životinja intravenski veoma komplikovano, a da bi se postigla brza resorpcija i distribucija, heroin je davan intraperitonealno insulinskim špricom zapremine 1 ml.



Slika 4.21. (A) Ceo mozak i delovi moždanog tkiva: (B) moždana kora; (C) moždano stablo; (D) amigdala i (E) bazalna jedra eksperimentalne životinje (mužjaka pacova)

U cilju ispitivanja distribucije opijatnih alkaloida u moždanom tkivu, istraživanja su vršena u različitim vremenskim periodima (5, 15, 45 i 120 minuta) nakon tretiranja životinja heroinom, određivan je sadržaj kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u uzorcima moždane kore, moždanog stabla, amigdale i bazalnih jedara, mužjaka i ženki pacova.

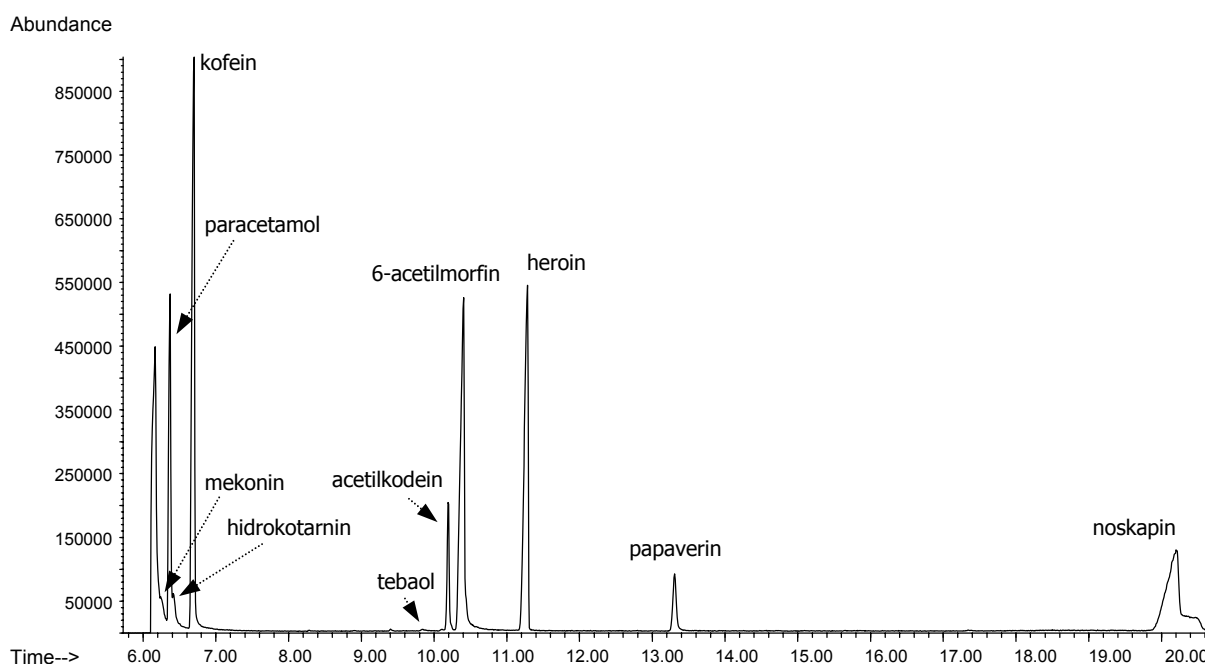
Na slikama 4.21. A, B, C, D i E je prikazan način izolovanja pojedinih delova moždanog tkiva životinja, koji su podvrgnuti ispitivanjima.

Sadržaj navedenih opijatnih alkaloida je određivan i u uzorcima krvi životinja. Takođe, u ovom radu je ispitivana aktivnost enzima oksidativnog stresa (katalaze, glutation-peroksidaze, peroksidaze, ksantin-oksidaze), ispitivan je intenzitet lipidne peroksidacije, određivan sadržaj glutaciona i ukupnih proteina u jetri eksperimentalnih životinja.

4.4.1. ANALIZA HEROINA KOJIM SU TRETIRANE EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

Kvalitativnom GC-MS analizom je utvrđeno da heroin - zaplenjena droga sadrži smešu opijatnih alkaloida: mekonin, hidrokotarnin, tebaol, acetilkodein, 6-acetilmorfin, 3,6-diacetilmorfin, papaverin, noskapin i aditive paracetamol i kofein. Gasni hromatogram takvog analiziranog uzorka je prikazan na slici 4.22.

Kvantitativnom GC-MS analizom je utvrđeno da analizirani uzorak sadrži 18 % smeše 3,6-diacetilmorfina (8,65 %) i 6-acetilmorfina (9,35 %). Na osnovu sadržaja navedenih, najzastupljenijih psihoaktivnih opijatnih alkaloida u smeši, izračunata je željena doza heroina kojim su tretirane eksperimentalne životinje.



Slika 4.22. GC-MS (SCAN) hromatogram heroina - zaplenjene droge

4.4.2. PRELIMINARNA ISTRAŽIVANJA NA EKSPERIMENTALNIM ŽIVOTINJAMA

Imajući u vidu eksperimentalne rezultate ranijih istraživanja (*Salem i Hope, 1997; Erdtmann-Vourliotis i sar., 1998*), u ovom radu su najpre vršeni pilot ogledi u kojima su

eksperimentalnim životinjama (5 mužjaka pacova) davane visoke pojedinačne doze od 100 i 50 mg/kg pripremljenog rastvora heroina. Utvrđeno je da navedene doze prouzrokuju smrt u toku 15 - 30 minuta, usled izražene depresije disanja. Iz tog razloga je u svim ogledima, eksperimentalnim životinjama davana doza od 25 mg/kg (računato na sadržaj 3,6-diacetilmorfina i 6-acetilmorfina u smeši).

Vodeći se ranijim istraživanjima (*Sawyer i Forney, 1988; Bhargava i sar., 1992*), u ovom radu je preliminarnim ispitivanjima utvrđeno da optimalni vremenski period za sve eksperimente iznosi 120 minuta, stoga su biološki uzorci eksperimentalnih životinja uzimani za analizu u okviru navedenog vremenskog perioda, tj. nakon 5, 15, 45 i 120 minuta.

U toku eksperimenta, sve životinje su se podjednako ponašale nakon tretiranja dozom heroina od 25 mg/kg, mirovale su u uglu kaveza, pri čemu je utvrđeno da je 67 % mužjaka i 100 % ženki preživelo navedenu dozu heroina u toku 120 minuta.

4.5. KVANTITATIVNA GC/MS ANALIZA BIOLOŠKIH UZORAKA MUŽJAKA PACOVA

Nakon preliminarnih istraživanja, utvrđivanja optimalne doze heroina za tretiranje životinja i trajanja eksperimenta, pristupilo se određivanju sadržaja opijatnih alkaloida u uzorcima moždanog tkiva i krvi mužjaka pacova.

4.5.1. ANALIZA ISPITIVANIH OPIJATA U MOŽDANOM TKIVU

Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida: kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina, u uzorcima delova moždanog tkiva: moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima mužjaka pacova je određivan u toku 120 minuta i prikazan je u tabeli 4.1.

Dobijeni podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (standardna devijacija) za 5 eksperimentalnih životinja u grupi ($n=5$), a statistička značajnost razlika u odnosu na kontrolnu grupu je određena Studentovim t - testom, pri čemu je statistička značajnost prihvaćena za $p<0,05$.

Tabela 4.1. Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida u moždanom tkivu mužjaka pacova

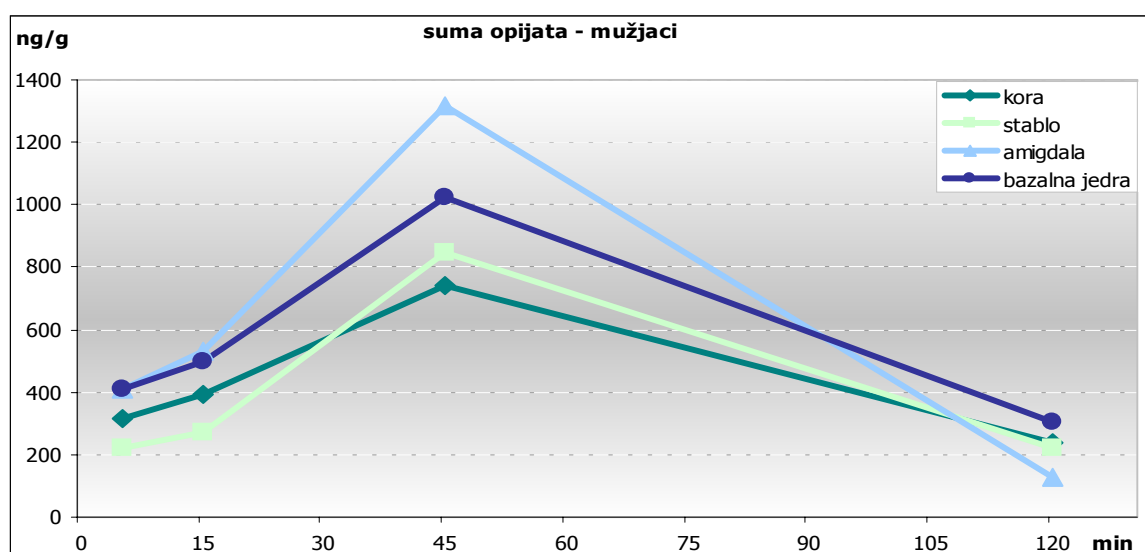
Uzorak	Vreme (min)	Koncentracija opijata (ng/g)					
		kodein	morfin	acetilkodein	6-acetilmorfin	heroin	suma opijata
kora	5	136,4 \pm 86,6	92,0 \pm 21,8	72,0 \pm 11,1**	7,9 \pm 2,3	5,0 \pm 2,5	313,2 \pm 30,5**
	15	211,3 \pm 16,7**	20,6 \pm 2,4*	83,5 \pm 12,0*	70,9 \pm 27,7	4,2 \pm 1,6*	390,5 \pm 18,1**
	45	383,1 \pm 42,2**	66,8 \pm 19,2	123,8 \pm 70,0*	163,9 \pm 52,7	4,4 \pm 1,4*	741,9 \pm 53,1**
	120	133,8 \pm 43,1*	43,4 \pm 15,8*	21,1 \pm 8,4*	35,3 \pm 14,8	2,3 \pm 1,9*	235,8 \pm 31,3*
stablo	5	113,8 \pm 69,0*	29,8 \pm 7,6*	57,3 \pm 18,1*	14,0 \pm 3,5*	5,1 \pm 3,1*	220,0 \pm 24,3*
	15	130,5 \pm 72,0*	6,0 \pm 3,3	113,0 \pm 40,1*	18,7 \pm 6,8*	4,0 \pm 1,8*	272,2 \pm 25,6**
	45	382,4 \pm 48,9**	119,7 \pm 29,8	115,9 \pm 56,6*	220,5 \pm 78,6	10,0 \pm 3,8*	848,5 \pm 96,3*
	120	129,7 \pm 45,6	38,8 \pm 12,2	18,3 \pm 3,1**	30,4 \pm 12,4	3,8 \pm 1,7	220,9 \pm 26,6*
amigdala	5	151,8 \pm 76,6*	67,8 \pm 20,4	87,2 \pm 19,2**	91,7 \pm 36,9*	11,3 \pm 5,0	409,8 \pm 44,6**
	15	203,4 \pm 72,3**	32,4 \pm 17,0	198,7 \pm 74,0**	89,6 \pm 22,0	8,6 \pm 2,3	532,7 \pm 51,5**
	45	581,3 \pm 120,8**	162,0 \pm 56,0*	245,4 \pm 61,0*	319,5 \pm 87,0*	10,5 \pm 3,8**	1318,7 \pm 121,5*
	120	78,9 \pm 12,6*	2,9 \pm 1,0	22,4 \pm 9,5**	14,4 \pm 5,3*	6,2 \pm 1,8	124,8 \pm 14,5*
bazalna jedra	5	184,7 \pm 42,3	52,5 \pm 11,1*	92,7 \pm 30,1**	71,1 \pm 32,8	9,5 \pm 5,1*	410,5 \pm 46,3**
	15	218,1 \pm 87,6**	31,1 \pm 15,1*	139,9 \pm 59,8*	99,8 \pm 19,3*	8,2 \pm 4,3*	497,0 \pm 37,2**
	45	516,3 \pm 76,6**	189,2 \pm 54,0*	152,8 \pm 80,0*	146,3 \pm 60,8*	20,8 \pm 8,2*	1025,3 \pm 80,7**
	120	143,2 \pm 15,0**	129,5 \pm 20,4	21,4 \pm 6,1*	6,2 \pm 2,8*	4,1 \pm 1,8	304,4 \pm 42,5*

($n=5$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$)

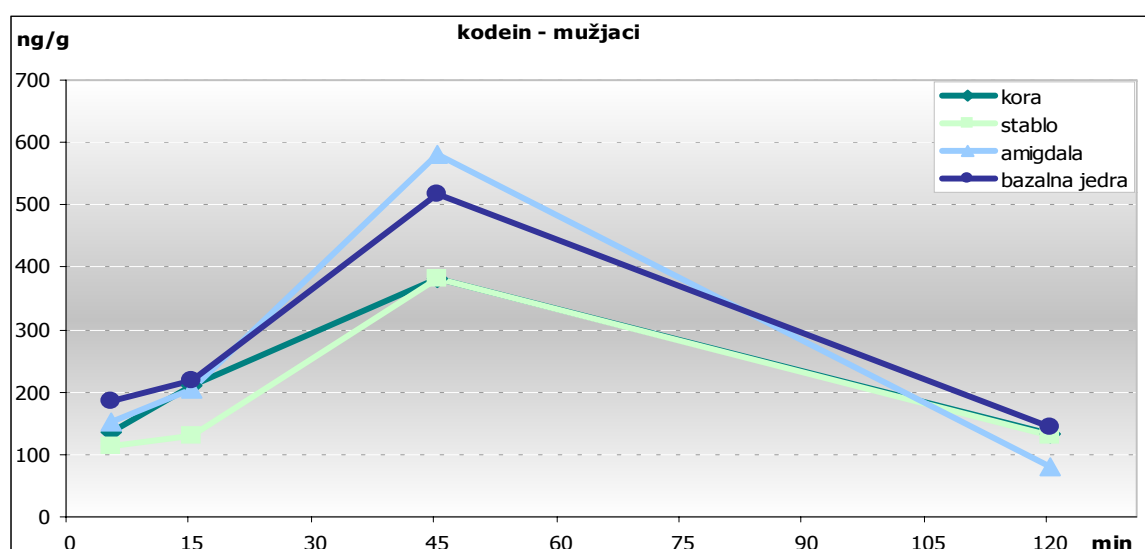
Sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida u uzorcima delova moždanog tkiva je prikazan na slici 4.23.

Iz navedenih rezultata se može uočiti nagli porast koncentracije opijatnih alkaloida u svim delovima moždanog tkiva nakon 45 minuta od tretiranja životinja heroinom, pri čemu su najveće koncentracije opijata određene u amigdali ($1318,7 \pm 121,5$ ng/g) i bazalnim jedrima ($1025,3 \pm 80,7$ ng/g), a najmanje u moždanoj kori ($741,9 \pm 53,1$ ng/g).

Nakon 120 minuta se može uočiti nagli pad koncentracije opijata u svim delovima moždanog tkiva, pri čemu su najveće koncentracije određene u bazalnim jedrima ($304,4 \pm 42,5$ ng/g) i moždanoj kori ($235,8 \pm 31,3$ ng/g), a najmanje u amigdali ($124,8 \pm 14,5$ ng/g). Navedene vrednosti koncentracija ukupnih opijatnih alkaloida su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



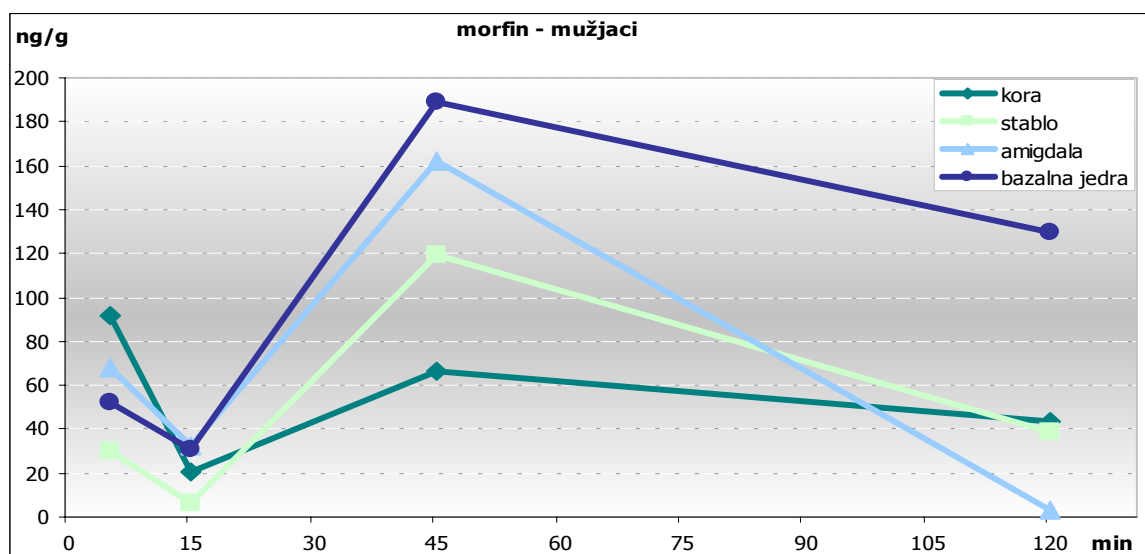
Slika 4.23. Sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva muškaka pacova



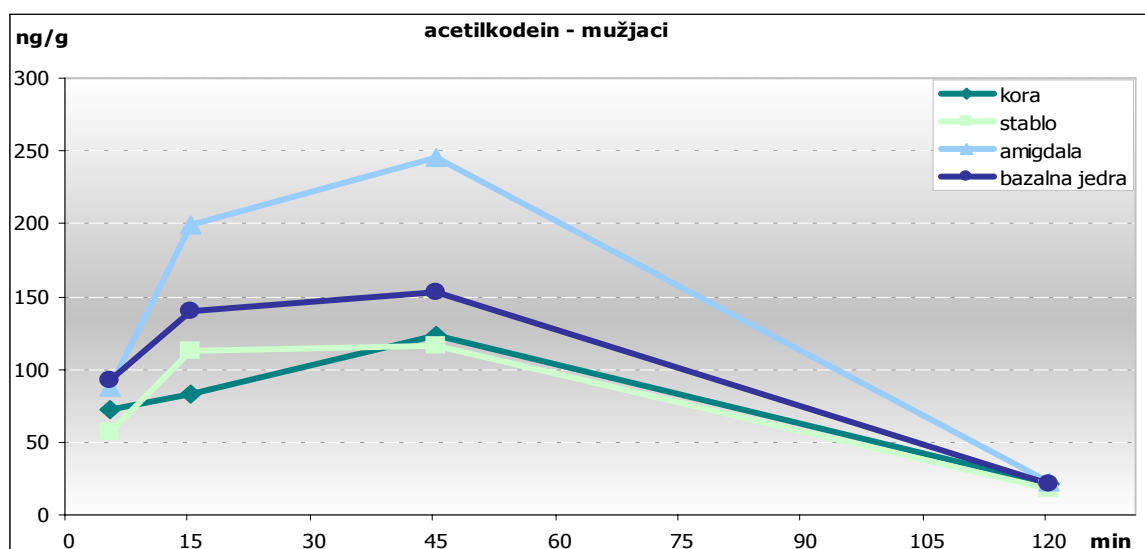
Slika 4.24. Sadržaj kodeina u delovima moždanog tkiva muškaka pacova

Sadržaj pojedinačnih opijatnih alkaloida: **kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina** u delovima moždanog tkiva mužjaka pacova u toku 120 minuta, je prikazan na slikama od 4.24. do 4.28.

Najveći sadržaj **kodeina** je određen nakon 45 minuta u amigdali ($581,3 \pm 120,8$ ng/g) i bazalnim jedrima ($516,3 \pm 76,6$ ng/g), a nakon 120 minuta se može uočiti nagli pad koncentracije kodeina u svim delovima moždanog tkiva, pri čemu je najveći sadržaj određen u bazalnim jedrima ($143,2 \pm 15,0$ ng/g) i moždanoj kori ($133,8 \pm 43,1$ ng/g), a najmanji u amigdali ($78,9 \pm 12,6$ ng/g) (slika 4.24.). Navedene vrednosti koncentracija kodeina su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



Slika 4.25. Sadržaj morfina u delovima moždanog tkiva mužjaka pacova



Slika 4.26. Sadržaj acetilkodeina u delovima moždanog tkiva mužjaka pacova

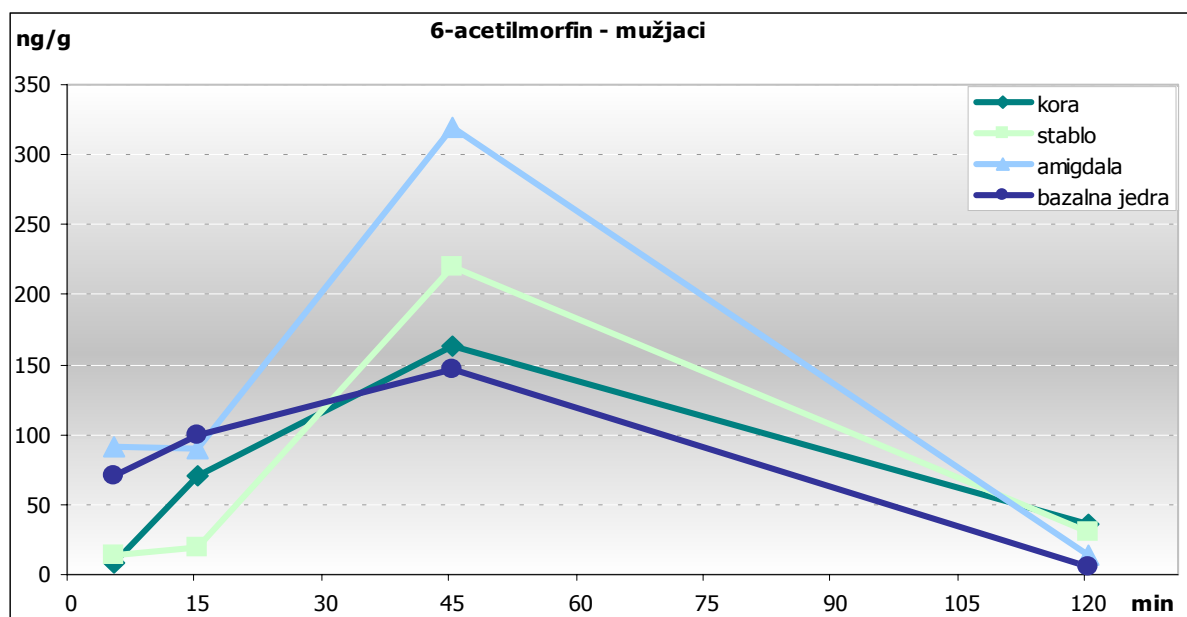
Iz navedenih rezultata se može uočiti naglo povećanje koncentracije **morfina** nakon 45 minuta, pri čemu je najveći sadržaj određen u bazalnim jedrima ($189,2 \pm 54,0$ ng/g) i amigdali ($162,0 \pm 56,0$ ng/g), a vrednosti su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Nakon 120 minuta je uočljivo smanjenje koncentracije morfina, pri čemu su najveće koncentracije određene u bazalnim jedrima ($129,4 \pm 20,4$ ng/g) i moždanoj kori ($43,4 \pm 15,8$ ng/g), a najmanje u amigdali ($2,9 \pm 1,0$ ng/g) (slika 4.25.). Vrednost koncentracije morfina u moždanoj kori je statistički značajna, za razliku od vrednosti koncentracija u bazalnim jedrima i amigdali.

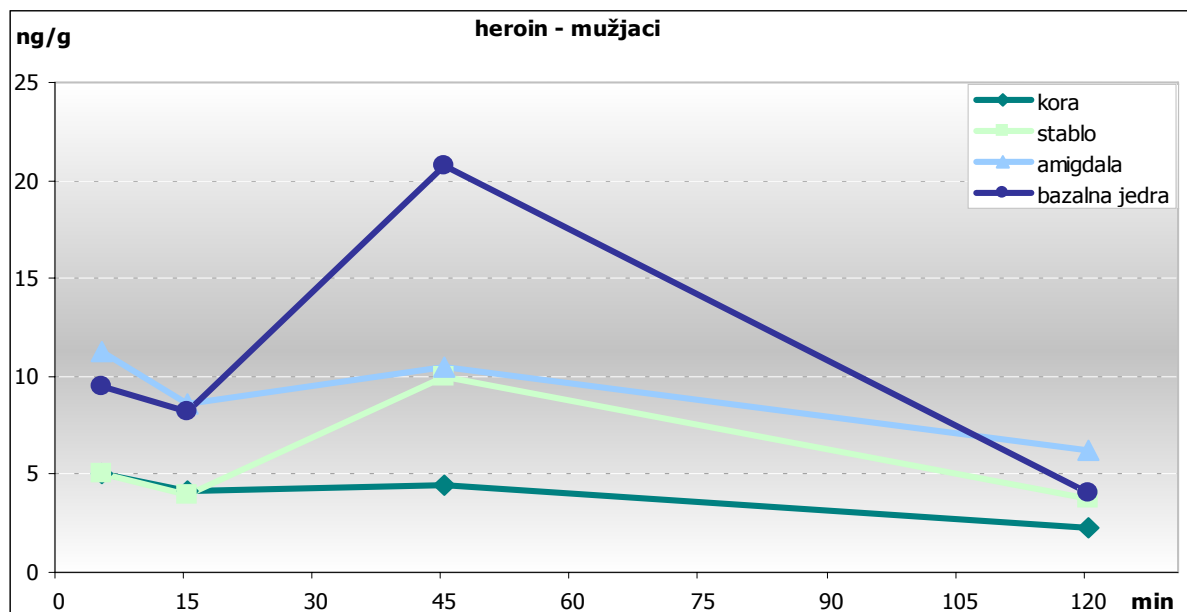
Najveći sadržaj **acetilkodeina** je određen nakon 45 minuta u amigdali ($245,4 \pm 61,0$ ng/g) i bazalnim jedrima ($152,8 \pm 80,0$ ng/g), dok se nakon 120 minuta može uočiti nagli pad koncentracije u svim delovima moždanog tkiva gde su određene približno iste vrednosti acetilkodeina ($18,3 \pm 3,1$ - $22,4 \pm 9,5$ ng/g) (slika 4.26.). Navedene vrednosti koncentracija acetilkodeina su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Nagli porast koncentracije **6-acetilmorfina** je uočljiv nakon 45 minuta u svim delovima moždanog tkiva, pri čemu su najveće vrednosti određene u amigdali ($319,5 \pm 87,0$ ng/g), gde je utvrđena statistička značajnost, i moždanom stablu ($220,5 \pm 78,6$ ng/g), gde nije utvrđena statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Nakon 120 minuta je evidentno smanjenje koncentracije 6-acetilmorfina, pri čemu su najveće koncentracije određene u moždanoj kori ($35,3 \pm 14,8$ ng/g) i moždanom stablu ($30,4 \pm 12,4$ ng/g), a najmanje u bazalnim jedrima ($6,2 \pm 2,8$ ng/g) (slika 4.27.). Vrednost koncentracije 6-acetilmorfina u bazalnim jedrima je statistički značajna, za razliku od vrednosti koncentracija u moždanoj kori i moždanom stablu.



Slika 4.27. Sadržaj 6-acetilmorfina u delovima moždanog tkiva muškara pacova



Slika 4.28. Sadržaj heroina u delovima moždanog tkiva mužjaka pacova

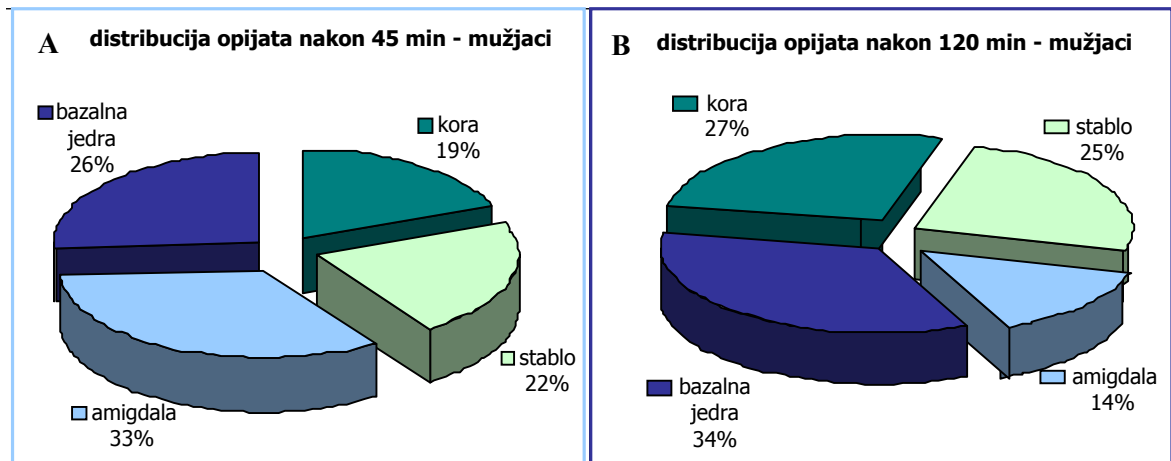
Navedeni rezultati ukazuju na porast koncentracije **heroina** nakon 45 minuta i smanjenje po isteku 120 minuta, pri čemu je u oba vremenska perioda najveći sadržaj određen u bazalnim jedrima ($20,8 \pm 8,2$ ng/g i $4,1 \pm 1,8$ ng/g) i amigdali ($10,5 \pm 3,8$ ng/g i $6,2 \pm 1,8$ ng/g), a najmanji u moždanoj kori ($4,4 \pm 1,4$ ng/g i $2,3 \pm 1,9$ ng/g) (slika 4.28.). Vrednosti koncentracija heroina u bazalnim jedrima, amigdali i moždanoj kori nakon 45 minuta, kao i u moždanoj kori nakon 120 minuta su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja, za razliku od vrednosti koncentracija u bazalnim jedrima i amigdali nakon 120 minuta.

Maksimalne vrednosti koncentracija u delovima moždanog tkiva nakon 45 minuta su iznosile za kodein: $581,3 \pm 120,8$ ng/g (u amigdali; $p < 0,01$), 6-acetilmorfin: $319,5 \pm 87,0$ ng/g (u amigdali; $p < 0,05$), acetilkodein $245,4 \pm 61,0$ ng/g (u amigdali; $p < 0,05$), morfin: $189,2 \pm 54,0$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,05$) i heroin: $20,8 \pm 8,2$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,05$), a za sumu opijata: $1318,7 \pm 121,5$ ng/g (u amigdali; $p < 0,05$) i $1025,3 \pm 80,7$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,01$).

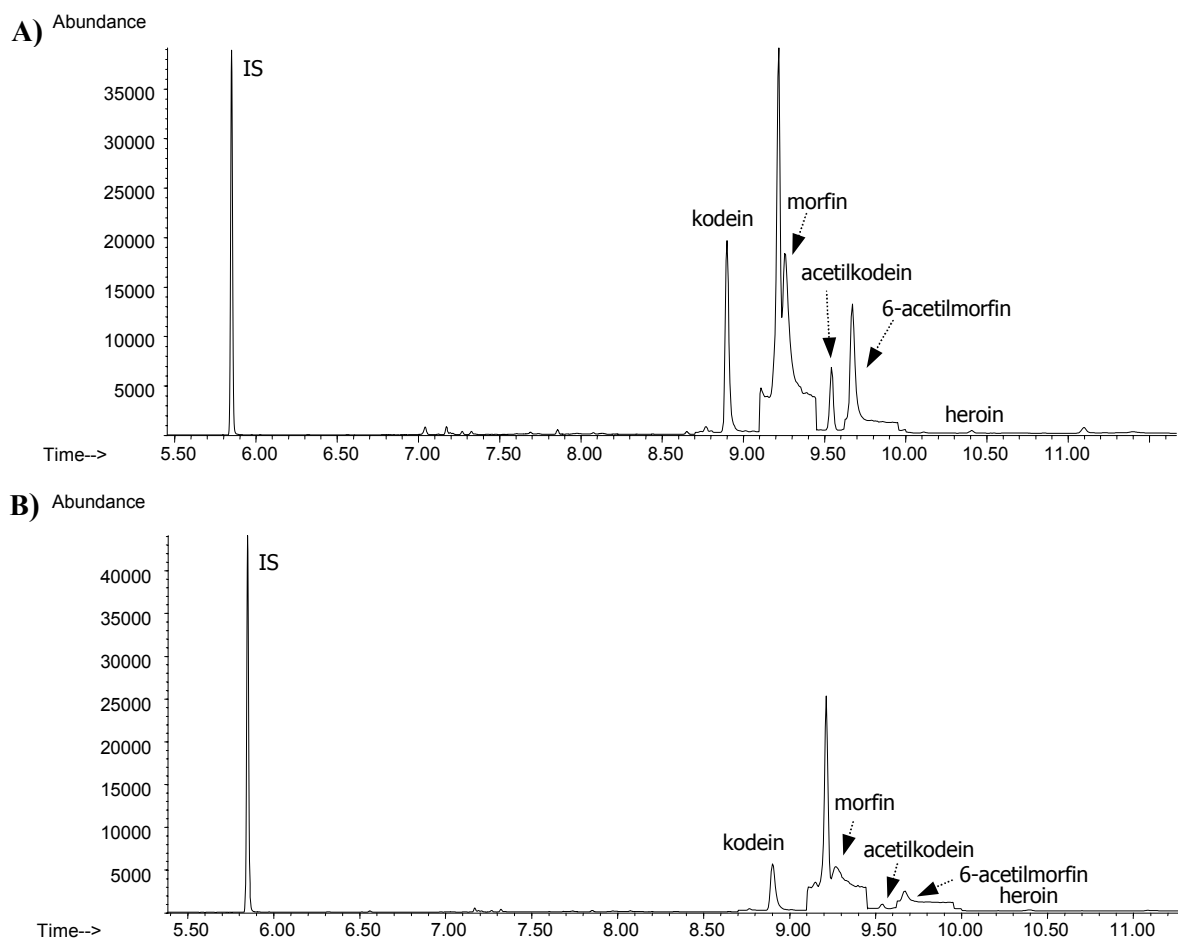
Maksimalne vrednosti koncentracija u delovima moždanog tkiva nakon 120 minuta su iznosile za kodein: $143,2 \pm 15,0$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,01$), morfin: $129,4 \pm 20,4$ ng/g (u bazalnim jedrima), 6-acetilmorfin: $35,3 \pm 14,8$ ng/g (u moždanoj kori), acetilkodein $22,4 \pm 9,5$ ng/g (u amigdali; $p < 0,01$) i heroin: $6,2 \pm 1,8$ ng/g (u amigdali), a za sumu opijata: $304,4 \pm 42,5$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,05$) i $235,8 \pm 31,3$ ng/g (u moždanoj kori; $p < 0,05$).

Rezultati dobijeni analizom distribucije pojedinačnih opijatnih alkaloida u moždanom tkivu mužjaka pacova u različitom vremenskom periodu, su u saglasnosti sa rezultatima koji ukazuju na nagli porast sadržaja ukupnih opijata nakon 45 minuta, sa najvećom procentualnom zastupljenošću u amigdali (33 %) i bazalnim jedrima (26 %) (slika 4.29. A).

Nagli pad sadržaja ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida je utvrđen u svim delovima moždanog tkiva nakon 120 minuta i to sa najvećom procentualnom zastupljenošću u bazalnim jedrima (34 %) i moždanoj kori (27 %) (slika 4.29. B).



Slika 4.29. Distribucija opijata u moždanom tkivu mužjaka pacova nakon (A) 45 min i (B) 120 min



Slika 4.30. Hromatogram GC-MS SIM analize uzorka amigdale mužjaka pacova nakon A) 45 i B) 120 minuta

Kao primer kvantitativne analize delova moždanog tkiva, prikazani su hromatogrami GC-MS SIM analize amigdale mužjaka pacova nakon 45 i 120 minuta, u kojoj su kvantifikovani kodein, morfin, acetilkodein, 6-acetilmorfin i heroin (slike 4.30. A i B).

Na prikazanim hromatogramima se može uočiti smanjenje intenziteta pikova navedenih opijatnih alkaloida nakon 120 minuta u poređenju sa intenzitetom pikova nakon 45 minuta od tretiranja životinja heroinom.

4.5.2. ANALIZA ISPITIVANIH OPIJATA U UZORCIMA KRVI

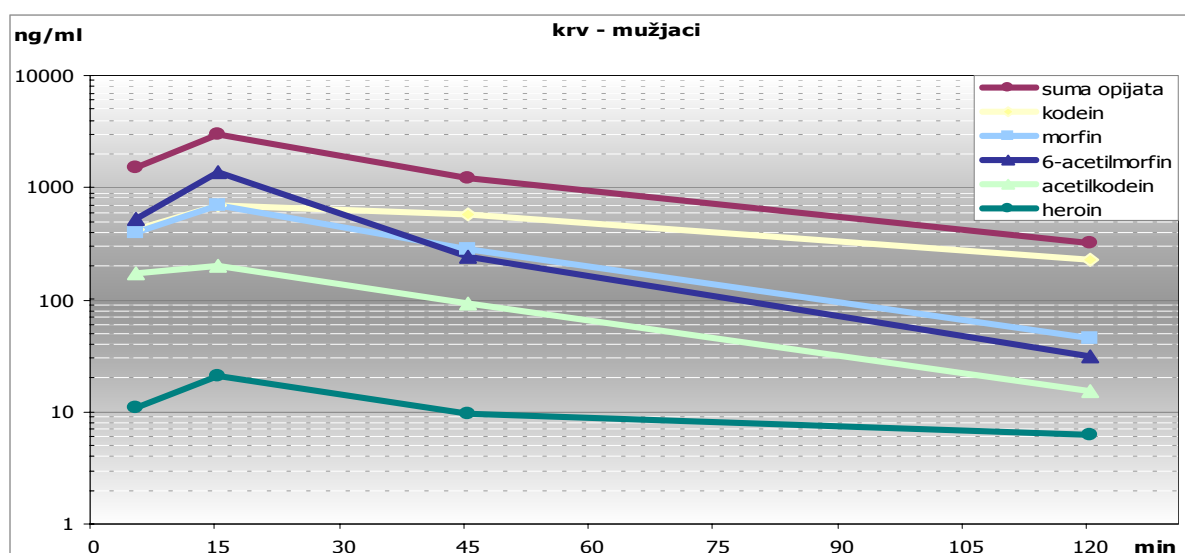
Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida: kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina, u uzorcima krvi mužjaka pacova je određivan u toku 120 minuta i prikazan je u tabeli 4.2.

Dobijeni podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SD za 5 eksperimentalnih životinja u grupi, a statistička značajnost razlika u odnosu na kontrolnu grupu je određena Studentovim t - testom, pri čemu je statistička značajnost prihvaćena za $p < 0,05$.

Tabela 4.2. Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida u uzorcima krvi mužjaka pacova

Vreme (min)	Koncentracija opijata (ng/ml)					
	kodein	morfin	acetilkodein	6-acetilmorfin	heroin	suma opijata
5	421,9 \pm 98,6**	392,3 \pm 93,1*	169,5 \pm 56,8**	518,3 \pm 103,9**	10,8 \pm 1,6**	1512,7 \pm 128,0**
15	703,0 \pm 100,5	693,8 \pm 158,9	201,8 \pm 80,6*	1375,3 \pm 220,8*	20,6 \pm 12,5*	2994 \pm 505,5**
45	579,4 \pm 71,0*	282,9 \pm 72,3*	92,4 \pm 24,0*	245,3 \pm 47,7*	9,7 \pm 3,4**	1209,7 \pm 131,7**
120	224,5 \pm 56,2*	45,3 \pm 11,7*	15,4 \pm 7,5*	31,6 \pm 11,6**	6,2 \pm 4,5*	322,9 \pm 40,3*

(n=5; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)



Slika 4.31. Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijata u uzorcima krvi mužjaka pacova

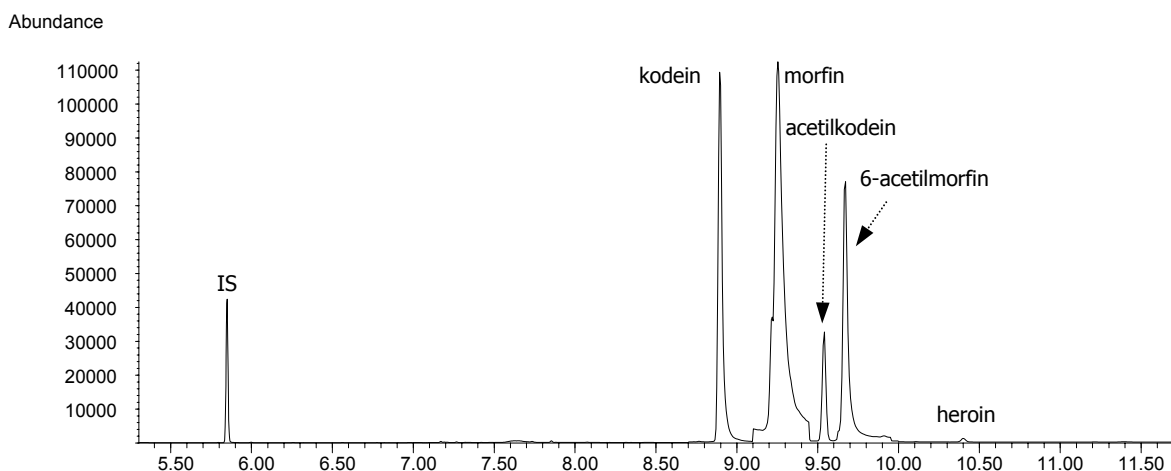
Sadržaj ukupnih kao i pojedinačnih opijatnih alkaloida: kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u uzorcima krvi mužjaka pacova u toku 120 minuta je prikazan na slici 4.31.

Prikazani rezultati ukazuju da je u uzorcima krvi najveći sadržaj ukupnih opijata ($2994,5 \pm 505,5$ ng/ml) kao i pojedinačnih opijatnih alkaloida: 6-acetilmorfina ($1375,3 \pm 220,8$ ng/ml), kodeina ($703,0 \pm 100,5$ ng/ml), morfina ($693,8 \pm 158,9$ ng/ml), acetilkodeina ($201,8 \pm 80,6$ ng/ml) i heroina ($20,6 \pm 12,5$ ng/ml) određen nakon 15 minuta od tretiranja životinja heroinom. Sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida, 6-acetilmorfina, acetilkodeina i heroina je statistički značajan u odnosu na kontrolne vrednosti, za razliku od sadržaja kodeina i morfina.

Takođe, može se uočiti da je već nakon 5 minuta određena znatno veća koncentracija 6-acetilmorfina ($518,3 \pm 103,9$ ng/ml), kodeina ($421,9 \pm 98,6$ ng/ml) i morfina ($392,3 \pm 93,1$ ng/ml), u odnosu na acetilkodein ($169,5 \pm 56,8$ ng/ml) i heroin ($10,8 \pm 1,6$ ng/ml), pri čemu je za sve vrednosti utvrđena statistička značajnost u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Imajući u vidu da su životinje tretirane heroinom sa najvećim sadržajem 6-acetilmorfina, 3,6-diacetilmorfina i acetilkodeina u smeši, visok sadržaj morfina i kodeina u krvi se može objasniti veoma brzym hidrolizom heroina, odnosno acetilkodeina.

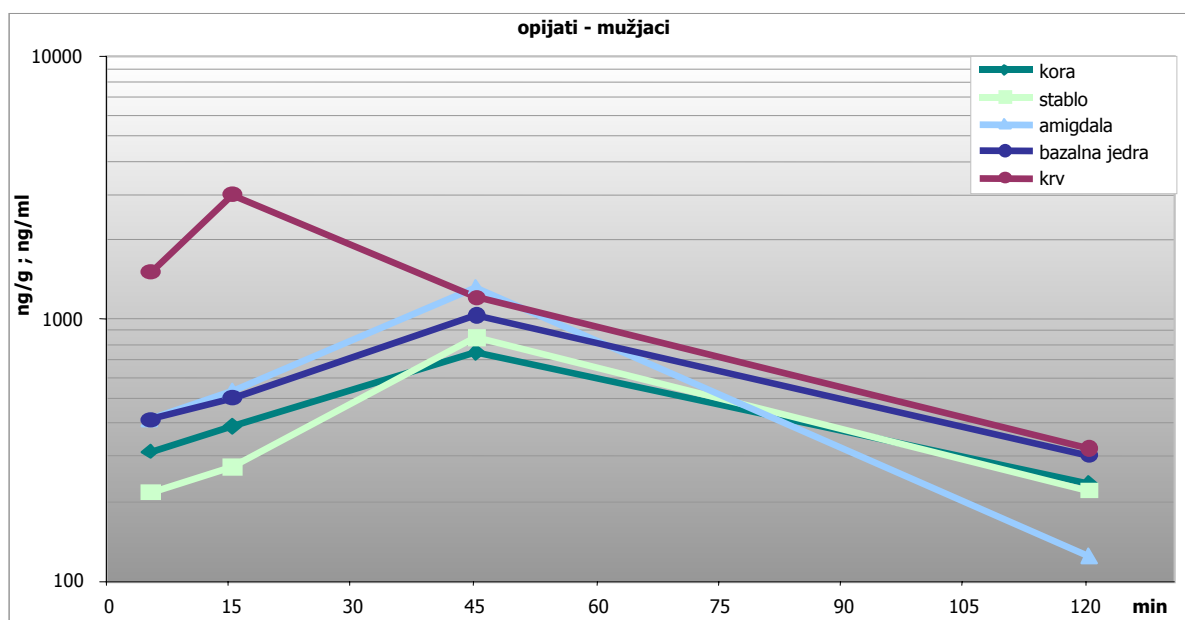
Kao primer kvantitativne analize, prikazan je hromatogram GC-MS SIM analize uzorka krvi mužjaka pacova nakon 15 minuta, u kojoj su kvantifikovani kodein, morfin, acetilkodein, 6-acetilmorfin i heroin (slika 4.32.).



Slika 4.32. Hromatogram GC-MS SIM analize uzorka krvi mužjaka pacova nakon 15 minuta

Poređenjem koncentracija ukupnih opijata u krvi i delovima moždanog tkiva u vremenskim periodima kada je određen njihov najveći sadržaj, može se uočiti znatno veća koncentracija opijata u krvi nakon 15 minuta ($2994,5 \pm 505,5$ ng/ml), u odnosu na njihovu koncentraciju u delovima moždanog tkiva nakon 45 minuta ($1318,7 \pm 121,5$ ng/g u amigdali; $1025,3 \pm 80,7$ ng/g u bazalnim jedrima; $848,5 \pm 96,3$ ng/g u moždanom stablu i

741,9 ± 53,1 ng/g u moždanoj kori). Sadržaj opijata u krvi nakon 45 minuta (1209,7 ± 131,7 ng/ml) je približno isti kao u delovima moždanog tkiva. Potom se može uočiti znatno smanjenje koncentracije opijata u svim uzorcima nakon 120 minuta, u kojima je određen i njihov približno isti sadržaj (322,9 ± 40,3 ng/ml u krvi i 124,8 ± 14,5 - 304,4 ± 42,5 ng/g u delovima moždanog tkiva) (slika 4.33.).



Slika 4.33. Sadržaj sume opijata u uzorcima delova moždanog tkiva i krvi mušjaka pacova

4.6. KVANTITATIVNA GC/MS ANALIZA BIOLOŠKIH UZORAKA ŽENKI PACOVA

Već kako je prethodno opisano, na osnovu preliminarnih istraživanja je utvrđena optimalna doza heroina koja je davana i ženka pacova, a sva određivanja su vršena u toku 120 minuta.

4.6.1. ANALIZA ISPITIVANIH OPIJATA U MOŽDANOM TKIVU

Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida: kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina, u uzorcima delova moždanog tkiva: moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima ženki pacova je određivan u toku 120 minuta i prikazan je u tabeli 4.3.

Dobijeni podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SD za 5 eksperimentalnih životinja u grupi, a statistička značajnost razlika u odnosu na kontrolnu grupu je određena Studentovim t - testom, pri čemu je statistička značajnost prihvaćena za $p < 0,05$.

Tabela 4.3. Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida u moždanom tkivu ženki pacova

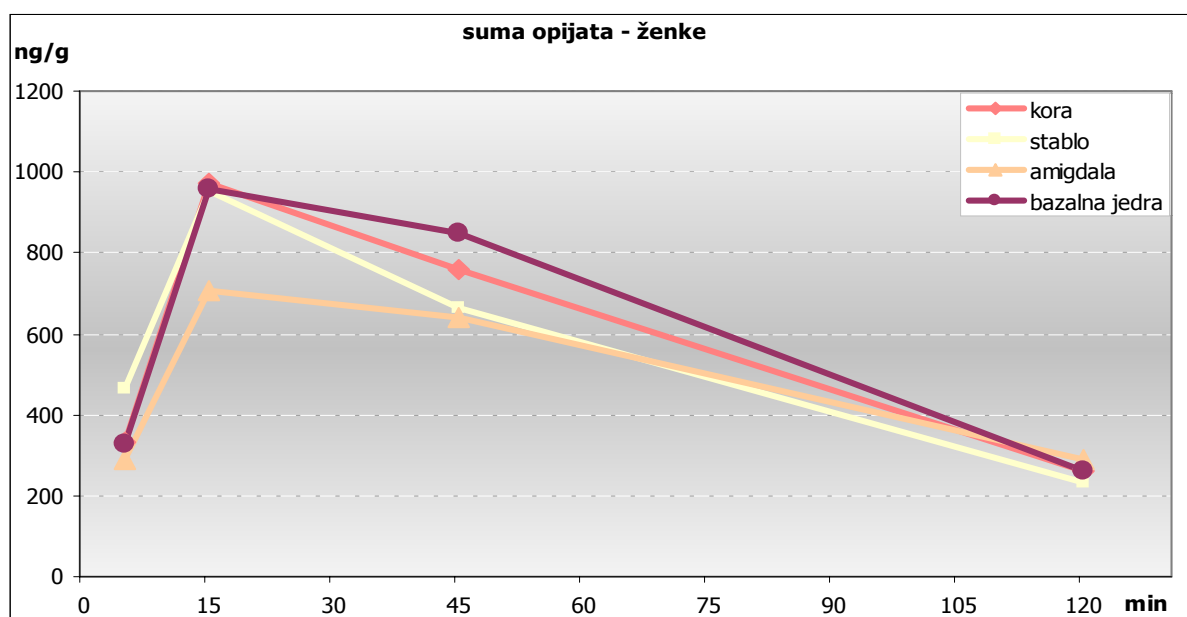
Uzorak	Vreme (min)	Konzentracija opijata (ng/g)					
		kodein	morfin	acetilkodein	6-acetilmorfin	heroin	suma opijata
kora	5	89,2 \pm 28,2*	33,6 \pm 14,6	54,3 \pm 19,3*	143,5 \pm 26,9	9,5 \pm 4,9	330,0 \pm 70,8
	15	413,4 \pm 40,1*	64,8 \pm 20,1	134,6 \pm 31,5**	346,6 \pm 54,4*	13,4 \pm 9,4*	972,8 \pm 147,1*
	45	308,0 \pm 78,2*	55,1 \pm 12,2	130,0 \pm 68,3*	253,7 \pm 30,4	13,0 \pm 3,3*	759,7 \pm 134,5*
	120	110,9 \pm 38,0**	23,3 \pm 8,1*	43,5 \pm 12,0*	73,1 \pm 30,2	10,8 \pm 5,7	261,5 \pm 33,6*
stablo	5	96,7 \pm 4,4**	82,9 \pm 18,9*	58,4 \pm 18,7**	216,8 \pm 43,4	11,7 \pm 2,8	466,3 \pm 67,6*
	15	417,9 \pm 68,4*	94,6 \pm 15,8*	155,1 \pm 73,0*	267,4 \pm 83,6*	19,9 \pm 6,8*	954,8 \pm 169,5*
	45	266,1 \pm 59,8**	62,8 \pm 32,7*	128,7 \pm 33,5**	194,0 \pm 63,2*	11,2 \pm 3,2**	662,8 \pm 68,5*
	120	98,4 \pm 24,5*	8,8 \pm 3,9	35,3 \pm 11,3*	79,9 \pm 16,2	8,9 \pm 4,0	231,3 \pm 30,8*
amigdala	5	110,5 \pm 44,7**	27,4 \pm 6,1	45,6 \pm 17,3**	97,8 \pm 19,8*	9,1 \pm 3,7	290,3 \pm 34,9**
	15	365,6 \pm 74,8**	44,2 \pm 11,9	136,8 \pm 74,1*	149,5 \pm 61,2	10,8 \pm 6,6*	706,8 \pm 55,7**
	45	347,5 \pm 92,1**	27,4 \pm 10,2*	120,4 \pm 9,1**	135,0 \pm 87,1*	10,8 \pm 2,1**	641,1 \pm 41,3**
	120	139,9 \pm 61,0**	13,8 \pm 9,1	34,1 \pm 10,6*	93,1 \pm 39,1	9,6 \pm 5,3*	290,5 \pm 41,0*
bazalna jedra	5	107,4 \pm 55,4*	20,9 \pm 11,7	53,9 \pm 17,5*	128,3 \pm 29,9	15,8 \pm 9,6	326,2 \pm 48,8*
	15	484,9 \pm 86,8**	80,1 \pm 25,2*	146,9 \pm 33,3**	227,7 \pm 75,0	16,6 \pm 5,1*	956,1 \pm 87,1**
	45	421,4 \pm 56,5**	72,3 \pm 33,1	146,9 \pm 25,0**	195,8 \pm 88,9*	14,5 \pm 1,1*	850,8 \pm 46,9**
	120	152,3 \pm 78,5*	ND	41,5 \pm 16,2*	55,9 \pm 9,1*	13,5 \pm 5,8	263,1 \pm 28,5**

(n=5; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ND - nije detektovano)

Sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida u uzorcima delova moždanog tkiva ženki pacova u toku 120 minuta, je prikazan na slici 4.34.

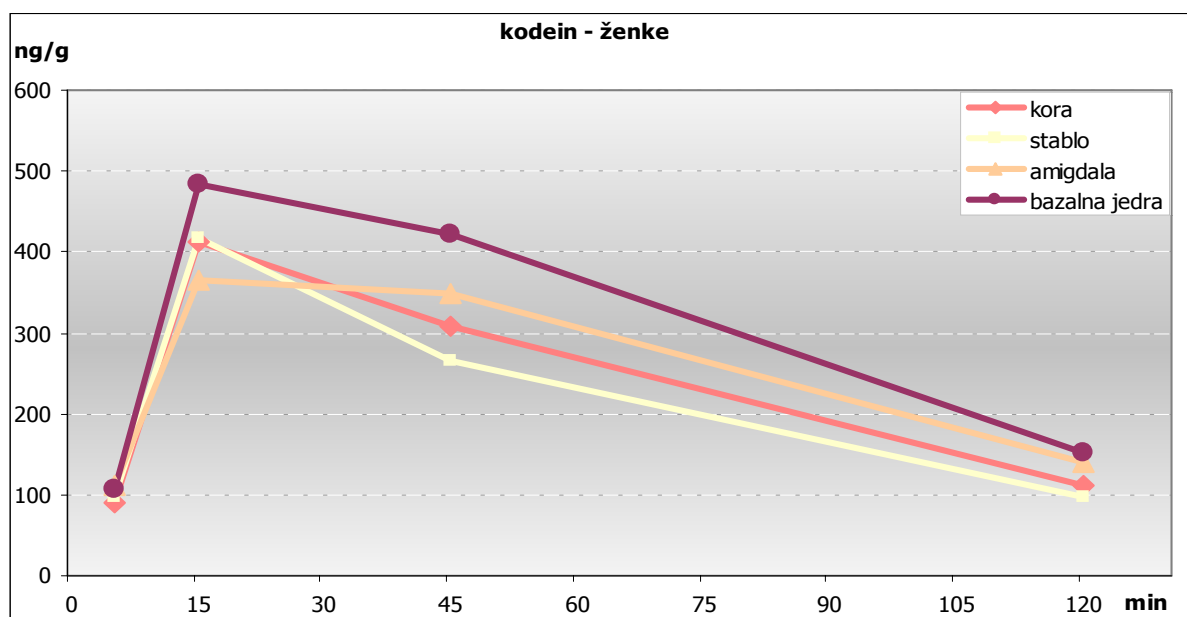
Iz navedenih rezultata se može uočiti nagli porast koncentracije opijatnih alkaloida u svim delovima moždanog tkiva nakon 15 minuta od tretiranja životinja heroinom, pri čemu

su najveće koncentracije opijata određene u moždanoj kori ($972,8 \pm 147,1$ ng/g), bazalnim jedrima ($956,1 \pm 87,1$ ng/g) i moždanom stablu ($954,8 \pm 169,5$ ng/g), a najmanje u amigdali ($706,8 \pm 55,7$ ng/g).



Slika 4.34. Sadržaj sume opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva ženki pacova

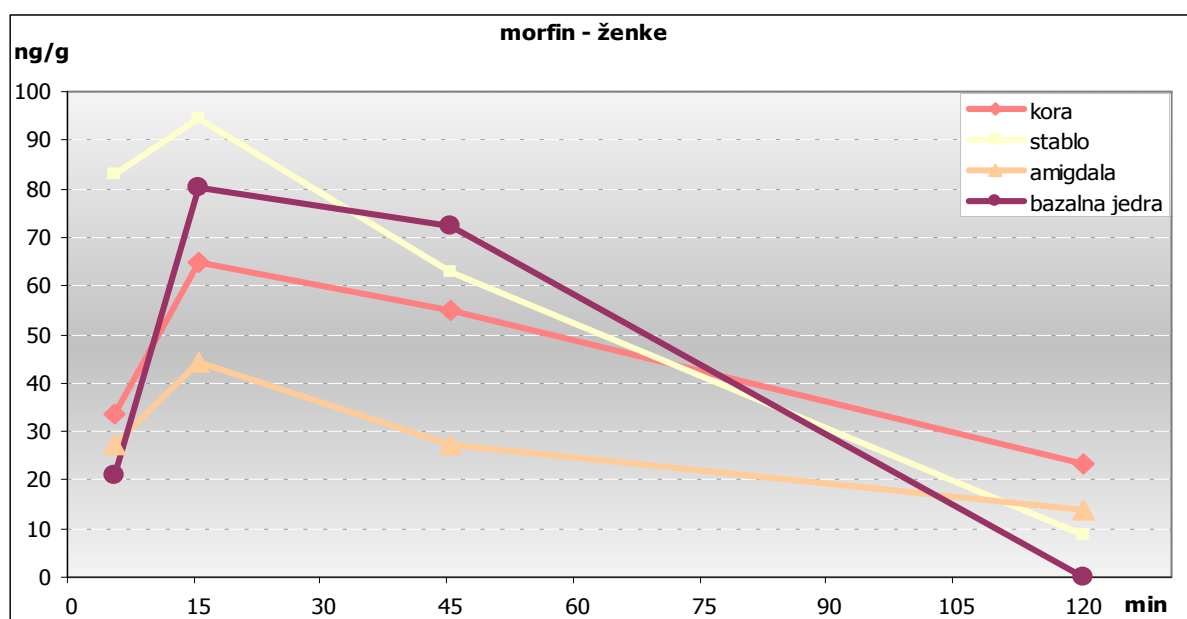
Nakon 120 minuta se može uočiti pad koncentracije opijata, pri čemu su određene približno iste vrednosti u svim delovima moždanog tkiva, a neznatno veće u amigdali ($290,5 \pm 41,0$ ng/g) i bazalnim jedrima ($263,1 \pm 28,5$ ng/g). Navedene vrednosti koncentracija ukupnih opijatnih alkaloida su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



Slika 4.35. Sadržaj kodeina u delovima moždanog tkiva ženki pacova

Isto tako određivan je i sadržaj pojedinačnih opijatnih alkaloida: **kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina** u delovima moždanog tkiva ženki pacova u toku 120 minuta. Rezultati su prikazani na slikama od 4.35. do 4.39.

Najveći sadržaj **kodeina** je određen nakon 15 minuta u bazalnim jedrima ($484,9 \pm 86,8$ ng/g) i moždanom stablu ($417,9 \pm 68,4$ ng/g), dok se nakon 120 minuta može uočiti pad koncentracije u svim delovima moždanog tkiva, pri čemu je najveći sadržaj određen u bazalnim jedrima ($152,3 \pm 78,5$ ng/g) i amigdali ($139,9 \pm 61,0$ ng/g), a najmanji u moždanom stablu ($98,4 \pm 24,5$ ng/g) (slika 4.35.). Navedene vrednosti koncentracija kodeina su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



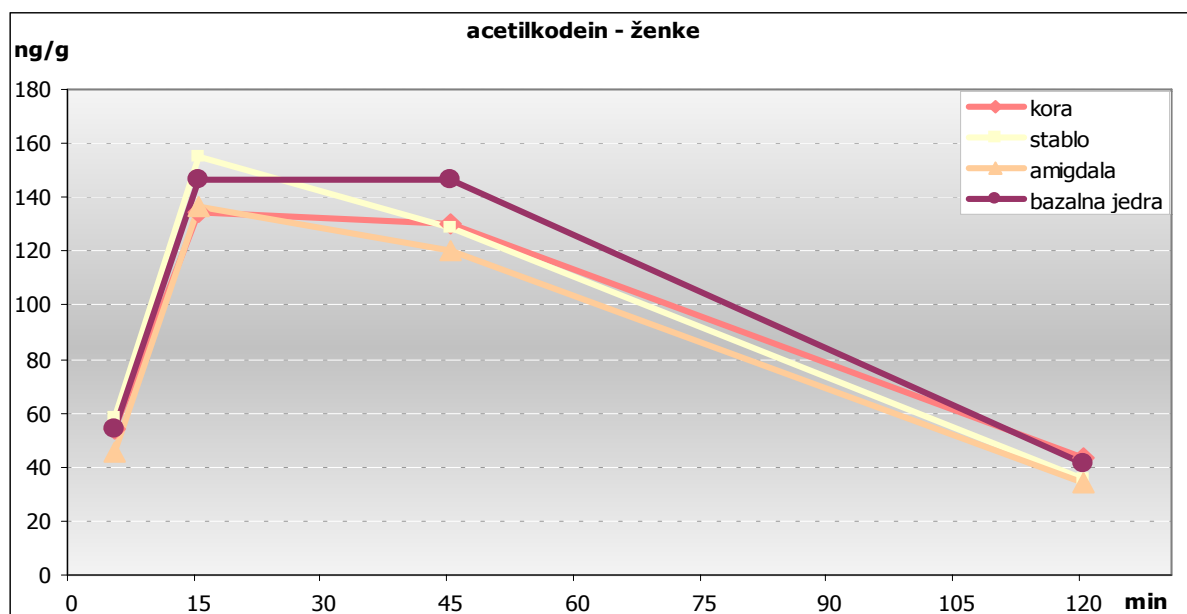
Slika 4.36. Sadržaj morfina u delovima moždanog tkiva ženki pacova

Navedeni rezultati ukazuju na najveći sadržaj **morfina** nakon 15 minuta u moždanom stablu ($94,6 \pm 15,8$ ng/g) i bazalnim jedrima ($80,1 \pm 25,2$ ng/g), a vrednosti su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Nakon 120 minuta je uočljivo smanjenje sadržaja morfina, pri čemu su najveće koncentracije određene u moždanoj kori ($23,3 \pm 8,1$ ng/g) i amigdali ($13,8 \pm 9,1$ ng/g), a najmanje u moždanom stablu ($8,8 \pm 3,9$ ng/g), dok u bazalnim jedrima nije identifikovan (slika 4.36.). Vrednost koncentracije morfina u moždanoj kori je statistički značajna, za razliku od vrednosti koncentracija u amigdali i moždanom stablu.

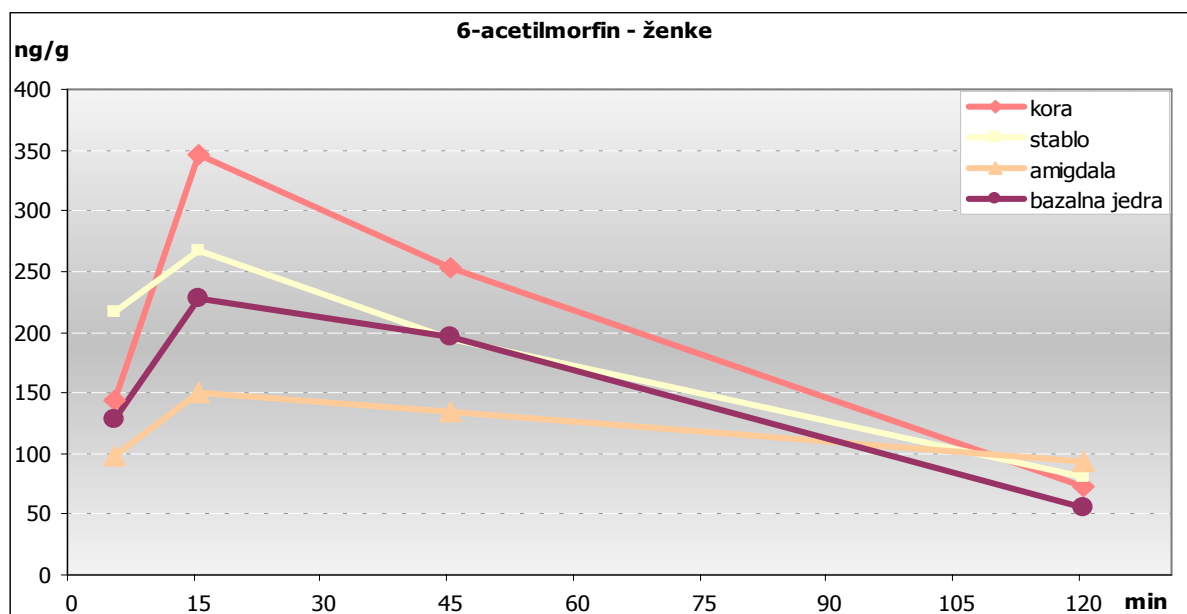
Najveći sadržaj **acetilkodeina** je određen u moždanom stablu ($155,1 \pm 73,0$ ng/g) i bazalnim jedrima ($146,9 \pm 33,3$ ng/g) nakon 15 minuta, dok se nakon 120 minuta može uočiti smanjenje koncentracije, pri čemu su određene približno iste vrednosti u svim delovima moždanog tkiva, a neznatno veće u moždanoj kori ($43,5 \pm 12,0$ ng/g) i bazalnim jedrima ($41,5 \pm 16,2$ ng/g) (slika 4.37.). Navedene vrednosti koncentracija acetilkodeina su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Iz navedenih rezultata se može uočiti naglo povećanje koncentracije **6-acetilmorfina** nakon 15 minuta, pri čemu je najveći sadržaj određen u moždanoj kori ($346,6 \pm 54,4$ ng/g) i moždanom stablu ($267,4 \pm 83,6$ ng/g), a vrednosti su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



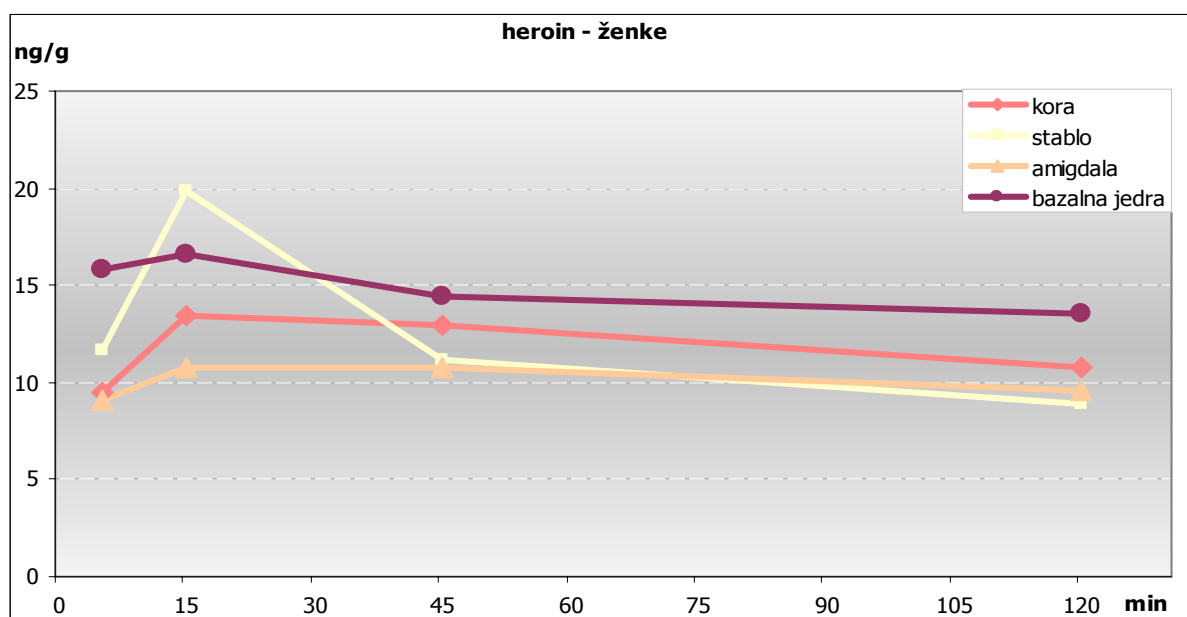
Slika 4.37. Sadržaj acetilcodeina u delovima moždanog tkiva ženki pacova

Nakon 120 minuta je uočljivo smanjenje koncentracije 6-acetilmorfina, pri čemu su najveće koncentracije određene u amigdali ($93,1 \pm 39,1$ ng/g) i moždanom stablu ($79,9 \pm 16,2$ ng/g), a najmanje u bazalnim jedrima ($55,9 \pm 9,1$ ng/g) (slika 4.38.). Vrednost koncentracije 6-acetilmorfina u bazalnim jedrima je statistički značajna, za razliku od vrednosti koncentracija u amigdali i moždanom stablu.



Slika 4.38. Sadržaj 6-acetilmorfina u delovima moždanog tkiva ženki pacova

Prikazani rezultati ukazuju na najveći sadržaj **heroina** nakon 15 minuta u moždanom stablu ($19,9 \pm 6,8$ ng/g) i bazalnim jedrima ($16,6 \pm 5,1$ ng/g), pri čemu su vrednosti statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



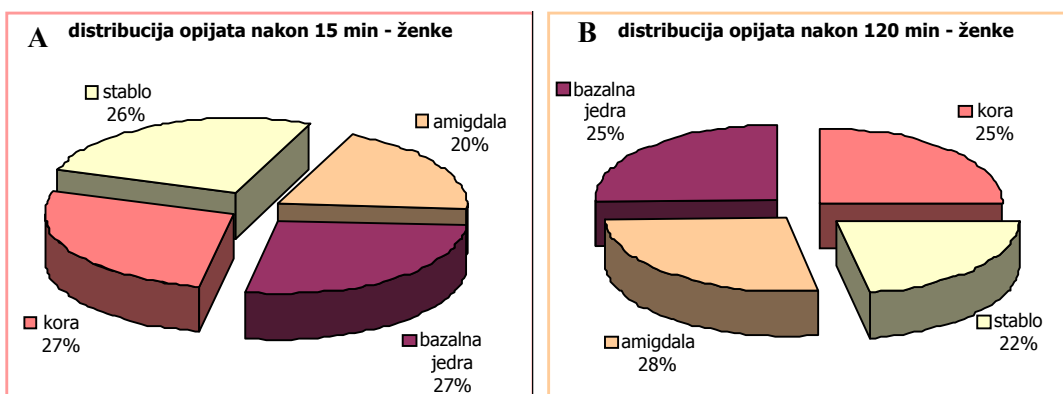
Slika 4.39. Sadržaj heroina u delovima moždanog tkiva ženki pacova

Nakon 120 minuta je uočljivo smanjenje sadržaja heroina, koje je najizraženije u moždanom stablu, pri čemu su najveće koncentracije određene u bazalnim jedrima ($13,5 \pm 5,8$ ng/g) i moždanoj kori ($10,8 \pm 5,7$ ng/g) a najmanje u moždanom stablu ($8,9 \pm 4,0$ ng/g) (slika 4.39.). Navedene vrednosti koncentracija nisu statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

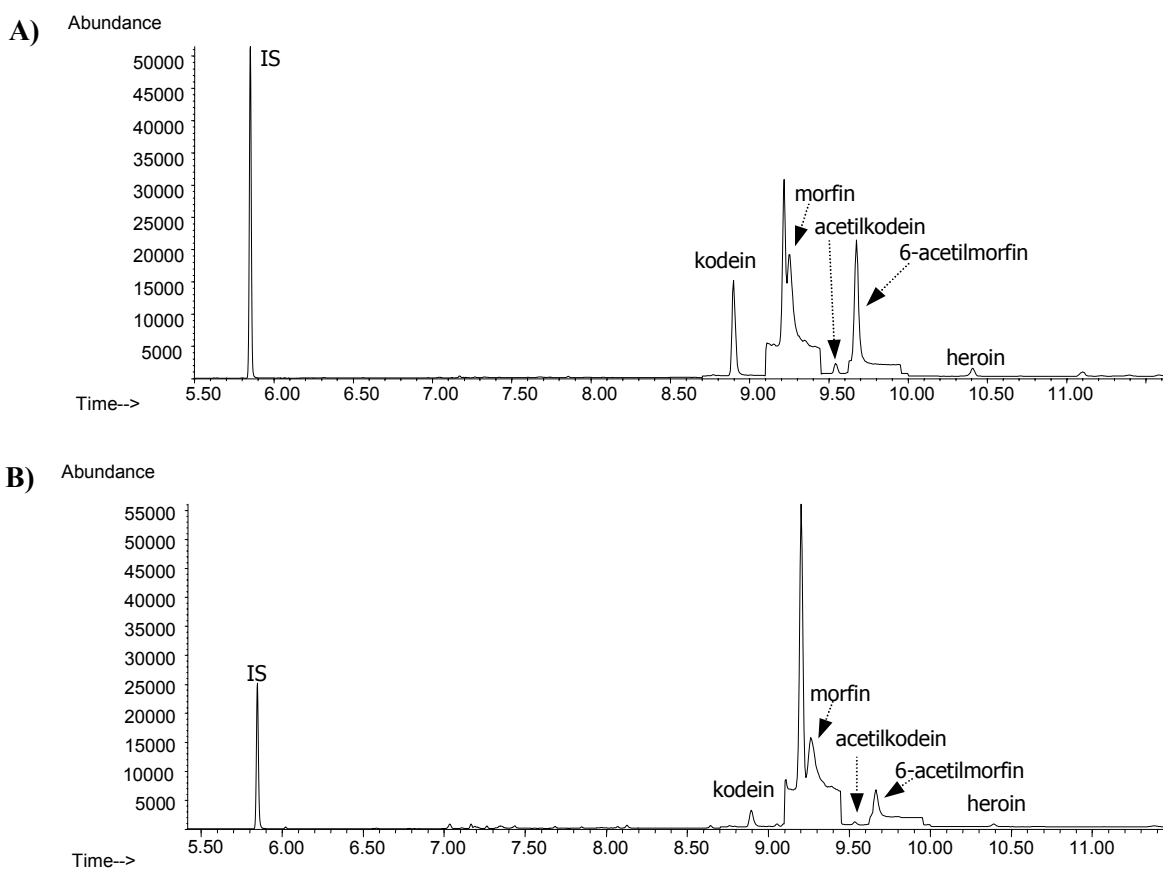
Maksimalne vrednosti koncentracija u delovima moždanog tkiva nakon 15 minuta su iznosile za kodein: $484,9 \pm 86,8$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,01$), 6-acetilmorfin: $346,6 \pm 54,4$ ng/g (u moždanoj kori; $p < 0,05$), acetilkodein $155,1 \pm 73,0$ ng/g (u moždanom stablu; $p < 0,05$), morfin: $94,6 \pm 15,8$ ng/g (u moždanom stablu; $p < 0,05$) i heroin: $19,9 \pm 6,8$ ng/g (u moždanom stablu; $p < 0,05$), a za sumu opijata: $972,8 \pm 147,1$ ng/g (u moždanoj kori; $p < 0,05$) i $956,1 \pm 87,1$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,01$).

Maksimalne vrednosti koncentracija u delovima moždanog tkiva nakon 120 minuta su iznosile za kodein: $152,3 \pm 78,5$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,05$), 6-acetilmorfin: $93,1 \pm 39,1$ ng/g (u amigdali), acetilkodein $43,5 \pm 12,0$ ng/g (u moždanoj kori; $p < 0,05$), morfin: $23,3 \pm 8,1$ ng/g (u moždanoj kori; $p < 0,05$) i heroin: $13,5 \pm 5,8$ ng/g (u bazalnim jedrima), a za sumu opijata: $290,5 \pm 41,0$ ng/g (u amigdali; $p < 0,05$) i $263,1 \pm 28,5$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,01$).

Rezultati dobijeni analizom distribucije pojedinačnih opijatnih alkaloida u moždanom tkivu ženki pacova u različitom vremenskom periodu, su u saglasnosti sa rezultatima koji ukazuju na nagli porast sadržaja ukupnih opijata nakon 15 minuta, sa najvećom procentualnom zastupljenošću u moždanoj kori (27 %) i bazalnim jedrima (27 %) (slika 4.40. A). Smanjenje sadržaja ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida je utvrđeno u svim delovima moždanog tkiva nakon 120 minuta, pri čemu je njihova najveća procentualna zastupljenost u amigdali (28 %), bazalnim jedrima (25 %) i moždanoj kori (25 %) (slika 4.40. B).



Slika 4.40. Distribucija opijata u moždanom tkivu ženki pacova nakon (A) 15 min i (B) 120 min



Slika 4.41. Hromatogram GC-MS SIM analize uzorka bazalnih jedara ženki pacova nakon A) 15 i B) 120 minuta

Kao primer kvantitativne analize delova moždanog tkiva, prikazani su hromatogrami GC-MS SIM analize bazalnih jedara ženki pacova nakon 15 i 120 minuta, u kojima su kvantifikovani kodein, morfin, acetilkodein, 6-acetilmorfin i heroin (slike 4.41. A i B).

Na prikazanim hromatogramima se može uočiti smanjenje intenziteta pikova navedenih opijatnih alkaloida nakon 120 minuta u poređenju sa intenzitetom pikova nakon 15 minuta od tretiranja životinja heroinom.

4.6.2. ANALIZA ISPITIVANIH OPIJATA U UZORCIMA KRVI

Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida: kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina, u uzorcima krvi ženki pacova je određivan u toku 120 minuta i prikazan je u tabeli 4.4.

Dobijeni podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SD za 5 eksperimentalnih životinja u grupi, a statistička značajnost razlika u odnosu na kontrolnu grupu je određena Studentovim t - testom, pri čemu je statistička značajnost prihvaćena za $p < 0,05$.

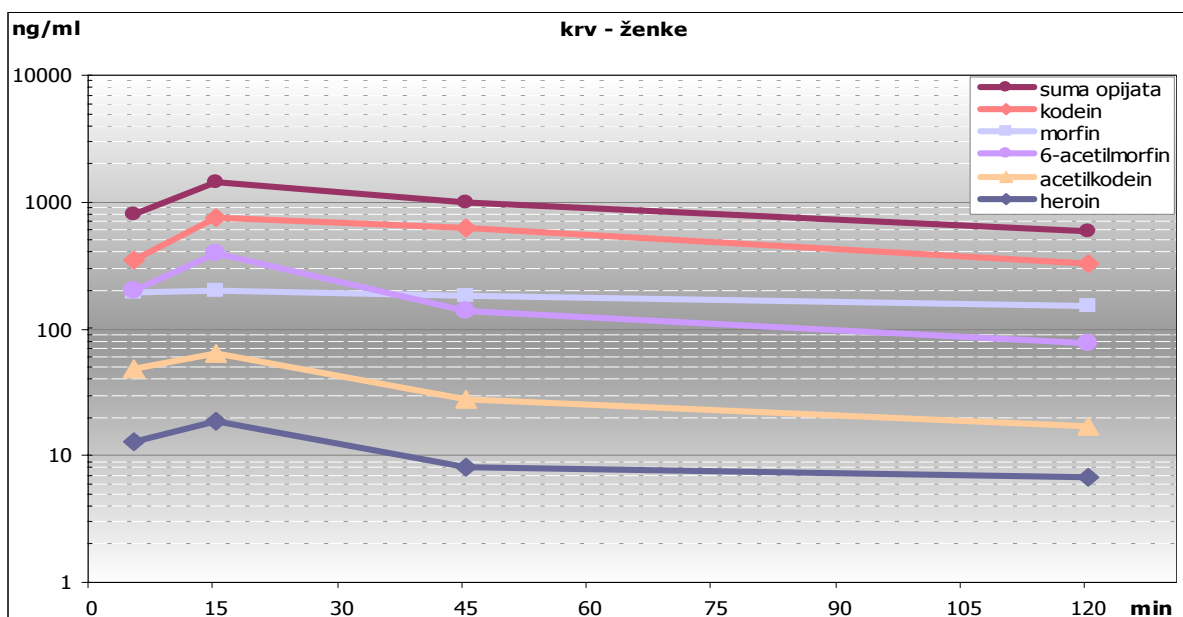
Tabela 4.4. Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida u uzorcima krvi ženki pacova

Vreme (min)	Koncentracija opijata (ng/ml)					
	kodein	morfin	acetilkodein	6-acetilmorfin	heroin	suma opijata
5	346,3 \pm 128,5*	191,2 \pm 73,4*	48,4 \pm 15,9	198,0 \pm 77,5	12,9 \pm 6,7*	796,7 \pm 128,4**
15	748,3 \pm 97,9**	202,9 \pm 37,1**	63,4 \pm 14,5	390,1 \pm 84,9*	18,4 \pm 1,6*	1423,1 \pm 139,2**
45	624,3 \pm 93,1**	183,3 \pm 40,9*	27,5 \pm 10,3*	140,2 \pm 21,6*	8,1 \pm 3,5**	983,3 \pm 113,5**
120	330,4 \pm 69,1*	150,5 \pm 75,3	17,0 \pm 5,0	77,2 \pm 10,1	6,7 \pm 1,8**	581,8 \pm 116,3*

(n=5; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida, kao i pojedinačnih opijata: kodeina, morfina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u uzorcima krvi ženki pacova u toku 120 minuta, je prikazan na slici 4.42.

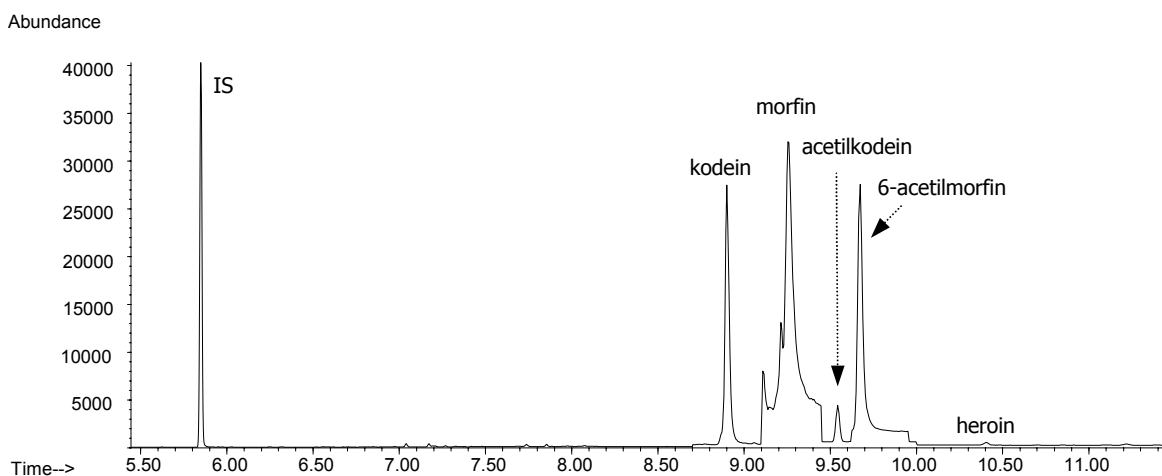
Prikazani rezultati ukazuju da je u uzorcima krvi najveći sadržaj ukupnih opijata (1423,1 \pm 139,2 ng/ml) kao i pojedinačnih opijatnih alkaloida: kodeina (748,3 \pm 97,9 ng/ml), 6-acetilmorfina (390,1 \pm 84,9 ng/ml), morfina (202,9 \pm 37,1 ng/ml), acetilkodeina (63,4 \pm 14,5 ng/ml) i heroina (18,4 \pm 1,6 ng/ml) određen nakon 15 minuta od tretiranja životinja heroinom. Sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida, kodeina, 6-acetilmorfina, morfina i heroina je statistički značajan u odnosu na kontrolne vrednosti, za razliku od sadržaja acetilkodeina.



Slika 4.42. Sadržaj ukupnih i pojedinačnih opijata u uzorcima krvi ženki pacova

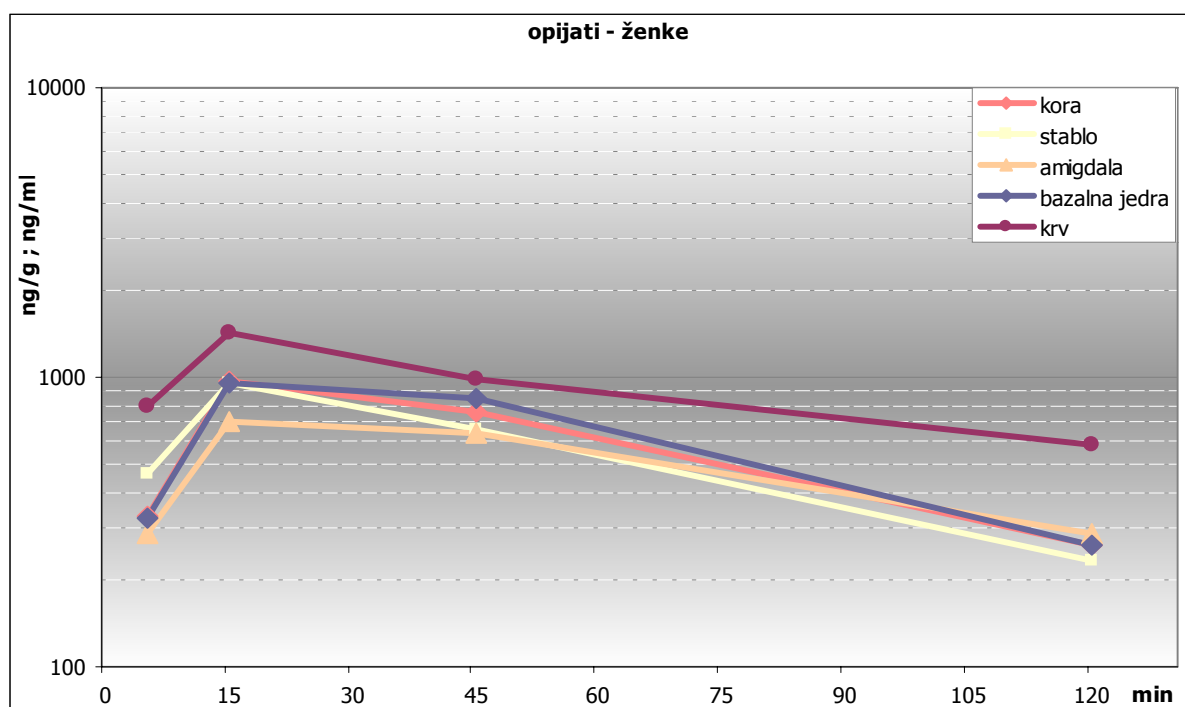
Takođe, može se uočiti da je već nakon 5 minuta određena znatno veća koncentracija kodeina ($346,3 \pm 128,5$ ng/ml), 6-acetilmorfina ($198,0 \pm 77,5$ ng/ml) i morfina ($191,2 \pm 73,2$ ng/ml), u odnosu na acetilkodein ($48,4 \pm 15,9$ ng/ml) i heroin ($12,9 \pm 6,7$ ng/ml). Vrednosti koncentracija kodeina, morfina i heroina su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja, za razliku od vrednosti koncentracija 6-acetilmorfina i acetilkodeina.

Imajući u vidu da su životinje tretirane heroinom sa najvećim sadržajem 6-acetilmorfina, 3,6-diacetilmorfina i acetilkodeina u smeši, visok sadržaj kodeina i morfina u krvi se može objasniti time što nastaju procesom brze hidrolize acetilkodeina, odnosno heroina. U odnosu na druge opijatne alkaloidne, sadržaj morfina je relativno konstantan u uzorcima krvi i blago opada nakon 120 minuta.



Slika 4.43. Hromatogram GC-MS SIM analize uzorka krvi ženke pacova nakon 15 minuta

Kao primer kvantitativne analize, prikazan je hromatogram GC-MS SIM analize uzorka krvi ženki pacova nakon 15 minuta, u kojoj su kvantifikovani kodein, morfin, acetilkodein, 6-acetilmorfin i heroin (slika 4.43.).



Slika 4.44. Sadržaj sume opijata u uzorcima delova moždanog tkiva i krvi ženki pacova

Poređenjem sadržaja ukupnih opijata u krvi i delovima moždanog tkiva može se uočiti znatno povećanje koncentracije u svim uzorcima nakon 15 minuta, u kojima je određen i približan sadržaj opijata ($1423,1 \pm 139,2$ ng/ml u krvi i $706,8 \pm 55,7 - 972,8 \pm 147,1$ ng/g u delovima moždanog tkiva). Potom se može uočiti isti trend smanjenja sadržaja opijata u svim uzorcima nakon 120 minuta, pri čemu vrednosti koncentracija u delovima moždanog tkiva iznose $231,3 \pm 30,8 - 290,5 \pm 41,0$ ng/g, a u krvi $581,8 \pm 116,3$ ng/ml (slika 4.44.).

4.7. POREĐENJE SADRŽAJA OPIJATNIH ALKALOIDA U BIOLOŠKIM UZORCIMA EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA SUPROTNIH POLOVA

Ranijim istraživanjima je dokazano da ženke mogu podneti znatno veće doze morfina, u poređenju sa mužjacima, pri čemu su izmerene koncentracije morfina u mozgu i krvi kod oba pola jednake (Cicero i sar., 1996; 1997; Nock i sar., 1997).

U okviru ovog eksperimentalnog rada mužjaci i ženke pacova su tretirani dozom od 25 mg/kg heroina, pri čemu je 100 % ženki i 67 % mužjaka preživelo vremenski period od 120 minuta.

Maksimalne vrednosti koncentracija pojedinačnih i ukupnih opijatnih alkaloida u odgovarajućim delovima moždanog tkiva mužjaka i ženki pacova, određenih nakon 5, 15, 45 i 120 minuta su prikazane u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Maksimalne koncentracije opijata u moždanom tkivu mužjaka i ženki pacova

vreme/pol ng/g	5 min		15 min	45 min	120 min	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
kodein	110,5±44,7	184,7±42,3	484,9±86,8	581,3±120,8	152,3±78,5	143,2±15,0
6-acetilmorfin	216,8±43,4	91,7±36,9	346,6±54,4	319,5±87,0	93,1±39,1	35,3±14,8
acetilkodein	58,4±18,7	92,7±30,1	155,1±73,0	245,4±61,0	43,5±12,0	22,4±9,5
morfin	82,9±18,9	92,0±21,8	94,6±15,8	162,0±56,0	23,3±8,1	129,5±20,4
heroin	15,8±9,6	11,3±5,0	19,9±6,8	10,5±3,8	13,5±5,8	6,2±1,8
suma opijata	466,3±67,6	410,5±46,3	972,8±147,1	1318,7±121,5	290,5±41,0	304,4±42,5

(n=5)

Ako se uporede koncentracije pojedinačnih i ukupnih opijatnih alkaloida u moždanom tkivu životinja oba pola, mogu se uočiti relativno bliske vrednosti u ispitivanim vremenskim periodima.

Najveći sadržaj opijata je određen u moždanom tkivu ženki nakon 15 minuta (crvena kolona u tabeli), a kod mužjaka nakon 45 minuta (plava kolona u tabeli), što ukazuje na bržu distribuciju opijata iz krvi u mozak kod ženki u odnosu na mužjake pacova.

Dobijeni rezultati takođe pokazuju, da je u navedenim vremenskim periodima kod oba pola određen veći sadržaj kodeina, 6-acetilmorfina i acetilkodeina, u odnosu na morfin i heroin. Dobijene razlike u vrednostima koncentracija opijata se mogu objasniti procesima biotransformacije i distribucije opijata u organizmu. Takođe, treba imati u vidu da su životinje tretirane heroinom sa najvećim sadržajem 6-acetilmorfina, 3,6-diacetilmorfina i acetilkodeina u smeši. Naime, može se smatrati da je najmanji sadržaj heroina u odnosu na druge opijatne alkaloida uzrokovan njegovom brzom hidrolizom u 6-acetilmorfin, a potom u

morfin. Isto tako, morfin zbog svoje veće polarnosti, u poređenju sa 6-acetilmorfinom i ostalim opijatnim alkaloidima znatno sporije prolazi krvno-moždanu barijeru, te su njegove vrednosti manje u moždanom tkivu od očekivanih. Acetilkodein podleže hidrolizi u kodein, a s obzirom da su oba molekula manje polarna u poređenju sa morfinom, određen je njihov visok sadržaj u moždanom tkivu.

Ako se uporedi distribucija opijata u moždanom tkivu životinja oba pola, kada je određen njihov najveći i najmanji sadržaj, može se uočiti da je najveća procentualna zastupljenost opijata određena:

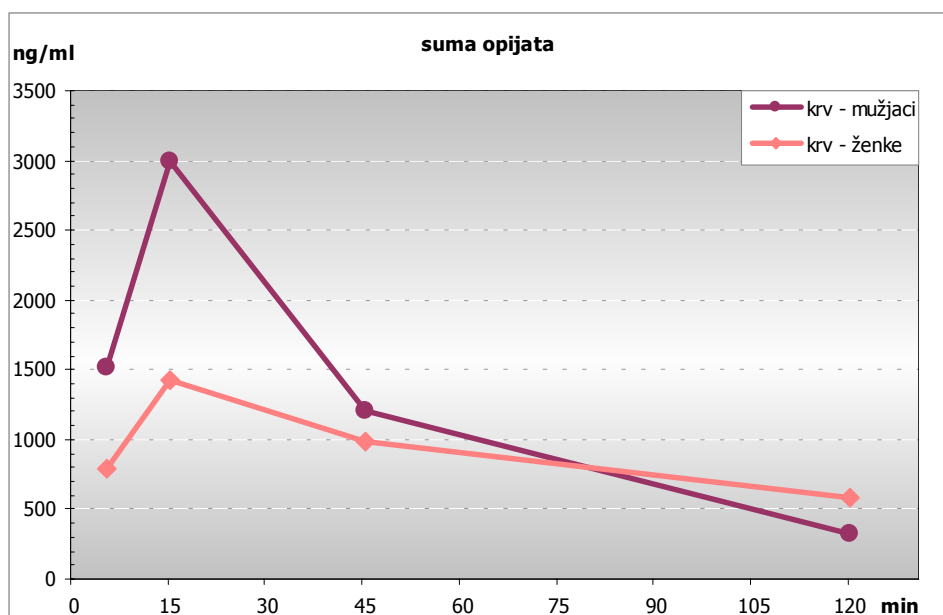
- kod ženki u moždanoj kori i bazalnim jedrima nakon 15 minuta (slika 4.40. A),
- kod mužjaka u amigdali i bazalnim jedrima nakon 45 minuta (slika 4.29. A),
- kod ženki u amigdali, bazalnim jedrima i moždanoj kori nakon 120 minuta (slika 4.40. B) i
- kod mužjaka u moždanoj kori i bazalnim jedrima nakon 120 minuta (slika 4.29. B).

Iz navedenog se može zaključiti da je najveća procentualna zastupljenost opijata određena u istim delovima moždanog tkiva životinja oba pola, ali u različitim vremenskim periodima. Takođe, može se uočiti da su kod oba pola u svim vremenskim periodima opijati zastupljeni u bazalnim jedrima.

U uzorcima krvi je najveći sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida određen nakon 15 minuta kod eksperimentalnih životinja oba pola (slika 4.45.).

Poređenjem koncentracija opijata nakon 15 minuta, uočljiva je znatno veća vrednost kod mužjaka ($2994,5 \pm 505,5$ ng/ml), u odnosu na ženke ($1423,1 \pm 139,2$ ng/ml), što se može objasniti bržom distribucijom opijata iz krvi u moždano tkivo ženki. Ovo je u saglasnosti sa određenim najvećim sadržajem opijata u moždanom tkivu ženki nakon 15 minuta, a kod mužjaka nakon 45 minuta.

U vremenskom periodu od 15 do 120 minuta, može se uočiti smanjenje koncentracije opijata. Približno iste vrednosti su određene u krvi mužjaka i ženki pacova nakon 45 ($1209,7 \pm 131,7$ ng/ml i $983,3 \pm 113,5$ ng/ml) i 120 minuta ($322,9 \pm 40,3$ ng/ml i $581,8 \pm 116,3$ ng/ml).



Slika 4.45. Sadržaj opijata u uzorcima krvi mužjaka i ženki pacova

U uzorcima krvi životinja oba pola je nakon 5 minuta određena znatno veća koncentracija kodeina, 6-acetilmorfina i morfina, u odnosu na acetilkodein i heroin, što se može objasniti brzim procesom hidrolize acetilkodeina u kodein i heroina u 6-acetilmorfin, a potom u morfin (slike 4.31. i 4.42.).

Ovako dobijeni rezultati koji ukazuju na bržu distribuciju opijata iz krvi u moždano tkivo ženki, u odnosu na mužjake pacova, su u saglasnosti sa istraživanjima opisanim u literaturi, u kojima su opijati (morfin i heroin) ispoljavali različite efekte na suprotne polove. Naime, u eksperimentima sa pacovima nisu uočene razlike samo u slučaju analgetičkog dejstva opijata, nego i u njihovom stimulativnom dejstvu i razvoju fizičke zavisnosti (*Cicero i sar., 1996; Craft i sar., 1996; Cicero i sar., 1997; Nock i sar., 1997; Cicero i sar., 1998; 1999*). Može se reći da su uočene razlike u ponašanju suprotnih polova pod uticajem opijata, posledica pretpostavki da postoji različita organizaciona struktura mozga mužjaka i ženki pacova, na koju utiču polni hormoni, a koji mogu menjati populaciju opijatnih receptora na izvesnim regijama moždanog tkiva (*Arnold i Breedlove, 1985; Breedlove, 1992; 1994; Hammer i sar., 1994; Brown i sar., 1996; Quinones-Jenab i sar., 1997; Cooke i sar., 1998; Eckersell i sar., 1998*).

Stoga, dobijeni rezultati u ovom radu imaju svoje opravdanje, s obzirom da su ova istraživanja nova i nisu do sada, prema našim saznanjima opisana u literaturi.

Od izuzetnog značaja za ovaj rad su eksperimentalni podaci kojima se potvrđuje da je distribucija opijata u humanom moždanom tkivu kod pripadnika suprotnih polova kao i moždanom tkivu mužjaka i ženki pacova, nakon 120 minuta od tretiranja heroinom, identična.

Posebno treba imati u vidu da su ispitivanja vršena na humanim biološkim uzorcima koji su uzimani za analizu istog dana ili dana nakon smrti osoba, gde ne postoji mogućnost

za precizno utvrđivanje količine opijata ili medikamenata koje su osobe konzumirale neposredno pre smrtnog ishoda.

Kada se izvrši poređenje distribucije opijata u humanom i moždanom tkivu eksperimentalnih životinja, može se zaključiti da je određen najveći sadržaj opijata u moždanoj kori i bazalnim jedrima kod pripadnika muškog pola. Kod pripadnica ženskog pola je najveći sadržaj opijata određen u amigdali, moždanoj kori i bazalnim jedrima.

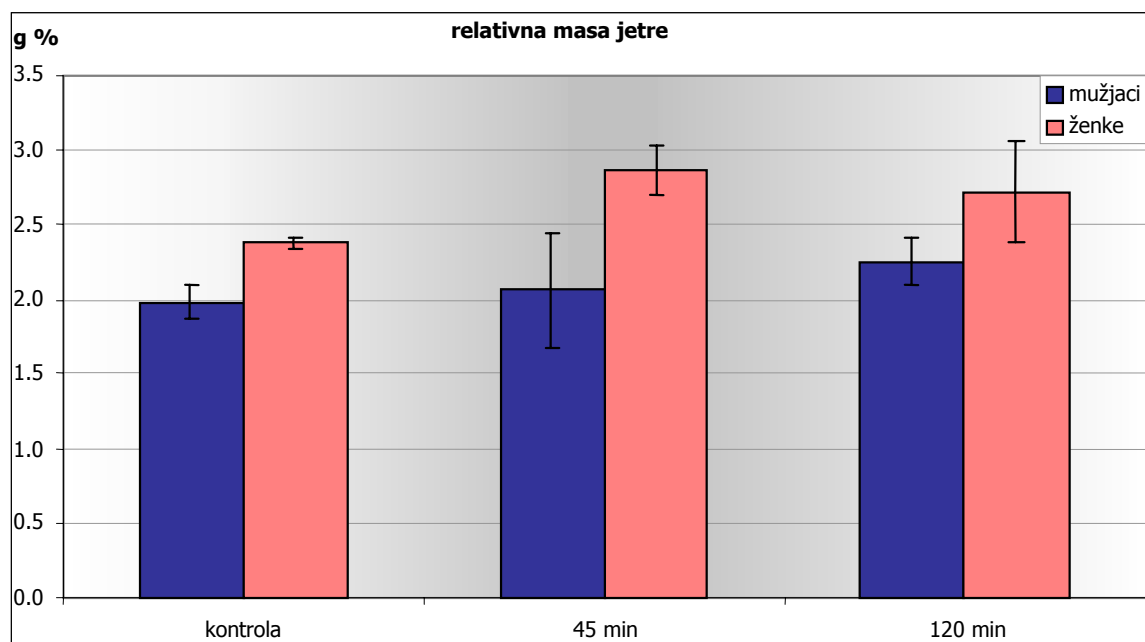
4.8. UTICAJ OPIJATA NA BIOHEMIJSKE PARAMETRE U JETRI EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

Jednokratno davanje opijata eksperimentalnim životinjama je ispoljilo izvestan uticaj na masu jetre, količinu jetrenih proteina, glutaciona, intenzitet lipidne peroksidacije i aktivnost enzima oksidativnog stresa (katalaze, glutation-peroksidaze, peroksidaze i ksantin-oksidaze). Istraživanjem je utvrđeno da je u izvesnim slučajevima došlo do statistički značajnih promena, nakon 45 i 120 minuta od tretiranja životinja heroinom, u odnosu na životinje koje su predstavljale kontrolnu grupu.

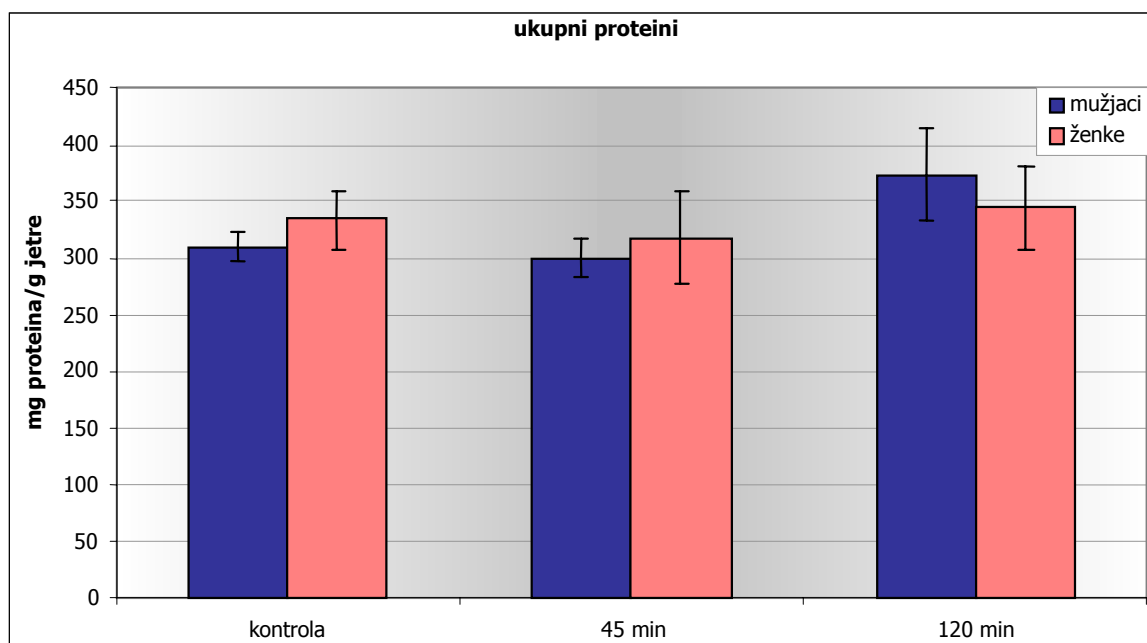
Dobijeni podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SD za 5 eksperimentalnih životinja u grupi, a statistička značajnost razlika u odnosu na kontrolnu grupu je određena Studentovim t - testom, pri čemu je statistička značajnost prihvaćena za $p < 0,05$.

4.8.1. UTICAJ OPIJATA NA RELATIVNU MASU JETRE I SADRŽAJ UKUPNIH PROTEINA

Iz prikazanih rezultata se može uočiti povećanje relativne mase jetre pod uticajem opijata kod mužjaka i ženki pacova, međutim nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu životinja (slika 4.46.).



Slika 4.46. Uticaj opijata na relativnu masu jetre mužjaka i ženki pacova (n=5)

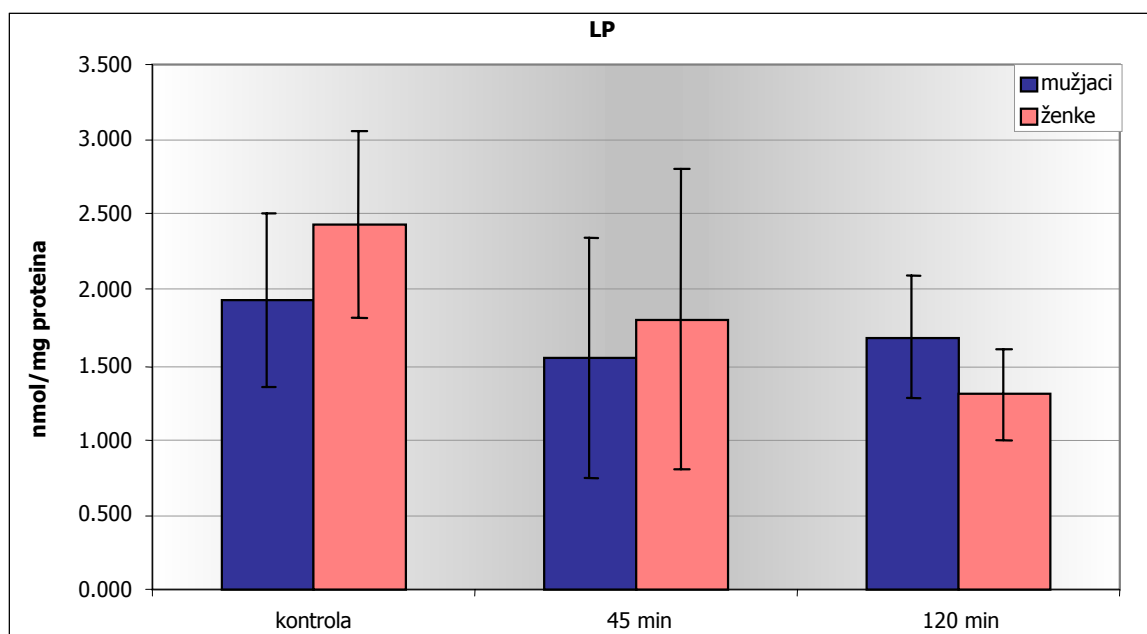


Slika 4.47. Uticaj opijata na sadržaj ukupnih proteina u jetri mužjaka i ženki pacova (n=5)

Navedeni podaci ukazuju na izvesno smanjenje (nakon 45 minuta) i povećanje (nakon 120 minuta) sadržaja ukupnih proteina u jetri mužjaka i ženki pacova, međutim nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu životinja (slika 4.47.).

4.8.2. UTICAJ OPIJATA NA MARKERE OKSIDATIVNOG STRESA U JETRI EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA

4.8.2.1. UTICAJ OPIJATA NA LIPIDNU PEROKSIDACIJU

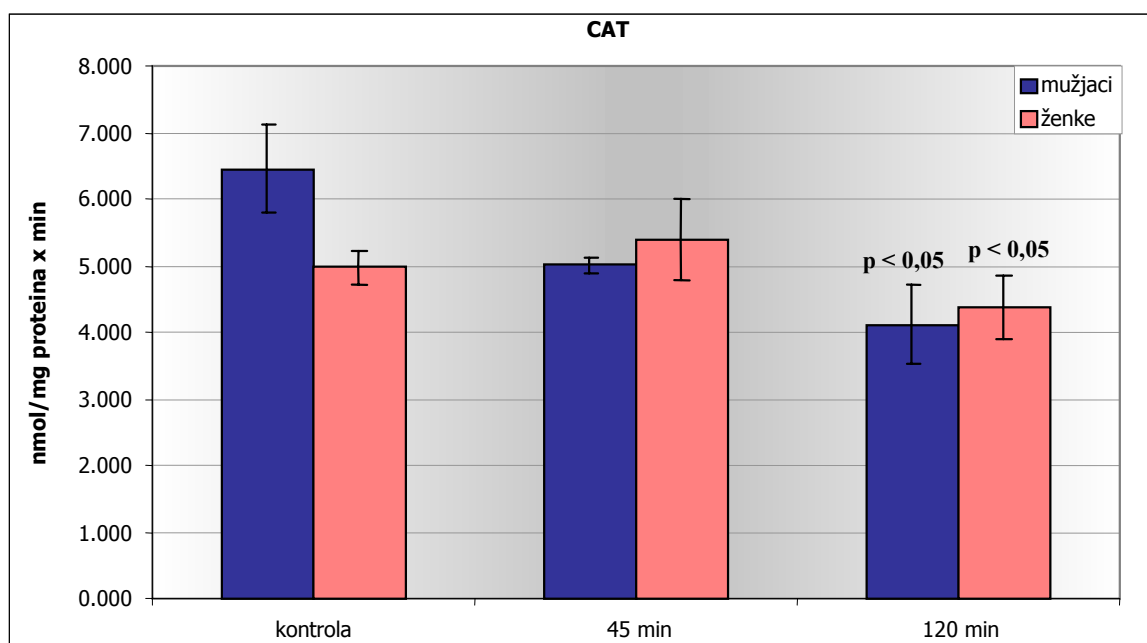


Slika 4.48. Uticaj opijata na LP u jetri mužjaka i ženki pacova (n=5)

Navedeni podaci ukazuju na izvesno smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije kod mužjaka i ženki pacova nakon 45 i 120 minuta, ali nisu utvrđene statistički značajne promene u odnosu na kontrolne vrednosti (slika 4.48.).

4.8.2.2. **UTICAJ OPIJATA NA AKTIVNOST KATALAZE**

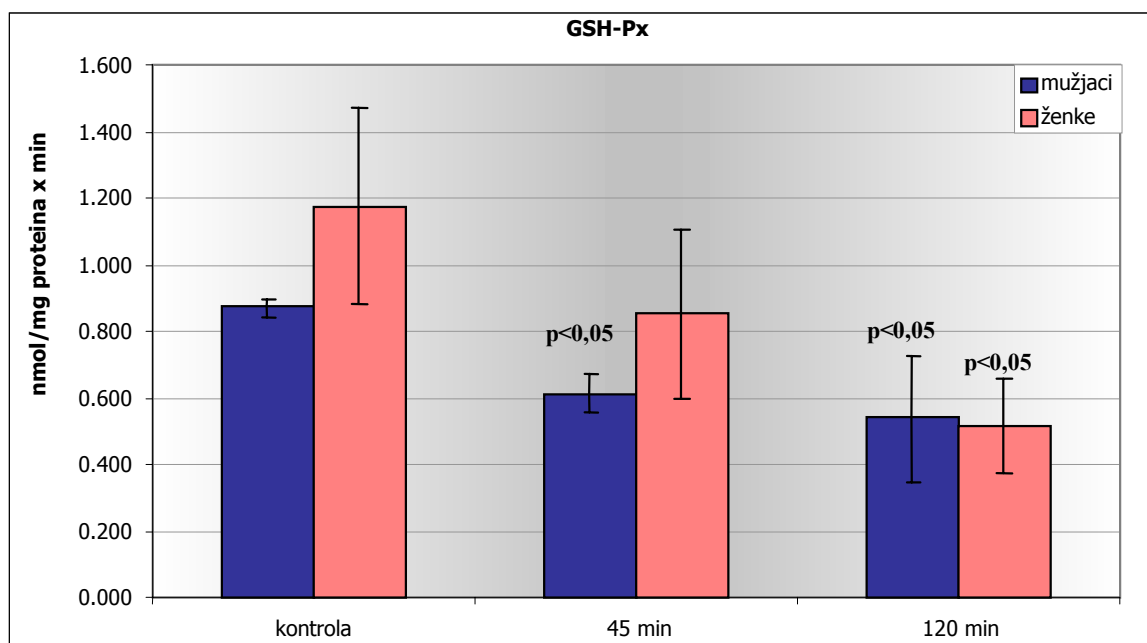
Iz prikazanih rezultata se može uočiti smanjenje aktivnosti katalaze pod uticajem opijata kod mužjaka i ženki pacova. Statistički značajno smanjenje aktivnosti navedenog enzima (u odnosu na kontrolnu grupu) od 36 % kod mužjaka i 19 % kod ženki, određeno je nakon 120 minuta od tretiranja heroinom (slika 4.49.).



Slika 4.49. Uticaj opijata na aktivnost CAT u jetri mužjaka i ženki pacova (n=5)

4.8.2.3. **UTICAJ OPIJATA NA AKTIVNOST GLUTATION-PEROKSIDAZE**

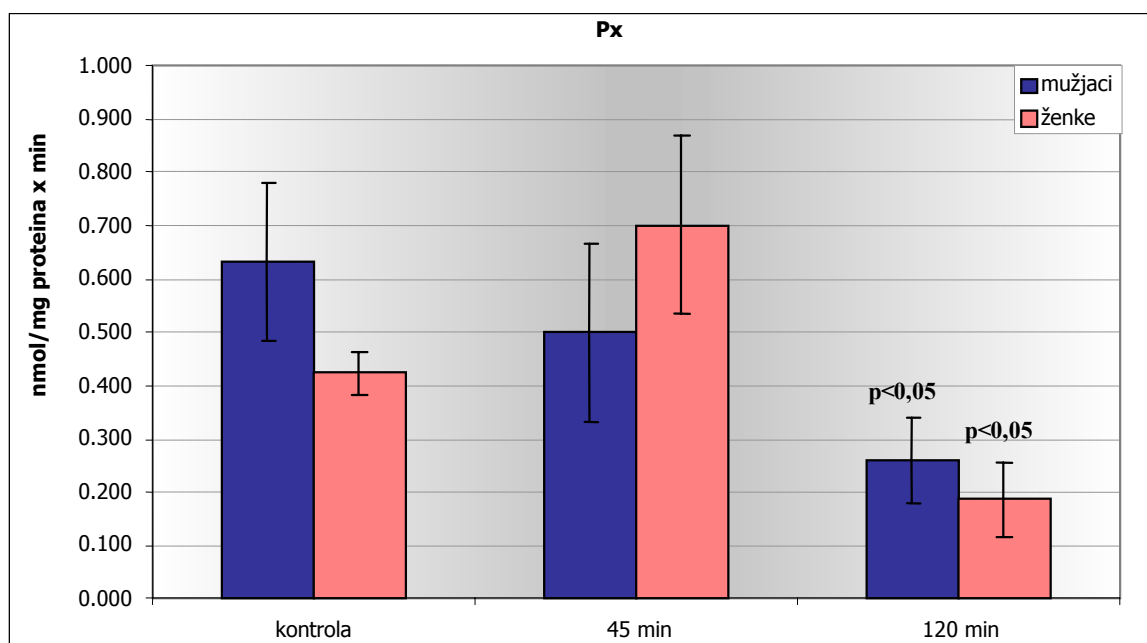
Prikazani rezultati ukazuju na smanjenje aktivnosti glutacion-peroksidaze, a statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu životinja su utvrđene kod mužjaka nakon 45 (smanjenje od 29 %) i 120 minuta (smanjenje od 38 %). Kod ženki je statistički značajno smanjenje aktivnosti navedenog enzima (od 56 %) utvrđeno nakon 120 minuta (slika 4.50.).



Slika 4.50. Uticaj opijata na aktivnost GSH-Px u jetri mužjaka i ženki pacova (n=5)

4.8.2.4. UTICAJ OPIJATA NA AKTIVNOST PEROKSIDAZE

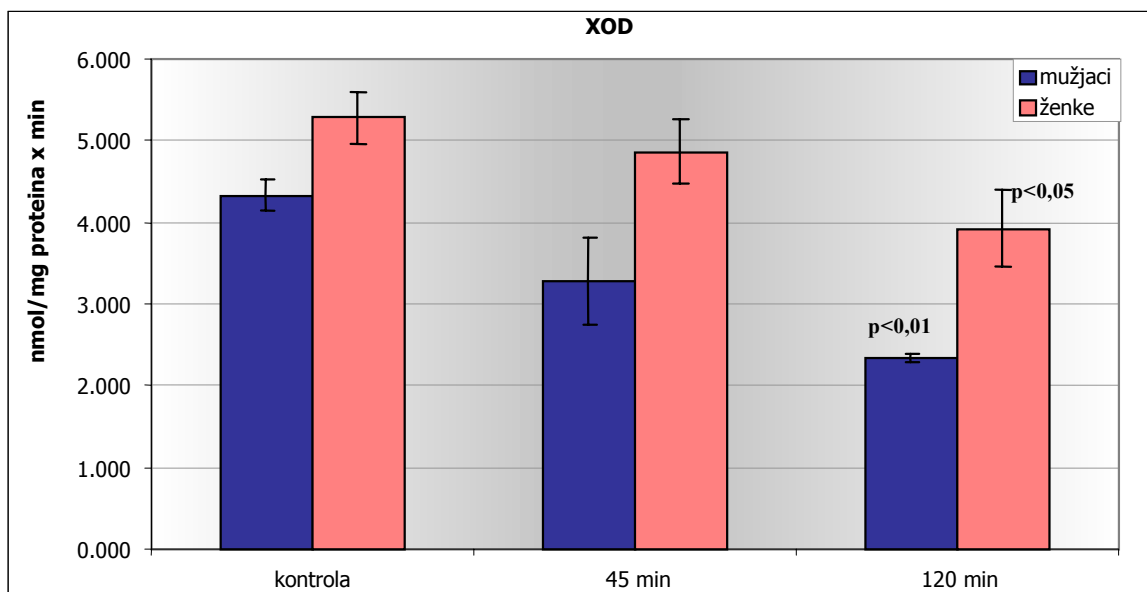
Eksperimentalni podaci ukazuju na statistički značajno smanjenje aktivnosti peroksidaze od 59 % u jetri mužjaka i 56 % u jetri ženki pacova nakon 120 minuta od tretiranja heroinom (slika 4.51.).



Slika 4.51. Uticaj opijata na aktivnost Px u jetri mužjaka i ženki pacova (n=5)

4.8.2.5. **UTICAJ OPIJATA NA AKTIVNOST KSANTIN-OKSIDAZE**

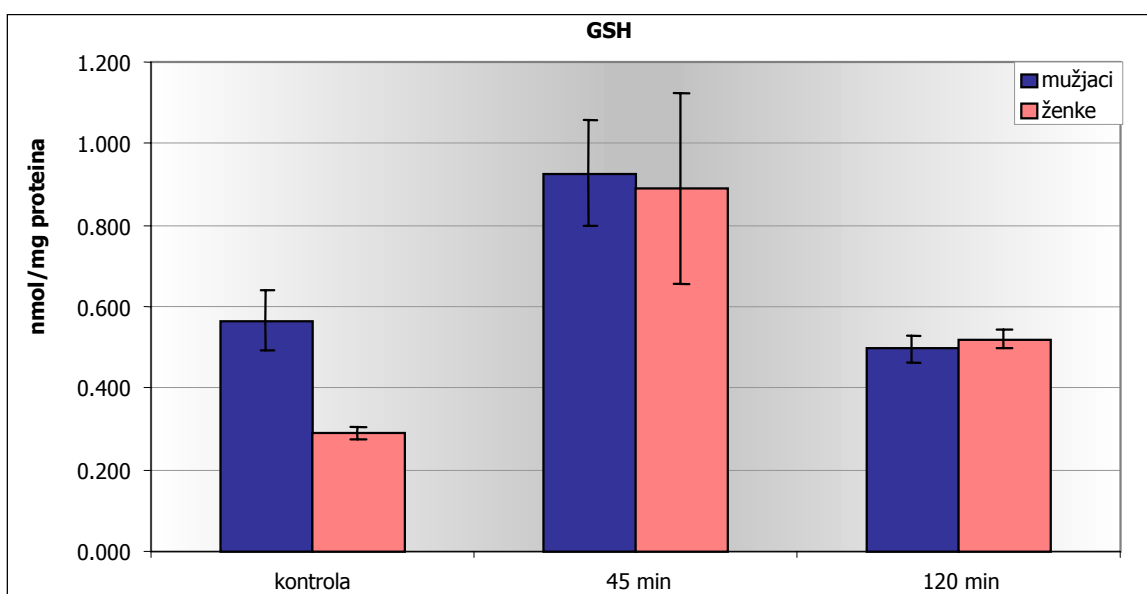
Iz prikazanih rezultata se može uočiti statistički značajno smanjenje aktivnosti ksantin-oksidaze pod uticajem opijata od 46 % kod mužjaka i 26 % kod ženki pacova, nakon 120 minuta od tretiranja heroinom (slika 4.52.).



Slika 4.52. Uticaj opijata na aktivnost XOD u jetri mužjaka i ženki pacova (n=5)

4.8.2.6. **UTICAJ OPIJATA NA KOLIČINU REDUKOVANOG GLUTATIONA**

Prikazani rezultati ukazuju na izvesno povećanje sadržaja GSH nakon 45 minuta, a potom smanjenje nakon 120 minuta, kod mužjaka i ženki pacova, međutim dobijeni podaci nisu od statističkog značaja (slika 4.53.).



Slika 4.53. Uticaj opijata na količinu redukovano GSH u jetri mužjaka i ženki pacova (n=5)

4.9. POREĐENJE VREDNOSTI BIOHEMIJSKIH PARAMETARA JETRE KOD EKSPERIMENTALNIH ŽIVOTINJA SUPROTNIH POLOVA

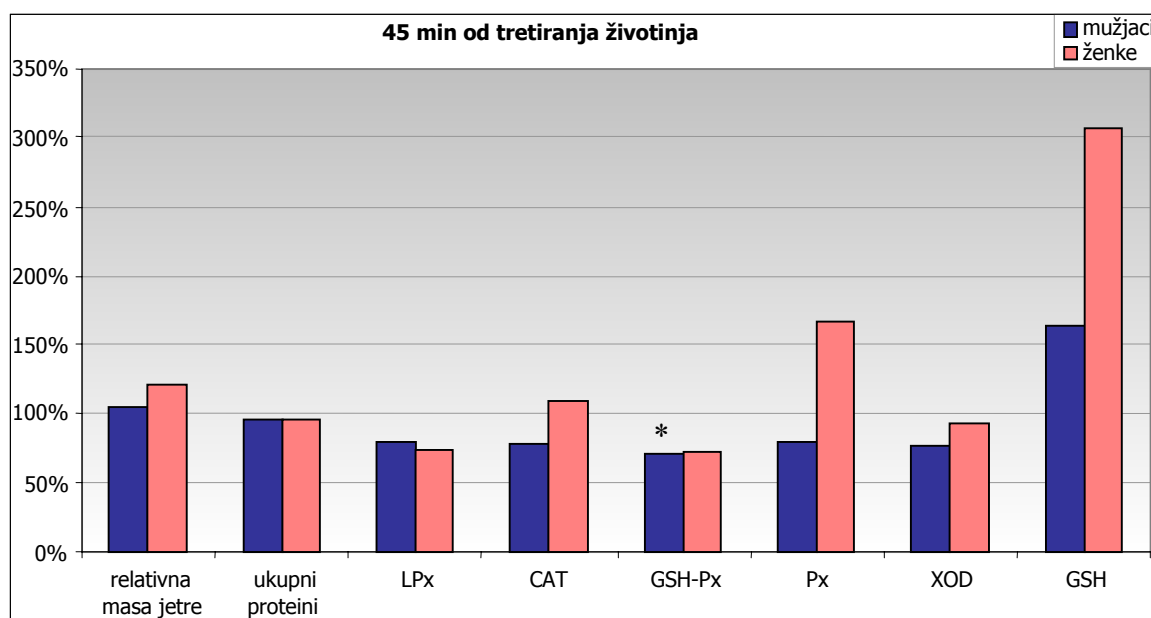
Zbirni uticaj opijata na relativnu masu jetre, sadržaj ukupnih proteina, glutaciona, intenzitet lipidne peroksidacije i aktivnost enzima oksidativnog stresa (katalaze, glutation-peroksidaze, peroksidaze i ksantin-oksidge) u jetri mužjaka i ženki pacova, nakon 45 i 120 minuta od tretiranja životinja heroinom je prikazan na slikama 4.54., odnosno 4.55.

Podaci su prikazani kao procentualne vrednosti u odnosu na kontrolne vrednosti (100 %) dobijene analizom jetre životinja tretiranih fiziološkim rastvorom.

Poređenjem uticaja opijata na ispitivane parametre u jetri eksperimentalnih životinja nakon 45 minuta od tretiranja heroinom (u odnosu na kontrolne vrednosti), može se uočiti kod pripadnika oba pola životinja (slika 4.54.):

- povećanje relativne mase jetre i sadržaja glutaciona,
- smanjenje sadržaja ukupnih proteina, intenziteta lipidne peroksidacije, aktivnosti glutacion-peroksidaze i ksantin-oksidge.

Uticaj opijata na aktivnost katalaze i peroksidaze se razlikuje kod mužjaka i ženki pacova. Naime, kod ženki se može uočiti povećanje, a kod mužjaka smanjenje aktivnosti navedenih enzima.

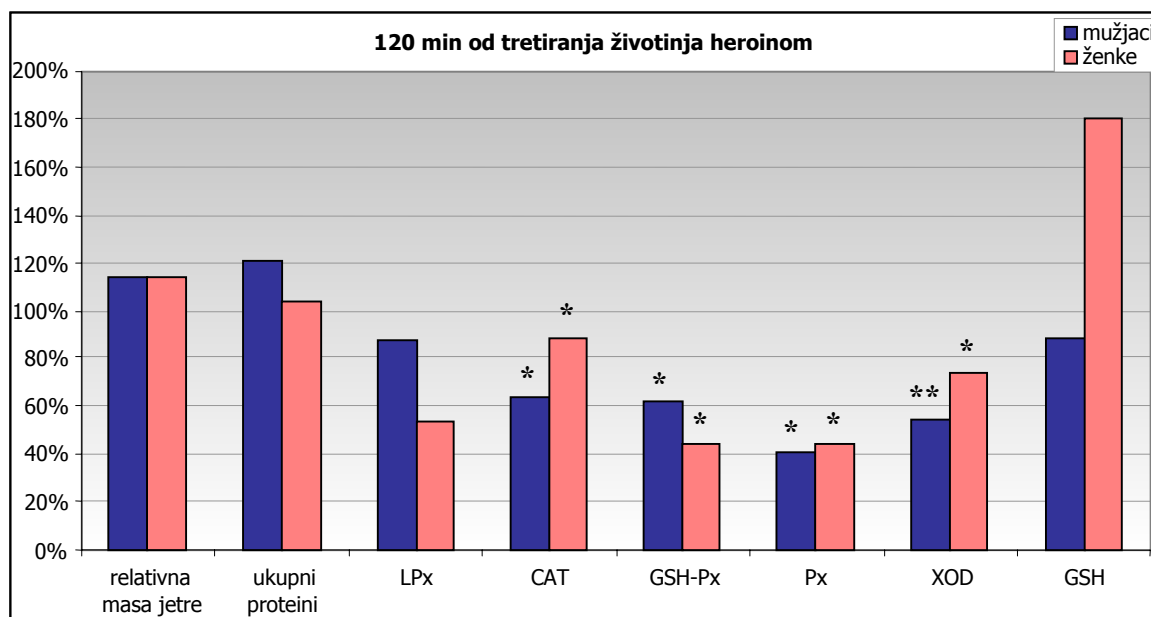


Slika 4.54. Zbirni uticaj opijata na ispitivane parametre u jetri mužjaka i ženki pacova nakon 45 minuta od tretiranja heroinom (n=5; *p<0,05)

Nakon 120 minuta od tretiranja eksperimentalnih životinja heroinom, može se uočiti podjednak uticaj opijata na sve ispitivane parametre u jetri mužjaka i ženki pacova (slika 4.55):

- povećanje relativne mase jetre i sadržaja ukupnih proteina,
- smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije, aktivnosti katalaze, glutation-peroksidaze, peroksidaze i ksantin-oksidge,

izuzev sadržaja glutaciona, koji je veći kod ženki, a manji kod mužjaka u odnosu na kontrolne vrednosti.



Slika 4.55. Zbirni uticaj opijata na ispitivane parametre u jetri mužjaka i ženki pacova nakon 120 minuta od tretiranja heroinom (n=5; *p<0,05; **p<0,01)

Iz navedenih podataka se može uočiti da opijati nisu ispoljili statistički značajan uticaj, ispitivanjem promene relativne mase jetre, sadržaja ukupnih proteina, intenziteta lipidne peroksidacije i sadržaja glutaciona, u ispitivanim vremenskim periodima.

Podaci iz literature ukazuju na indukciju lipidne peroksidacije usled hronične upotrebe morfina i heroina, što prouzrokuje oksidativna oštećenja (*Correia i sar., 1984; Di Bello i sar., 1998; Panchenko i sar., 1999*).

Literaturni podaci (*Correia i sar., 1984; Payabvash i sar., 2006*), koji se odnose na aktivnost GSH ukazuju na smanjenje koncentracije jetrenog glutaciona indukovano morfinom.

U ovom radu, utvrđeno je smanjenje aktivnosti sledećih ispitivanih enzima: CAT, GSH-Px, Px i XOD i kod mužjaka i ženki pacova, koje je statistički značajno u odnosu na kontrolne vrednosti, nakon 120 minuta od tretiranja životinja heroinom. To se može objasniti činjenicom da je posledica upotrebe opijata, smanjenje antioksidantne odbrane jetrenih

ćelija. Stoga, smanjenje aktivnosti navedenih enzima objašnjava pojavu oksidativnog stresa u jetri.

Ovi rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima (*Payabvash i sar., 2006*) koji ukazuju na hepatotoksične efekte morfina, što prouzrokuje indukciju oksidativnog stresa u jetri eksperimentalnih životinja, tj. apoptozu u hepatocitima, usled smanjenja aktivnosti GSH-Px, SOD i CAT.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Za izolovanje opijatnih alkaloida iz humanih bioloških uzoraka: moždanog tkiva, krvi, urina i žuči, kao i bioloških uzoraka eksperimentalnih životinja: moždanog tkiva i krvi, uspešno je primenjen postupak čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE - Solid Phase Extraction) na SPE kolonama Extrelut-NT20 i AccuBOND EVIDEXII 400 mg/6 ml.
- Za humane biološke uzorke, obrađene na SPE kolonama Extrelut-NT 20, stvarni prinos (recovery) je iznosio 70 - 80 %, a za biološke uzorke eksperimentalnih životinja, obrađene na SPE kolonama AccuBOND EVIDEXII 400mg/6 ml, recovery je iznosio 80 - 90 %.
- Modifikovan je postupak kvalitativne i kvantitativne GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) analize bioloških uzoraka, na taj način što nakon obrade uzoraka na SPE kolonama nije vršena derivatizacija ekstrakta, što je inače uobičajeni postupak u literaturi. Naime, adekvatna identifikacija i kvantifikacija polarnih opijatnih alkaloida je omogućena povećanjem vrednosti parametra EMV (electron multiplier voltage) masenog detektora za 500 i 200 jedinica u vremenskim periodima u okviru kojih se detektuju morfin, odnosno 6-acetilmorfin u toku hromatografske analize. Time je vreme pripreme uzoraka znatno skraćeno i izbegnuta je kontaminacija dela GC-MS sistema za unos uzoraka (inlet), veoma agresivnim reagensima za derivatizaciju.
- Kvalitativnom i kvantitativnom GC-MS analizom utvrđena je distribucija opijatnih alkaloida: morfina, kodeina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u **humanim biološkim uzorcima moždanog tkiva** (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima). Ispitivanja su vršena na humanim biološkim uzorcima gde ne postoji mogućnost za precizno utvrđivanje količine opijata ili medikamenata koje su osobe konzumirale neposredno pre smrtnog ishoda.

- Kvalitativnom GC-MS analizom bioloških uzoraka krvi, urina i žuči 29 osoba, za koje se pretpostavljalo (od strane obducenta) da je uzrok smrti intoksikacija drogama ili lekovima, utvrđeno je prisustvo opijatnih alkaloida, benzodiazepinskih preparata, tramadola, metadona ili kokaina, što je predstavljalo selekcionu kriterijum za kvalitativnu i kvantitativnu GC-MS analizu delova moždanog tkiva (moždane kore, moždanog stabla, amigdale i bazalnih jedara) pomenutih 29 osoba.

Važno je napomenuti da je analizom bioloških uzoraka krvi, urina i žuči 29 osoba, kod 6 osoba utvrđeno prisustvo benzodiazepinskih preparata ili metadona, pri čemu nisu identifikovani opijatni alkaloidi. Međutim, analizom delova moždanog tkiva (moždane kore, moždanog stabla, amigdale i bazalnih jedara) pomenutih 6 osoba, pored navedenih medikamenata, ipak su identifikovani i opijatni alkaloidi, što ukazuje na njihov duži boravak u moždanom tkivu, pa se na taj način mogu identifikovati.

Dobijeni rezultati ukazuju na neophodnost analize moždanog tkiva, pored uobičajenih analiza uzoraka krvi, urina i žuči u smrtnim slučajevima kada postoji sumnja na intoksikaciju opijatima.

- Od ukupno 29 analiziranih uzoraka moždanog tkiva (24 muških i 5 ženskih osoba), morfin je identifikovan u 28 uzoraka, 6-acetilmorfin u 26 uzoraka, heroin u 24 uzoraka, kodein u 20 uzoraka i acetilkodein u 7 uzoraka. Iz navedenih podataka se može zaključiti da su osobe konzumirale drogu - heroin sa najvećim sadržajem opijatnih alkaloida 6-acetilmorfina i 3,6-diacetilmorfina (heroina), a koji podleže biotransformaciji u morfin. Acetilkodein je prisutan u manjoj količini i podleže biotransformaciji u kodein.
- Kvantitativnom GC-MS analizom je utvrđen ukupan sadržaj opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva 29 osoba (24 muških i 5 ženskih osoba) i iznosi od 6,4 do 883,6 ng/g (3,3 % - 60,5 %).

MOŽDANO TKIVO MUŠKIH OSOBA

Analizom delova moždanog tkiva muških osoba, najveća procentualna zastupljenost **ukupnih opijatnih alkaloida** je određena u moždanoj kori (37 %) i bazalnim jedrima (29 %), a najmanja u moždanom stablu (13 %), dok je u amigdali njihova zastupljenost 21 %.

- Sadržaj pojedinačnih opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva analiziranih uzoraka muških osoba iznosi: 0 - 218,2 ng/g kodeina, 0 - 358,6 ng/g morfina, 0 - 51,4 ng/g acetilkodeina, 0 - 149,5 ng/g 6-acetilmorfina i 0 - 189,3 ng/g heroina.
- Najveća procentualna zastupljenost **kodeina** je određena u bazalnim jedrima (43 %) i amigdali (38 %), a najmanja u moždanom stablu (0 %), dok je u moždanoj kori njegova zastupljenost 19 %.

- Najveća procentualna zastupljenost **morfina** je određena u moždanoj kori (35 %) i bazalnim jedrima (30 %), a najmanja u moždanom stablu (13 %), dok je u amigdali njegova zastupljenost 22 %.
- Najveća procentualna zastupljenost **acetilkodeina** je određena u moždanoj kori (60 %), a najmanju u moždanom stablu (0 %), dok je u amigdali i bazalnim jedrima utvrđena njegova podjednaka zastupljenost od 20 %.
- Najveća procentualna zastupljenost **6-acetilmorfina** je određena u amigdali (39 %) i moždanoj kori (33 %), a podjednaka zastupljenost u moždanom stablu i bazalnim jedrima od 14 %.
- Najveća procentualna zastupljenost **heroina** je određena u moždanoj kori (45 %) i amigdali (25 %), a podjednaka zastupljenost u moždanom stablu i bazalnim jedrima od 15 %.

Sumiranjem svih rezultata, dobijenih analizom distribucije opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva, može se zaključiti da su navedeni opijatni alkaloidi procentualno zastupljeni:

- najviše u moždanoj kori: 19 - 60 % i
- bazalnim jedrima: 14 - 43 %,
- najmanje u moždanom stablu: 0 - 15 %,
- njihova zastupljenost u amigdali je: 20 - 39 %.

Ovi rezultati su u saglasnosti sa distribucijom ukupnih opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva muških osoba.

Okako dobijeni rezultati pružaju mogućnost selekcije delova moždanog tkiva i to: **moždane kore i bazalnih jedara**, kao pouzdanih uzoraka za identifikaciju i utvrđivanje sadržaja opijata kod muških osoba.

MOŽDANO TKIVO ŽENSKIH OSOBA

Analizom delova moždanog tkiva ženskih osoba, najveća procentualna zastupljenost **ukupnih opijatnih alkaloida** je određena u bazalnim jedrima (40 %), dok je u moždanoj kori, moždanom stablu i amigdali utvrđena njihova podjednaka zastupljenost od 20 %.

- Sadržaj pojedinačnih opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva analiziranih uzoraka ženskih osoba iznosi: 0 - 342,9 ng/g kodeina, 4,5 - 180,9 ng/g morfina, 0 - 20,3 ng/g acetilkodeina, 4,8 - 88,8 ng/g 6-acetilmorfina i 0 - 24,5 ng/g heroina.
- Najveća procentualna zastupljenost **kodeina** je određena u amigdali (75 %), a najmanja zastupljenost, podjednako u moždanoj kori i moždanom stablu (0 %), dok je u bazalnim jedrima njegova zastupljenost 25 %.

- Najveća procentualna zastupljenost **morfina** je određena podjednako u moždanom stablu i amigdali (40 %), a najmanja u bazalnim jedrima (0 %), dok je u moždanoj kori njegova zastupljenost 20 %.
- Najveća procentualna zastupljenost **acetilkodeina** je određena podjednako u moždanom stablu i bazalnim jedrima (50 %), a najmanja, podjednako u moždanoj kori i amigdali (0 %).
- Najveća procentualna zastupljenost **6-acetilmorfina** je određena podjednako u moždanoj kori i moždanom stablu (40 %), a najmanja u amigdali (0 %), dok je njegova zastupljenost u bazalnim jedrima 20 %.
- Najveća procentualna zastupljenost **heroina** je određena u moždanom stablu (50 %), a najmanja u bazalnim jedrima (0 %), dok je u moždanoj kori i amigdali utvrđena njegova podjednaka zastupljenost od 25 %.

Sumiranjem svih rezultata, dobijenih analizom distribucije opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva, može se zaključiti da su navedeni opijatni alkaloidi procentualno zastupljeni:

- najviše u amigdali: 0 - 75 %,
- bazalnim jedrima: 0 - 50 % i
- moždanoj kori: 0 - 50 %, a
- najmanje u moždanom stablu: 0 - 40 %.

Ovi rezultati su u saglasnosti sa distribucijom ukupnih opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva ženskih osoba.

Okako dobijeni rezultati pružaju mogućnost selekcije delova moždanog tkiva i to: **amigdale, moždane kore i bazalnih jedara**, kao pouzdanih uzoraka za identifikaciju i utvrđivanje sadržaja opijata kod ženskih osoba.

Poređenjem eksperimentalnih rezultata, dobijenih na osnovu distribucije svih ispitivanih opijatnih alkaloida u moždanom tkivu muških i ženskih osoba, utvrđeno je da je najveća procentualna zastupljenost opijata kod muških osoba u:

- moždanoj kori (19 - 60 %) i
- bazalnim jedrima (14 - 43 %),

a kod ženskih osoba u

- amigdali (0 - 75 %) i
- podjednako u moždanoj kori i bazalnim jedrima (0 - 50 %).

Najmanja procentualna zastupljenost opijata je utvrđena u moždanom stablu kod pripadnika oba pola (0 - 15 % kod pripadnika muškog pola i 0 - 40 % kod pripadnica ženskog pola).

- Dobijeni eksperimentalni rezultati su od izuzetnog značaja jer pružaju mogućnost selekcije istih delova moždanog tkiva kod muških i ženskih osoba, i to: **moždane kore i bazalnih jedara**, čijom analizom bi se doprinelo razrešenju uzroka smrti prouzrokovane konzumiranjem heroina.
- Kvantitativnom GC-MS analizom je utvrđena distribucija opijatnih alkaloida: morfina, kodeina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u **biološkim uzorcima moždanog tkiva** (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima) **i krvi eksperimentalnih životinja (pacova)**.
- Da bi se omogućilo adekvatno poređenje rezultata analize humanih i moždanih tkiva eksperimentalnih životinja, za tretiranje životinja je korišćen heroin - zaplenjena droga, što predstavlja inovaciju u odnosu na ranija istraživanja u kojima su životinje tretirane čistim supstancama heroinom ili morfinom.
- Određena je optimalna doza heroina od 25 mg/kg (računato na sadržaj 3,6-diacetilmorfina i 6-acetilmorfina u smeši) kojom su tretirane eksperimentalne životinje.
- Utvrđen je optimalni vremenski period, koji za sve eksperimente iznosi 120 minuta, stoga su biološki uzorci uzimani za analizu u okviru navedenog vremenskog perioda, tj. nakon 5, 15, 45 i 120 minuta.
U toku eksperimenta, sve životinje su se podjednako ponašale nakon tretiranja dozom heroina od 25 mg/kg, mirovale su u uglu kaveza, pri čemu je 67 % mužjaka i 100 % ženki preživelo navedenu dozu heroina u toku 120 minuta.

MOŽDANO TKIVO MUŽJAKA PACOVA

Analizom sadržaja **ukupnih opijatnih alkaloida** u delovima moždanog tkiva (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima) mužjaka pacova u toku 120 minuta, utvrđen je:

- nagli porast koncentracije u svim delovima moždanog tkiva nakon 45 minuta od tretiranja životinja heroinom, pri čemu su najveće koncentracije određene u amigdali ($1318,7 \pm 121,5$ ng/g) i bazalnim jedrima ($1025,3 \pm 80,7$ ng/g), a najmanje u moždanoj kori ($741,9 \pm 53,1$ ng/g) i
- nagli pad koncentracije opijata u svim delovima moždanog tkiva nakon 120 minuta, pri čemu su najveće koncentracije određene u bazalnim jedrima ($304,4 \pm 42,5$ ng/g) i moždanoj kori ($235,8 \pm 31,3$ ng/g), a najmanje u amigdali ($124,8 \pm 14,5$ ng/g).

Navedene vrednosti koncentracija ukupnih opijatnih alkaloida su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Analizom sadržaja pojedinačnih opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva mužjaka pacova u toku 120 minuta, utvrđen je:

- nagli porast koncentracije u svim delovima moždanog tkiva nakon 45 minuta od tretiranja životinja heroinom, pri čemu maksimalne vrednosti koncentracija iznose za:
 - ◆ **kodein**: $581,3 \pm 120,8$ ng/g (u amigdali; $p < 0,01$),
 - ◆ **6-acetilmorfin**: $319,5 \pm 87,0$ ng/g (u amigdali; $p < 0,05$),
 - ◆ **acetilkodein** $245,4 \pm 61,0$ ng/g (u amigdali; $p < 0,05$),
 - ◆ **morfin**: $189,2 \pm 54,0$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,05$) i
 - ◆ **heroin**: $20,8 \pm 8,2$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,05$) i
- nagli pad koncentracije u svim delovima moždanog tkiva nakon 120 minuta, a maksimalne vrednosti koncentracija iznose za:
 - ◆ **kodein**: $143,2 \pm 15,0$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,01$),
 - ◆ **morfin**: $129,4 \pm 20,4$ ng/g (u bazalnim jedrima),
 - ◆ **6-acetilmorfin**: $35,3 \pm 14,8$ ng/g (u moždanoj kori),
 - ◆ **acetilkodein** $22,4 \pm 9,5$ ng/g (u amigdali; $p < 0,01$) i
 - ◆ **heroin**: $6,2 \pm 1,8$ ng/g (u amigdali).

Rezultati dobijeni analizom distribucije pojedinačnih opijatnih alkaloida u moždanom tkivu mužjaka pacova u različitom vremenskom periodu, su u saglasnosti sa rezultatima koji ukazuju na nagli porast sadržaja ukupnih opijata nakon 45 minuta, sa najvećom procentualnom zastupljenošću u amigdali (33 %) i bazalnim jedrima (26 %).

Nagli pad sadržaja ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida je utvrđen u svim delovima moždanog tkiva nakon 120 minuta i to sa najvećom procentualnom zastupljenošću u bazalnim jedrima (34 %) i moždanoj kori (27 %).

UZORCI KRVI MUŽJAKA PACOVA

Utvrđen je nagli porast koncentracije **ukupnih opijata** ($2994,5 \pm 505,5$ ng/ml) kao i pojedinačnih opijatnih alkaloida:

- ◆ **6-acetilmorfina** ($1375,3 \pm 220,8$ ng/ml),
- ◆ **kodeina** ($703,0 \pm 100,5$ ng/ml),
- ◆ **morfina** ($693,8 \pm 158,9$ ng/ml),
- ◆ **acetilkodeina** ($201,8 \pm 80,6$ ng/ml) i
- ◆ **heroina** ($20,6 \pm 12,5$ ng/ml)

nakon 15 minuta od tretiranja životinja heroinom. Sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida, 6-acetilmorfina, acetilkodeina i heroina je statistički značajan, za razliku od sadržaja kodeina i morfina.

Na osnovu dobijenih rezultata, poređenjem koncentracija ukupnih opijata u krvi ($2994,5 \pm 505,5$ ng/ml) i delovima moždanog tkiva ($741,9 \pm 53,1$ - $1318,7 \pm 121,5$ ng/g), kada je određen njihov najveći sadržaj, može se zaključiti sledeće:

- u uzorcima krvi se maksimalan sadržaj opijata detektuje nakon 15 minuta, dok se u moždanom tkivu detektuje tek nakon 45 minuta od tretiranja životinja heroinom, što ukazuje na sporiju distribuciju opijata iz krvi u moždano tkivo mužjaka pacova.

MOŽDANO TKIVO ŽENKI PACOVA

Analizom sadržaja **ukupnih opijatnih alkaloida** u delovima moždanog tkiva (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima) ženki pacova u toku 120 minuta, utvrđen je:

- nagli porast koncentracije opijatnih alkaloida u svim delovima moždanog tkiva nakon 15 minuta od tretiranja životinja heroinom, pri čemu su najveće koncentracije opijata određene u moždanoj kori ($972,8 \pm 147,1$ ng/g), bazalnim jedrima ($956,1 \pm 87,1$ ng/g) i moždanom stablu ($954,8 \pm 169,5$ ng/g), a najmanje u amigdali ($706,8 \pm 55,7$ ng/g) i
- pad koncentracije opijata nakon 120 minuta, pri čemu su određene približno iste vrednosti u svim delovima moždanog tkiva, a neznatno veće u amigdali ($290,5 \pm 41,0$ ng/g) i bazalnim jedrima ($263,1 \pm 28,5$ ng/g).

Navedene vrednosti koncentracija ukupnih opijatnih alkaloida su statistički značajne u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Analizom sadržaja pojedičinskih opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva ženki pacova u toku 120 minuta, utvrđen je:

- nagli porast koncentracije u svim delovima moždanog tkiva nakon 15 minuta od tretiranja životinja heroinom, pri čemu maksimalne vrednosti koncentracija iznose za:
 - ◆ **kodein:** $484,9 \pm 86,8$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,01$),
 - ◆ **6-acetilmorfin:** $346,6 \pm 54,4$ ng/g (u moždanoj kori; $p < 0,05$),
 - ◆ **acetilkodein** $155,1 \pm 73,0$ ng/g (u moždanom stablu; $p < 0,05$),
 - ◆ **morfin:** $94,6 \pm 15,8$ ng/g (u moždanom stablu; $p < 0,05$) i
 - ◆ **heroin:** $19,9 \pm 6,8$ ng/g (u moždanom stablu; $p < 0,05$) i
- nagli pad koncentracije u svim delovima moždanog tkiva nakon 120 minuta, pri čemu maksimalne vrednosti koncentracija iznose za:
 - ◆ **kodein:** $152,3 \pm 78,5$ ng/g (u bazalnim jedrima; $p < 0,05$),
 - ◆ **6-acetilmorfin:** $93,1 \pm 39,1$ ng/g (u amigdali),

- ◆ **acetilkodein** $43,5 \pm 12,0$ ng/g (u moždanoj kori; $p < 0,05$),
- ◆ **morfin**: $23,3 \pm 8,1$ ng/g (u moždanoj kori; $p < 0,05$) i
- ◆ **heroin**: $13,5 \pm 5,8$ ng/g (u bazalnim jedrima).

Rezultati dobijeni analizom distribucije pojedinačnih opijatnih alkaloida u moždanom tkivu ženki pacova u različitom vremenskom periodu, su u saglasnosti sa rezultatima koji ukazuju na nagli porast sadržaja ukupnih opijata nakon 15 minuta, sa najvećom procentualnom zastupljenošću u moždanoj kori (27 %) i bazalnim jedrima (27 %).

Smanjenje sadržaja ukupnih i pojedinačnih opijatnih alkaloida je utvrđeno u svim delovima moždanog tkiva nakon 120 minuta, pri čemu je njihova najveća procentualna zastupljenost u amigdali (28 %), bazalnim jedrima (25 %) i moždanoj kori (25 %).

UZORCI KRVI ŽENKI PACOVA

Utvrđen je nagli porast koncentracije **ukupnih opijata** ($1423,1 \pm 139,2$ ng/ml) kao i pojedinačnih opijatnih alkaloida:

- ◆ **kodeina** ($748,3 \pm 97,9$ ng/ml),
- ◆ **6-acetilmorfina** ($390,1 \pm 84,9$ ng/ml),
- ◆ **morfina** ($202,9 \pm 37,1$ ng/ml),
- ◆ **acetilkodeina** ($63,4 \pm 14,5$ ng/ml) i
- ◆ **heroina** ($18,4 \pm 1,6$ ng/ml)

nakon 15 minuta od tretiranja životinja heroinom. Sadržaj ukupnih opijatnih alkaloida, kodeina, 6-acetilmorfina, morfina i heroina je statistički značajan, za razliku od sadržaja acetilkodeina.

Na osnovu dobijenih rezultata, poređenjem koncentracija ukupnih opijata u krvi ($1423,1 \pm 139,2$ ng/ml) i delovima moždanog tkiva ($706,8 \pm 55,7$ - $972,8 \pm 147,1$ ng/g), kada je određen njihov najveći sadržaj, može se zaključiti sledeće:

- u uzorcima krvi, kao i u moždanom tkivu se maksimalan sadržaj opijata detektuje nakon 15 minuta od tretiranja životinja heroinom, što ukazuje na brzu distribuciju opijata iz krvi u moždano tkivo ženki pacova.
- Utvrđene su razlike u distribuciji opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva eksperimentalnih životinja.
- Najveći sadržaj opijata je određen u moždanom tkivu ženki nakon 15 minuta, a kod mužjaka nakon 45 minuta, što ukazuje na bržu distribuciju opijata iz krvi u mozak kod ženki u odnosu na mužjake pacova.

Ako se uporedi distribucija opijata u moždanom tkivu životinja oba pola, kada je određen njihov najveći i najmanji sadržaj, može se uočiti da je najveća procentualna zastupljenost opijata određena:

- kod ženki u moždanoj kori i bazalnim jedrima nakon 15 minuta,
- kod mužjaka u amigdali i bazalnim jedrima nakon 45 minuta,
- kod ženki u amigdali, bazalnim jedrima i moždanoj kori nakon 120 minuta i
- kod mužjaka u moždanoj kori i bazalnim jedrima nakon 120 minuta.

Iz navedenog se može zaključiti da je najveća procentualna zastupljenost opijata određena u istim delovima moždanog tkiva životinja oba pola, ali u različitim vremenskim periodima. Takođe, može se uočiti da su kod oba pola u svim vremenskim periodima opijati zastupljeni u bazalnim jedrima.

Utvrđen je maksimalan sadržaj opijata u istom vremenskom periodu (15 minuta) u krvi eksperimentalnih životinja oba pola. Međutim, kod mužjaka su određene znatno veće vrednosti koncentracija opijata ($2994,5 \pm 505,5$ ng/ml), u odnosu na ženke ($1423,1 \pm 139,2$ ng/ml), što se može objasniti bržom distribucijom opijata iz krvi u moždano tkivo ženki.

Imajući u vidu da su ispitivanja vršena na humanim biološkim uzorcima gde ne postoji mogućnost za precizno utvrđivanje količine opijata koje su osobe konzumirale neposredno pre smrtnog ishoda i na biološkim uzorcima eksperimentalnih životinja gde su omogućeni kontrolisani uslovi, zaključeno je:

- da su od izuzetnog značaja za ovaj rad eksperimentalni podaci kojima se potvrđuje da je distribucija opijata u humanom moždanom tkivu kod pripadnika suprotnih polova kao i moždanom tkivu mužjaka i ženki pacova (nakon 120 minuta od tretiranja heroinom), identična i
- da je određen najveći sadržaj opijata u moždanoj kori i bazalnim jedrima kod pripadnika muškog pola (ljudi i eksperimentalnih životinja), a kod pripadnica ženskog pola (ljudi i eksperimentalnih životinja) je najveći sadržaj opijata određen u amigdali, moždanoj kori i bazalnim jedrima.

Ispitivanjem uticaja opijata na markere oksidativnog stresa u jetri eksperimentalnih životinja suprotnih polova, utvrđeno je:

- smanjenje aktivnosti, koje je statistički značajno u odnosu na kontrolne vrednosti (nakon 120 minuta od tretiranja životinja heroinom), i to za:
 - ◆ katalazu - **CAT** (36 % kod mužjaka; 19 % kod ženki),
 - ◆ glutation-peroksidazu - **GSH-Px** (38 % kod mužjaka; 56 % kod ženki),
 - ◆ peroksidazu - **Px** (59 % kod mužjaka; 56 % kod ženki) i

- ◆ ksantin-oksidadu - **XOD** (46 % kod mužjaka; 26 % kod ženki) i
- da opijati nisu ispoljili statistički značajan uticaj, ispitivanjem promene relativne mase jetre, sadržaja ukupnih proteina, intenziteta lipidne peroksidacije (LP) i sadržaja glutaciona (GSH), u ispitivanim vremenskim periodima, nakon 45 i 120 minuta od tretiranja životinja heroinom.

Navedene promene u jetrenom antioksidantnom odbrambenom sistemu pokazuju da je uzimanje heroina dovelo do smanjenja kapaciteta antioksidantne zaštite kod eksperimentalnih životinja.

6. LITERATURA

1. Aggrawal, A. (1995). *Narcotic Drugs*. National Book Trust, New Delhi, India.
2. Alcantara, J., Bird, D.A., Franceschi, V.R. and Facchini, P.J. (2005). Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant. Physiol.*, **138**(1), 173-183.
3. Allen, D.L., Scott, K.S. and Oliver, J.S. (1999). Comparison of solid-phase extraction and supercritical fluid extraction for the analysis of morphine in whole blood. *J. Anal. Toxicol.*, **23**, 216-218.
4. Anthony, J.C. and Helzer, J.E. (1991). Syndromes of drug abuse and dependence. In: Robins, L.N. and Regier, D.A. (Eds.): *Psychiatric disorders in America: the epidemiologic catchment area study*. Free Press, New York, 116-154.
5. Ariniello, L. (1994). The opiate receptor. *Brain*, 42-44.
6. Arnold, A.P. and Breedlove, S.M. (1985). Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Horm. Behav.*, **19**, 469-498.
7. Atweh, S.F. and Kuhar, M.J. (1997a). Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain I. Spinal cord and lower medulla. *Brain Res.*, **124**, 53-67.
8. Atweh, S.F. and Kuhar, M.J. (1997b). Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain II. The brain stem. *Brain Res.*, **129**, 1-12.
9. Atweh, S.F. and Kuhar, M.J. (1997c). Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain III. The telencephalon. *Brain Res.*, **134**, 393-405.
10. Balog, T., Sobočanec, S., Šverko, V. and Marotti, T. (2004). Met-enkephalin modulates resistance to oxidative stress in mouse brain. *Neuropep.*, **38**, 298-303.
11. Bardo, M.T., Bhatnagar, R.K. and Gebhart, G.F. (1983). Chronic naltrexone increases opiate binding in brain and produces supersensitivity to morphine in the locus coeruleus of the rat. *Brain Res.*, **289**, 223-234.

12. Bardo, M.T., Miller, J.S. and Risner, M.E. (1984). Opiate receptor supersensitivity produced by chronic naloxone treatment: Dissociation of morphine-induced antinociception and conditioned taste aversion. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **21**, 591-597.
13. Barp, J., Araujo, A.S.R., Fernandes, T.R.G., Rigatto, K.V., Llesuy, S., Bello-Klein, A. and Singal, P. (2002). Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **35**, 1075-1081.
14. Bartok, R.E. and Craft, R.M. (1997). Sex differences in opioid antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 769-778.
15. Beers, R.F.J. and Sizer, J.W. (1950). Spectrophotometric method for measuring of breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140.
16. Begmayer, U.H. (1970). *Methoden der enzymatischen analyse*. Verlag Chemie, Weinheim, 483-484.
17. Bero, L.A., Roy, S. and Lee, N.M. (1988). Identification of endogenous opioid receptor components in rat brain using a monoclonal antiserum. *Mol. Pharmacol.*, **34**, 614-620.
18. Bhanot, R. and Wilkinson, M. (1983). Opiatergic control of LH secretion is eliminated by gonadectomy. *Endocrinology*, **112**, 399-401.
19. Bhargava, H.N., Villar, V.M., Rahmani, N.H. and Larsen, A.K. (1992). Distribution of morphine in brain regions, spinal cord and serum following intravenous injection to morphine tolerant rats. *Brain Res.*, **595** (2), 228-235.
20. Bianchi, E., Alessandrini, C., Guarna, M. and Tagliamonte, A. (1993). Endogenous codeine and morphine are store din specific brain neurons. *Brain Res.*, **627**, 210-215.
21. Bianchi, E., Guarna, M. and Tagliamonte, A. (1999). Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine. *Adv. Neuroimmunol.*, **4**, 83-92.
22. Bidlac, J.M., O'Malley, W.E. and Schulz, R. (1988). Comparison of [¹²⁵I] endorphin binding to rat brain and NG 108-15 cells using a monoclonal antiserum directed against the opioid receptor. *Mol. Pharmacol.*, **33**, 170-177.
23. Bjornsdottir, I. and Hansen, S.H. (1995). Determination of opium alkaloids in crude opium using non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13**(12), 1473-1481.
24. Blake, A.D., Bot, G., Freeman, J.C. and Reisine, T. (1997). Differential opioid agonist regulation of the mouse μ opioid receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**, 782-790.
25. Bodnar, R.J. and Klein, G.E. (2004). Endogenous opiates and behavior: 2003. *Peptides*, **25**, 2205-2256.

26. Bodor, N. and Buchwald, P. (1999). Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **36**, 229-254.
27. Boettcher, C., Fellermeier, M., Boettcher, C., Dräger, B. and Zenk, M.H. (2005). How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**(24), 8495-8500.
28. Bogdanović, S. (1981). *Farmakologija*. Naučna knjiga, Beograd, 281-312.
29. Bolger, G.T., Skolnick, P., Rice, K.C. and Weissman, B.A. (1988). Differential regulation of μ -opiate receptors in heroin- and morphine-dependent rats. *FEBS Lett.*, **234**, 22-26.
30. Boyer, E.W. (2004). Dextromethorphan abuse. *Pediatr. Emerg. Care.*, **20**, 858-863.
31. Brady, L.S., Herkenham, M., Long, J.B. and Rothman, R.B. (1989). Chronic morphine increases μ -opiate receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain. Res.*, **477**, 382-386.
32. Brecher, E.M. and Consumer Reports editors (1972). *Licit and Illicit Drugs*. Mt. Vernon, Consumers Union, New York, 47-100.
33. Breedlove, S.M. (1992). Sexual dimorphism in the vertebrate nervous system. *J. Neurosci.*, **12**, 4133-4142.
34. Breedlove, S.M. (1994). Sexual differentiation of the human nervous system. *Annu. Rev. Psychol.*, **45**, 389-418.
35. Broccardo, M., Erspamer, V., Erspamer, G., Improta, G., Linari, G., Melchiorri, P. and Montecucchi, P.C. (1981). Pharmacological data on dermorphins. A new class of potent opioid peptides from amphibian skin. *Br. J. Pharmacol.*, **73**, 625-631.
36. Brochmann-Hanssen, E. (1985). Biosynthesis of morphinan alkaloids. In: Philipson, J.D. and Zenk, M.H. (Eds.): *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids*. Springer-Verlag, Berlin, 229-239.
37. Brodsky, M., Elliott, K., Hynansky, A. and Inturrisi, C.E. (1995). CNS levels of mu opioid receptor (MOR-1) mRNA during chronic treatment with morphine or naltrexone. *Brain Res.*, **38** (2), 135-141.
38. Brown, L.L., Pasi, S. and Etgen, A.M. (1996). Estrogen regulation of mu opioid receptor density in hypothalamic premammillary nuclei. *Brain Res.*, **742**, 347-351.
39. Brunello, N., Volterra, A., Di Giulio, A.M., Cuomo, V. and Racagni, G. (1984). Modulation of opioid system in C57 mice after repeated treatment with morphine and naloxone: biochemical and behavioral correlates. *Life Sci.*, **34**, 1669-1678.

40. Brunk, S.F. and Delle, M. (1974). Morphine metabolism in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16**(1), 51-57.
41. Buege, A.L. and Aust, D.S. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In: Fleisher, S. and Parker, L. (Eds.): *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, 306-310.
42. Büttner, A., Mall, G., Penning, R. and Weis, S. (2000). The neuropathology of heroin abuse. *Forensic. Sci. Int.*, **113**, 435-442.
43. Cardinale, G.J., Donnerer, J., Frinck, A.D., Kantrowitz, J.D., Oka, K. and Spector S. (1987). Morphine and codeine are endogenous components of human cerebrospinal fluid. *Life Sci.*, **40**, 301-306.
44. Chaudron-Thozet, H. (1992). Analysis of heroin seizure in France. *Bull. Narc.*, **XLIV**(1), 29-33.
45. Chen, M.H., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 49-53.
46. Chen, Z.R. and Somogyi, A.A. (1991). Disposition and metabolism of codeine after single and chronic doses in one poor and seven extensive metabolisers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **31**(4), 381-390.
47. Chin, P.T.Y., Stults, F.H. and Tappel, A.L. (1976). Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta*, **445**, 558-560.
48. Cicero, T.J., Ennis, T., Ogden, J. and Meyer, E.R. (2000). Gender differences in the reinforcing properties of morphine. *Pharm. Biochem. Behav.*, **65**(1), 91-96.
49. Cicero, T.J., Nock, B. and Meyer, E.R. (1996). Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 767-773.
50. Cicero, T.J., Nock, B. and Meyer, E.R. (1997). Sex-related differences in morphine's antinociceptive activity: relationship to serum and brain morphine concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 939-944.
51. Cicero, T.J., Nock, B. and Meyer, E.R. (2002a). Gender-linked differences in the expression of physical dependence in the rat. *Pharm. Biochem. Behav.*, **72**, 691-697.
52. Cicero, T.J., Nock, B., O'Connor, L. and Meyer, E.R. (2002b). Role of steroids in sex differences in morphine-induced analgesia: activational and organizational effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**(2), 695-701.

53. Coluzzi, F. and Mattia, C. (2005). Oxycodone: Pharmacological profile and clinical data in chronic pain management. *Minerva Anesthesiol.*, **71**, 451-460.
54. Cone, E.J. and Welch, P. (1991). Forensic drug testing for opiates: I. Detection of 6-acetylmorphine in urine as an indicator of recent heroin exposure; drug and assay considerations and detection times. *J. Anal. Toxicol.*, **15**(1), 1-7.
55. Cooke, B., Hegstrom, C.D., Villeneuve, L.S. and Breedlove, S.M. (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.*, **91**, 323-362.
56. Cooper, J.R., Bloom, F.E. and Roth, R.H. (1996). *The biochemical basis of neuropharmacology*. Oxford University Press, New York.
57. Correia, M.A., Krowech, G., Caldera-Munoz, P., Yee, S.L., Straub, K. and Castagnoli, N.J. (1984). Morphine metabolism revisited: II. Isolation and chemical characterization of a glutathionylmorphine adduct from rat liver microsomal preparations. *Chem.-Biol. Inter.*, **51**(1), 13-24.
58. Cox, B.M., Goldstein, A. and Li, C.H. (1976). Opioid activity of a peptide β -lipotropin(61-91) derived from β -lipotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1821-1823.
59. Craft, R., Heideman, L. and Bartok, R. (1998). Effect of gonadectomy on discriminative stimulus effects of morphine in female versus male rats. *Drug Alcohol Depend.*, **53**, 95-109.
60. Craft, R.M., Kalivas, P.W. and Stratmann, J.A. (1996). Sex differences in discriminative stimulus effects of morphine in the rat. *Behav. Pharmacol.*, **7**, 764-778.
61. Craft, R.M., Stratmann, J.A., Bartok, R.E., Walpole, T.I. and King, S.J. (1999). Sex differences in development of morphine tolerance and dependence in the rat. *Psychopharmacology*, **143**, 1-7.
62. Dambisa, Y., Chan, K. and Wong, C. (1992). Dispositional study of opioids in mice pretreated with sympathomimetic agents. *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 687-690.
63. De-Eknamkul, W. (1999). Chasing the key enzymes of secondary metabolite—biosynthesis from Thai medicinal plants. <http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/de-eknamkul.html>
64. deRidder, M. (1994). Heroin: new facts about an old myth. *J. Psychoactive Drug*, **26**(1), 65-68.
65. De Vries, T.J., Tjon Tien Ril, G.H.K., Van Der Laan, J.W., Mulder, A.H. and Schoffelmeer, A.N.M. (1993). Chronic exposure to morphine and naltrexone induces changes in catecholaminergic neurotransmission in rat brain without altering μ -opioid receptor sensitivity. *Life Sci.*, **52**, 1685-1693.

66. Dhawan, B.N., Cesselin, F. and Raghbir, R. (1996). Classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev.*, **48**, 567-592.
67. Di Bello, M. G., Masini, E., Ioannides, C., Fomusi Ndisang, J., Raspanti, S. and Bani Sacchi, T. (1998). Histamine release from rat mast cells induced by the metabolic activation of drugs of abuse into free radicals. *Inflamm. Res.*, **47**, 122- 130.
68. Di Francesco, P., Tavazzi, B., Gaziano, R., Lazzarino, G., Casalnuovo, L.A., Di Pierro, D. and Garaci, E. (1998). Differential effects of acute morphine administrations on polymorphonuclear cell metabolism in various mouse strains. *Life Sci.*, **63**(24), 2167-2174.
69. Dolphin, A.C. (1996). G-proteins. In: Foreman, J.C. and Johanesen, T. (Eds.): *Textbook of receptor pharmacology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
70. Dondi, D., Limonta, P., Maggi, R. and Piva, F. (1992). Effects of ovarian hormones on brain opioid binding site sin castrated female rats. *Am. J. Physiol.*, **263**, 507-511.
71. Donnerer, J., Cardinale, G., Coffey, J., Lisek, C.A., Jardine, I. and Spector, S. (1987). Chemical characterization and regulation of endogenous morphine and codeine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **242**(2), 583-587.
72. Donnerer, J., Oka, K., Brossi, A., Rice, K.C. and Spector, S. (1986). Presence and formation of codeine and morphine in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4566-4567.
73. D'Souza, D., Harlan, R. and Garcia, M.M. (2002). Sexually dimorphic effects of morphine and MK-801: sex steroid-dependent and -independent mechanisms. *J. Appl. Physiol.*, **92**, 493-503.
74. Dupont, A., Barden, N., Cusan, L., Merand, Y., Labrie, F. and Vaudry, H. (1980). Beta-endorphin and met-enkephalins: their distribution, modulation by estrogens and haloperidol and role in neuroendocrine control. *Fed. Proc.*, **39**, 2544-2550.
75. Eckersell, C.B. Popper, P. and Micevych, P.E. (1998). Estrogen-induced alteration of mu-opioid receptor immunoreactivity in the medial preoptic nucleus and medial amygdala. *J. Neurosci.*, **18**, 3967-3976.
76. Erdtmann-Vourliotis, M., Mayer, P., Riechert, U., Grecksch, G. and Höllt, V. (1998). Identification of brain regions that are markedly activated by morphine in tolerant but not in naive rats. *Mol. Brain Res.*, **61**, 51-61.
77. Escriba, P.V., Sastre, M. and García-Sevilla, J.A. (1994). Increased density of guanine nucleotide-binding protein in the postmortem brains of heroin addicts. *Arch. Gen. Psychiatry*, **51**, 494-501.

78. Facchini, P.J. and De Luca, V. (1995). Expression in escherichia coli and partial characterization of two tyrosine/DOPA decarboxylases from opium poppy. *Phytochemistry*, **38**(5), 1119-1126.
79. Ferrari, A., Coccia, C. P. R., Bertolini, A. and Sternieri, E. (2004). Methadone - metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol. Res.*, **50**(6), 551-559.
80. Fleming, W.W. and Taylor, D.A. (1995). Cellular mechanisms of opioid tolerance and dependence. In: Tseng, L.F. (Ed.): *The pharmacology of opioid peptides*. Harwood Academic Publishers, New York, 463-502.
81. Fraser, H. and Isbell, H. (1960). Human pharmacology and addiction liability of norcodeine. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **129**, 172-177.
82. Fujii, J. and Taniguchi, N. (1999). Down regulation of superoxide dismutases and glutathione peroxidase by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Rad. Res.*, **31**(4), 301-308.
83. Gabilondo, A.M., Meana, J.J., Barturen, F, Sastre, M. and Garcia-Sevilla, J.A. (1994). μ -Opioid receptor and α 2-adrenoceptor agonist binding sites in the postmortem brain of heroin addicts. *Psychopharmacology*, **115** (1-2), 135-140.
84. García-Sevilla, J.A., Ferrer-Alcón, M., Martín, M., Kieffer, B.L. and Maldonado, R. (2004). Neurofilament proteins and cAMP pathway in brain of μ -, δ - or κ -opioid receptor gene knock-out mice effects of chronic morphine administration. *Neuropharmacology*, **46**, 519-530.
85. García-Sevilla, J.A., Ventayol, P., Busquets, X., La-Harpe, R., Walzer, C. and Guimón, J. (1997). Regulation of immunolabelled mu-opioid receptors and protein kinase C-alpha and zeta isoforms in the frontal cortex of human opiate addicts. *Neurosci. Lett.*, **226**, 29-32.
86. Garrido, M.J. and Trocóniz, I.F. (1999). Methadone: a review of the pharmacokinetic /pharmacodynamic properties. *J. Pharmacol. Toxicol.*, **42**, 782-790.
87. Geary, W.A. and Wooten, G.F. (1985). Regional saturation studies of [3H] naloxone binding in the naive, dependent and withdrawal states. *Brain Res.*, **360**, 214-223.
88. Geissler, R., Brandt, W. and Ziegler, J. (2007). Molecular modeling and site-directed mutagenesis reveal the benzylisoquinoline binding site of the short-chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase. *Plant. Physiol.*, **143**(4), 1493-1503.
89. Gibson, G.G. and Skett, P. (1986). *Introduction to drug metabolism*. Chapman and Hall, London, New York.

90. Gintzler, A.R., Levy, A. and Spector, S. (1976). Antibodies as a means of isolating and characterizing biologically active substances: presence of non-peptide morphine - like compound in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2132-2136.
91. Goldstein, A. (1976). Opioid peptides (Endorphins) in pituitary and brain. *Science*, **193**, 1081-1086.
92. Goldstein, A., Barrett, R.W., James, I.F., Lowney, L.I., Weitz, C.J., Knipmeyer, L.L. and Rapoport, H. (1985). Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**(15), 5203-5207.
93. Goldstein, A., Fischli, W., Lowney, L.I., Hunkapiller, M. and Hood, L. (1981). Porcine pituitary dynorphin: complete aminoacid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7219-7223.
94. Gossop, M. (2000). *Living with drugs*. Drug Scope, London.
95. Goudas L.C., Langlade, A., Serrie, A., Matson, W., Milbury, P., Thurel, C., Sandouk, P. and Carr, D.B. (1999). Acute decreases in cerebrospinal fluid glutathione levels after intracerebroventricular morphine for cancer pain. *Anesth. Analg.*, **89**(5), 1209-1215.
96. Goumon, Y. and Stefano, G.B. (2000). Identification of morphine in the rat adrenal gland. *Molec. Brain Res.*, **77**, 267-269.
97. Green, M. D., Bélanger, G., Hum, D. W., Bélanger, A. and Tephly, T. R. (1997). Glucuronidation of opioids, carboxylic acid-containing drugs and hydroxylated xenobiotics catalyzed by expressed monkey UDP-Glucuronosyltransferase 2B9 protein. *Drug Metab. Dispos.*, **25**(12), 1389-1394.
98. Guarna, M., Neri, C., Petroli, F. and Bianchi, E. (1998). Potassium-induced release of endogenous morphine from rat brain slices. *J. Neurochem.*, **70**(1), 147-152.
99. Gutowicz, M., Sadurska, B., Cholojczyk, M., Pokorska-Lis, M., Siwinska-Ziolkowska, A. and Baranczyk-Kuzma, A. (2006). Antioxidant status in different regions of heroin addicts' brain. *Envir. Tox. Pharmacol.*, **21**, 80-85.
100. Halliwell, B. (1989). Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke. *Acta. Neurol. Scand. Suppl.*, **126**, 23-33.
101. Hammer, R.P. (1984). The sexually dimorphic region of the preoptic area in rats contains denser opiate receptor binding site in females. *Brain Res.*, **308**, 172-176.
102. Hammer, R.P. (1985). The sex-hormone dependent development of opiate receptors in the rat medial preoptic area. *Brain Res.*, **360**, 65-74.

103. Hammer, R.P. (1990). Mu-opiate receptor binding in the medial preoptic area is cyclical and sexually dimorphic. *Brain Res.*, **515**, 187-192.
104. Hammer, R.P., Zhou, L. and Cheung, S. (1994). Gonadal steroid hormones and hypothalamic opioid circuitry. *Horm. Behav.*, **28**, 431-437.
105. Haraguchi, H., Saito, T., Ohamura, N. and Yagi, A. (1995). Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*, **61**, 333-336.
106. Hashimoto, E. i Ozawa, H. (1994). Age-related alterations on GTP binding proteins in postmortem human brain. *Yakubutsu Seishin Kodo*, **14**(2), 93-104.
107. Hasselstrom, J. and Säwe, J. (1993). Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. *Clin. Pharmacokinet.*, **24**(4), 344-354.
108. Hazum, E., Sabatka, J., Chang, K., Brent, D., Findlay, J. and Cuatrecasas, P. (1981). Morphine in cow and human milk: could dietary morphine constitute a ligand for specific morphine (μ) receptors? *Science*, **213**, 1010-1012.
109. Hedenmalm, K. and Sundgren, M. (1997). Urinary excretion of codeine, ethylmorphine and their metabolites: relation to the CYP2D6 activity. *Ther. Drug Monit.* **19**(6), 643-649.
110. Henderson, G. and McKnight, A.T. (1997). The orphan opioid receptor and its endogenous ligand-nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 293-300.
111. Hippeli, S. and Elstner, F.E. (1999). Transition metal ion catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. *FEBS Letters*, **443**, 1-7.
112. Hirata, K., Poeaknapo, C., Schmidt, J. and Zenk, M.H. (2004). 1,2-Dehydroreticuline synthase, the branch point enzyme opening the morphinan biosynthetic pathway. *Phytochemistry*, **65**, 1039-1046.
113. Hiroi, T., Imaoka, S. and Funae, Y. (1998). Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**(3), 838-843.
114. Hofmann, U., Seefried, S., Schweizer, E., Ebner, T., Mikus, G. and Eichelbaum, M. (1999). Highly sensitive gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of morphine and codeine in serum and urine in the femtomolar range. *J. Chromatogr. B*, **727**,(1-2), 81-88.
115. Hoover, L.K., Moo-Young, M. and Legge, R.L. (2004). Biotransformation of dopamine to norlaudanosoline by *Aspergillus niger*. *Biotech. Bioeng.*, **38**(9), 1029-1033.
116. Horak, P., Haberman, F. and Spector, S. (1993). Endogenous morphine and codeine in mice - effect on muramyl dipeptide. *Life Sci.*, **52**, (255-260).

117. Hosztafi, S. and Fürst, Z. (1995). Endogenous morphine. *Pharmacol. Res.*, **32**(1/2), 15-20.
118. Hothersall, J., Cumha, F., Neild, G. And Noronha-Dutra, A. (1997). Induction of nitric-oxide synthesis in J774 cells lowers intracellular glutathione: effect of modulated glutathione redox status on nitric oxide synthesis induction. *Biochem. J.*, **322**, 477-481.
119. House, R.V., Thomas, P.T. and Bhargava, H.N. (1997). Immunotoxicology of opioids, inhalants and other drugs of abuse. In: Rapaka, R.S., Chiang, N. and Martin, B.R. (Ed.): *Pharmacokinetics, Metabolism and Pharmaceutics of Drugs of Abuse*. NIDA Research Monograph 173, U.S. Department of health and human services, Rockville.
120. Howard-Jones, N. (1972). The origins of hypodermic medication. *Sci. Am.*, 96-102.
121. Hutchinson, M.R. and Somogyi, A. (2002). Diacetylmorphine degradation to 6-monoacetylmorphine and morphine in cell culture: implications for in vitro studies. *Europ. J. Pharmacol.*, **453**, 27-32.
122. Inturrisi, C.E., Max, M.B., Foley, K.M., Schultz, M., Shin, S.U. and Houde, R.W. (1984). The pharmacokinetics of heroin in patients with chronic pain. *N. Engl. J. Med.*, **310**, 1213-1217.
123. Jaffe, J.H. (1975). Drug addiction and drug abuse. In: Goodman, L.S. and Gilman, A. (Ed.): *The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5th edition*. Macmillan, New York, 293.
124. James, R.C., Goodman, D.R. and Harbison, R.D. (1982). Hepatic glutathione and hepatotoxicity: changes induced by selected narcotics. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **221**(3), 708-714.
125. Jha, S.H., Knapp, C.M. and Kornetsky, C. (2004). Effects of morphine on brain-stimulation reward thresholds in young and aged rats. *Pharmac. Biochem. Behav.*, **79**, 483-490.
126. Johnson, S.M. and Fleming, W.W. (1989). Mechanisms of cellular adaptive sensitivity changes: applications to opioid tolerance and dependence. *Pharmacol. Rev.*, **41**, 435-488.
127. Jokanović, M. (2001). *Toksikologija*. Elit Medica, Beograd, 48-72.
128. Jones, P. (1982). Catalases and ironoporphyrin model systems: roles of the coordination environment of iron catalytic mechanisms. *Biol. Chem. Iron*, **427**, 13-17.
129. Joshi, D., Billiar, R.B. and Miller, M.M. (1993). Modulation of hypothalamic mu-opioid receptor density by estrogen: a quantitative autoradiographic study of the female C57BL/6J mouse. *Brain Res. Bull.*, **30**, 629-634.

130. Kaa, E. and Teige, B. (1993). Drug-related deaths during the 1980s. A comparative study of drug addict deaths examined at the institutes of forensic medicine in Aarhus, Denmark and Oslo, Norway. *Int. J. Leg. Med.*, **106**, 5-9.
131. Kapetanović, I.M and Mieval, I.I. (1979). Inhibition of acetoaminophen induced hepatotoxicity by phenacetin and its alkoxy analogs. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **209**, 25-30.
132. Karch, S.B. (2002). *The Pathology of Drug Abuse, 3rd edition*. CRC Press, New York, USA, 313-348.
133. Katzung, B.G. (2001). *Basic and Clinical Pharmacology (8th ed.)*. McGraw-Hill, New York, USA.
134. Klee, W.A. and Streaty, R.A. (1974). Narcotic receptor sites in morphine-dependent rats. *Nature*, **248**, 61-63.
135. Kodaira, H., Listek, C.A., Jardine, I., Arimura, A. and Spector, S. (1989). Identification of the convulsant opiate thebaine in the mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 716-719.
136. Kodaira, H. and Spector, S. (1989). Biotransformation of thebaine to oripavine, codeine and morphine by rat liver, kidney and brain microsomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1267-1271.
137. Kosterlitz, H.W. (1987). Biosynthesis of morphine in the animal kingdom. *Nature (London)*, **330**, 606.
138. Kowalski, J. (1998). Immunologic action of (Met⁵) fragments. *Eur. J. Pharmacol.*, **347**, 95-99.
139. Kramer, T.H. (1990). Chasing the dragon: the smoking of heroin and cocaine. *J. Substance Abuse Treat.* **7**(1), 65.
140. Kuhar, J.M., Pert, C.B. and Snyder, S.H. (1973). Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature*, **245**, 447-450.
141. Kumagai, Y., Todaka, T. and Toki, S. (1990). A new metabolic pathway of morphine: in vivo and in vitro formation of morphinone and morphine-glutathione adduct in guinea pig. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **255**(2), 504-510.
142. Kutchan, T.M. (1998). Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In: Cordell, G.A. (Ed.): *The Alkaloids, Vol. 50*. Academic Press, San Diego, 257-316.
143. Lagrange, A.H., Ronnekleiv, O.K. and Kelly, M.J. (1994). The potency of mu-opioid hyperpolarization of hypothalamic arcuate neurons is rapidly attenuated by 17 beta-estradiol. *J. Neurosci.*, **14**, 6196-6204.
144. Lee, C.S. and Spector, S. (1991). Changes of endogenous morphine and codeine content in fasting rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 647-651.

145. Letrent, S.P. and Polli, J.W. (1999). P-glycoprotein-mediated transport of morphine in brain capillary endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.*, **58**(6), 951-957.
146. Lewis, J.W., Shavit, Y., Terman, G.W., Gale, R.P. and Liebeskind, J.C. (1984). Stress and morphine affect survival of rats challenged with a mammary ascites tumor (MAT 13762B). *Nat. Immun. Cell Growth Reg.*, **3**(1), 43-50.
147. Limonta, P., Dondi, D., Maggi, R. and Piva, F. (1991). Testosterone and postnatal ontogenesis of hypothalamic mu ([³H]dihydromorphine) opioid receptors in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **62**, 131-136.
148. Liu, M., Wu, J. and Wang, W. (1996). Immunohistochemical study on morphine in human tissues from opiate associated death. *Hua. His. I. Ko. Ta. Hsueh. Hsueh. Pao.*, **27**(2), 507-509,518.
149. Liu, Y., Bilfinger, T.V. and Stefano, G.B. (1996). A rapid and sensitive quantitation method of endogenous morphine in human plasma. *Life Sci.*, **60**, 237-243.
150. Loh, H.H., Tao, P.L. and Smith, A.P. (1988). Role of receptor regulation in opioid tolerance mechanisms. *Synapse*, **2**, 457-462.
151. Macchia, I., Palamara, A.T., Bue, C., Savini, P., Ciriolo, M., Gaziano, R. and di Francesco, P. (1999). Increased replication of Sendai virus in morphine - treated epithelial cells: evidence for the involvement of the intracellular levels of glutathione. *Inter. J. Immunopharm.*, **21**(3), 185-193.
152. Mahler, D.L. and Forrest, Jr.,W.H. (1975). Relative analgesic potencies of morphine and hydromorphone in postoperative pain. *Anesthesiology*, **42**(5), 602-607.
153. Mansour, A. and Watson, S.J. (1993). Anatomical distribution of opioid receptors in mammals: an overview. In: Herz, A. (Ed.): *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 104/I*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, 79-106.
154. Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H. and Watson, S.J. (1987). Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.*, **7**, 2445-2464.
155. Mateo, A.R., Hijazi, M. and Hammer, R.P. (1992). Dynamic patterns of medial preoptic mu-opiate receptor regulation by gonadal steroid hormones. *Neuroendocrinology*, **55**, 51-58.
156. Matsubara, K., Fukushima, S., Akane, A., Kobayashi, S. and Shiono, H. (1992). Increased urinary morphine, codeine and tetrahydropapaveroline in parkinsonian patient undergoing L-3,4-dihydroxyphenylalanine therapy: a possible biosynthetic pathway of morphine from L-3,4-dihydroxyphenylalanine in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**, 974-978.
157. Max, B. (1992). This and that: an artefactual alkaloid and its peptide analogs. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **13**, 341-345.

158. Meilhac, O., Zhou, M., Santanam, N. and Parthasarathy, S. (2000). Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *J. Lipid Res.*, **41**(8), 1205-1213.
159. Mikus, G., Bochner, F., Eichelbaum, M., Horak, P., Somogyi, A.A. and Spector, S. (1994). Endogenous codeine and morphine in poor and extensive metabolizers of the CYP2D6 (debrisoquine/sparteine) polymorphism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 546-551.
160. Milić, B.Lj. (2005). *Halucinogene supstance*. Prometej, Novi Sad.
161. Mimica-Dukić, N. (1997). *In vivo* and *in vitro* study of antioxidant activity of plant extracts. *Archive of Pharmacy*, **5**, 475-493.
162. Mogil, J.F., Chessler, E.J., Wilson, S.G., Juraska, J.M. and Sternberg, W.F. (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neurosci. Behav. Reviews*, **24**, 375-389.
163. Mokranjac, M. (1963). *Toksikološka hemija*. Univerzitet u Beogradu, Naučna knjiga, Beograd, 272-283.
164. Morris, B.J., Millan, M.J. and Herz, A. (1988). Antagonist-induced opioid receptor upregulation: II Regionally specific modulation of mu, delta and kappa binding sites in rat brain revealed by quantitative autoradiography. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **247**, 729-736.
165. Murry, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V.W. (1997). *Harper's biochemistry, 23rd edition..* Appleton and Lange Publishing Division of Prentice Hall, New Jersey, USA.
166. Navaro, A., Sanchez, M.J., Gomez, C., Peralta, J.L. and Boveris, A. (2002). Behavioural dysfunction, brain oxidative stress and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integrative Comp. Physiol.*, **282**, 985-992.
167. NCB. (1998). *Narcotic Drugs: Estimated World Requirements for 1999*. Narcotics Control Board, United Nations, New York, 81.
168. Nelson, C.J., Schneider, G.M. and Lysle, D.T. (2000). Involvement of central mu- but not delta- or kappa-opioid receptors in immunomodulation. *Brain Behav. Immun.*, **13**(3), 170-184.
169. Nestler, E.J. (1996). Under siege: The brain on opiates. *Neuron*, **16**, 897-900.
170. Nestler, E.J., Hyman, S.E. and Malenka, R.C. (2001). *Molecular neuropharmacology*. McGraw Hill, New York.
171. Nock, B., Wich, M. and Cicero, T.J. (1997). Chronic exposure to morphine increases corticosteroid-binding globulin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 1262-1268.

172. O'Brien, C.P. (1992). Opioid addiction. In: Herz, A. (Ed.): *Handbook of experimental pharmacology*. Springer-Verlag, Berlin, 803-823.
173. Oka, K., Kantrowitz, J.D. and Spector, S. (1985). Isolation of morphine from toad skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**(6), 1852-1854.
174. Oliveira, M.T., Rego, A.C., Morgadinho, M.T., Macedo, T.R.A. and Oliveira, C.R. (2002). Toxic effects of opioid and stimulant drugs on undifferentiated PC12 cells. *Annals New York Acad. Sci.*, **965**, 487-496.
175. O'Neill, W., Hanks, G., Simpson, P., Fallon, M., Jenkins, E. and Wesnes, K. (2000). The cognitive and psychomotor effects of morphine in healthy subjects: a randomized controlled trial of repeated (four) oral doses of dextropropoxyphene, morphine, lorazepam and placebo. *Pain*, **85**(1-2), 209-215.
176. Osborne, R. and Joel, S. (1990). Morphine and metabolite behavior after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**(1), 10-16.
177. Page, J.E. (2005). Silencing nature's narcotics: metabolic engineering of the opium poppy. *Trends Biotech.*, **23**(7), 331-333.
178. Pan, J., Zhang, Q., Zhang, Y., Ouyang, Z., Zheng, Q. and Zheng, R. (2005). Oxidative stress in heroin administered mice and natural antioxidants protection. *Life Sci.*, **77**, 183-193.
179. Panchenko, L. F., Pirozhkov, S. V., Nadezhdin, A. V., Baronets, V. I. and Usmanova, N. N. (1999). Lipid peroxidation peroxyl radical-scavenging system of plasma and liver and heart pathology in adolescence heroin users. *Vopr. Med. Khim.*, **45**, 501- 564.
180. Parker, R.J. and Hirom, P.C. (1980). Enterohepatic recycling of phenolphthalein, morphine, lysergic acid diethylamide (LSD) and diphenylacetic acid in the rat. Hydrolysis of glucuronic acid conjugates in the gut lumen. *Xenobiotica*, **10**(9), 689-703.
181. Patel, J., Manjappa, N., Bhat, R., Mehrotra, P., Bhaskaran, M. and Singhal, P.C. (2003a). Role of oxidative stress and heme oxygenase activity in morphine - induced glomerular epithelial cell growth. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **285**(5), 861-869.
182. Patel, J., Bhaskaran, M., Dani, D., Reddy, K. and Singhal, P.C. (2003b). Role of heme oxygenase-1 in morphine-modulated apoptosis and migration of macrophages. *J. Infect. Diseases.*, **187**(1), 47-54.
183. Patt, R.B. (1988). Delayed postoperative respiratory depression associated with oxymorphone. *Anesth. Analg.*, **67**(4), 403-404.

184. Paul, D., Standifer, K.M., Inturrisi, C.E. and Pasternak, G.W. (1989). Pharmacological characterization of morphine-6 β -glucuronide: a very potent morphine metabolite. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 477-483.
185. Payabvash, S., Beheshtian, A., Salmasi, A.H., Kiumehr, S., Ghahremani, M.H., Tavangar, S.M., Sabzevari, O. and Dehpour, A.R. (2006). Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life Sci.*, **79**, 972-980.
186. Pert, C.B., Pasternak, G. and Snyder, S.H. (1973). Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science*, **182**, 1359-1361.
187. Petrović, S.P. (2003). *Droga i ljudsko ponašanje*. Partenon, Beograd.
188. Piva, F., Limonta, P., Dondi, D., Pimpinelli, F., Martini, L. and Maggi, R. (1995). Effects of steroids on the brain opioid system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **53**, 343-348.
189. Poeaknapo, C., Schmidt, J., Brandsch, M., Dräger, B. and Zenk, M.H. (2004). Endogenous formation of morphine in human cells. *PNAS*, **101**(39), 14091-14096.
190. Powers, K.S. and Hamilton, K. (1999). Antioxidants and exercise. *Clin. Sports Med.*, **18**, 525-536.
191. Projean, D., Morin, P.E. Tu, T.M. and Ducharme, J. (2003). Identification of CYP3A4 and CYP2C8 as the major cytochrome P450 s responsible for morphine N-demethylation in human liver microsomes. *Xenobiotica*, **33**(8), 841-854.
192. Quinones-Jenab, V., Jenab, S., Ogawa, S., Inturrisi, C. and Pfaff, D.W. (1997). Estrogen regulation of mu-opioid receptor mRNA in the forebrain of female rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **47**, 134-138.
193. Raffa, R.B., Porreca, F., Cowan, A. and Tallaride, R.J. (1982). Extraction and measurement of morphine: Correlation of brain level and s.c. dose in drug-naïve and morphine-tolerant rats. *Life Sci.*, **31** (20-21), 2299-2302.
194. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. and Moore, P.K. (2003). *Pharmacology, 5th edition*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
195. Reiter, R.J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J.*, **9**, 526-533.
196. Rentsch, K.M., Kullak-Ublick, G.A., Reichel, C., Meier, P.J. and Fattinger, K. (2001). Arterial and venous pharmacokinetics of intravenous heroin in subjects who are addicted to narcotics. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **70**, 237-246.
197. Roberts, S.M., Skoulis, N.P. and James, R.C. (1987). A centrally-mediated effect of morphine to diminish hepatocellular glutathione. *Biochem. Pharm.*, **36**(18), 3001-3005.

198. Rogers, N.F. and El-Fakahany, E.E. (1986). Morphine-induced opioid receptor down-regulation detected in adult rat brain cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **124**, 221-230.
199. Rogers, H.J., Spector, R.G. and Trounce, J.R. (1981). *A Textbook of Clinical Pharmacology*. Hoober and Stoughton, London, 303-321.
200. Rothman, R.B., Danks, J.A., Jacobson, A.E., Burke, T.R., Rice, K.C., Tortella, F.C. and Holaday, J.W. (1986). Morphine tolerance increases μ -non competitive δ binding sites. *Eur. J. Pharmacol.*, **124**, 113-119.
201. Roy, B.F., Bowen, W.D., Frasier, J.S., Rose, J.W., McFarland, H.F., McFarlin, D.E., Murphy, D.L. and Morishia, J.M. (1988). Human antiidiotypic antiserum against opiate receptors. *Ann. Neurol.*, **24** (1), 57-63.
202. Salem, A. and Hope, W. (1997). Role of morphine glucuronide metabolites in morphine dependence in the rat. *Pharm. Biochem. Behav.*, **57**(4), 801-807.
203. Salmon, A.Y., Goren, Z., Avissar, Y. and Soreq, H. (1999). Human erythrocyte but not brain acetylcholinesterase hydrolyses heroin to morphine. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **26**(8), 596-600.
204. Sawyer, W.R. and Forney, R.B. (1988). Postmortem disposition of morphine in rats. *Forensic Sci. Int.*, **38** (3-4), 259-273.
205. Schänzle, G., Li, S., Mikus, G. and Hofmann, U. (1999). Rapid, highly sensitive method for the determination of morphine and its metabolites in body fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **721**, 55-65.
206. Schmidt, H., Vormfelde, S., Walchner-Bonjean, M., Klinder, K., Freudenthaler, S., Gleiter, C., Gundert-Remy, U., Skopp, G., Aderjan, R. and Fuhr, U. (2003). The role of active metabolites in dihydrocodeine effects. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **41**(3), 95-106.
207. Schmitz, J., Stotts, A., Rhoades, H. and Grabowski, J. (2001). *Naltrexone and relapse prevention treatment for cocaine-dependent patients*. *Addict. Behav.* **26** (2), 167-180.
208. Schmidt, P., Schmolke, C., Musshoff, F., Prohaska, C., Menzen, M. and Madea, B. (2001). Numerical density of μ opioidreceptor expressing neurons in the frontal cortex of drug related fatalities. *Forensic Sci. Int.*, **115** (3), 219-229.
209. Schmidt, P., Schröder, H., Maderspack, K. and Staak, M. (1994). Immunohistochemical localization of kappa opioid receptors in the human frontal cortex. *Brain Res.*, **654** (2), 223-233.
210. Schwartz, T.W. (1996). Molecular structure of G-protein-coupled receptors. In: Foreman, J.C. and Johanesen, T. (Eds.): *Textbook of receptor pharmacology*. CRC Press, Boca Raton, FL.

211. Sharp, B.M., Keane, W.F., Suh, H.J., Gekker, G., Tsukayama, D. and Peterson, P.K. (1985). Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *Endocrin.*, **117**(2), 793-795.
212. Shichinohe, S. and Ozawa, H. (1998). Differential alteration of adenylyl cyclase subtypes I, II and V/VI in postmortem human brains of heroin addicts. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **22**, 84-87.
213. Sibinga, N.E.S. and Goldstein, A. (1988). Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 219-249.
214. Siddiqui, A., Haq, S., Shaharyar, S. and Haider, S. (1995). Morphine induces reproductive changes in female rats and their male offspring. *Reprod. Toxicology*, **9**(2), 143-151.
215. Simon, E. J. (1991). Opioid receptors and endogenous opioid peptides. *Med. Res. Rev.*, **11**, 357-374.
216. Simon, L.M., Fatrai, Z., Jonas, D.E. and Matkovich, B. (1974). Study of metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. Physiol. Plan.*, **166**, 289-393.
217. Simon, E. J. and Miller, J.M. (1978). The opiate receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **18**, 371-394.
218. Simonds, W.F. (1999). G-protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 66-72.
219. Skopp, G., Lutz, R., Granßmann, B., Mattern, R. and Aderjan, R. (1996). Postmortem distribution pattern of morphine and morphine glucuronides in heroin overdose. *Int. J. Leg. Med.*, **109**, 118-124.
220. Smith, M.T., Watt, J.A. and Cramond, T. (1990). Morphine-3-glucuronide - a potent antagonist of morphine analgesia. *Life Sci.*, **47**, 579-585.
221. Snyder, S.H. (1978). The opiate receptor and morphine-like peptides in the brain. *Am. J. Psychiatry*, **135**, 645-652.
222. Spector, S., Munjal, I.D. and Schmodt, D.E. (1998). Effect of the immune stimulant levamisole on opiate withdrawal and levels of endogenous opiate alkaloids and monoamine neurotransmitters in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, **19**, 417-427.
223. Srinivasan, V., Wielbo, D. and Tebbett, I.R. (1997). Analgesic effects of codeine-6-glucuronide after intravenous administration. *Europ. J. Pain (London, England)*, **1**(3), 185-190.
224. Stanski, D.R. and Greenblatt, D.J. (1978). Kinetics of intravenous and intramuscular morphine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **24**(1), 52-59.

225. Staub, C., Jeanmonod, R. and Fryc, O. (1990). Morphine in post-mortem blood: its importance for the diagnosis of deaths associated with opiate addiction. *Int. J. Leg. Med.*, **104**, 39-42.
226. Stefano, G.B., Scharrer, B., Smith, E.M., Hughes, T.K., Magazine, H.I., Bilfinger, T.V., hartman, A., Fricchione, G.L., Liu, Y. and Makman, M.H. (1996). Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit. Rev. Immunol.*, **16**, 109-144.
227. Stegmann, G.F. (1999). Etorphine-halothane anaesthesia in two five-year-old African elephants. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **70**(4), 164-166.
228. Sternberg, W.F. and Mogil, J.F. (2001). Genetic and hormonal basis of pain states. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthes.*, **15**(2), 229-245.
229. Stošić-Bogdanović, N. (1984). *Atlas strukture ćelija, tkiva i organa*. Naučna Knjiga, Beograd.
230. Strang, J. and Griffiths, P. (1997). Heroin smoking by "chasing the dragon": origins and history. *Addiction*, **92**(6), 673-683.
231. Stuart-Harris, R. and Joel, S.P. (2000). The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronide metabolites after subcutaneous bolus injection and subcutaneous infusion of morphine. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **49** (3), 207-214.
232. Tao, P.L., Lee, H.Y., Chang, L.R. and Loh, H.H. (1990). Decrease in μ -opioid receptor binding capacity in rat brain after chronic PL017 treatment. *Brain. Res.*, **526**, 270-275.
233. Tasić, M., Budakov, B., Drašković, D., Đurendić-Brenesel, M., Oros, A., Pilija, V., Simić, M., Stojiljković, G., Šušnjar, B., Takač, Š., Veselinović, I., Vuković, R. and Zgonjanin, D. (2007). *Sudska medicina*. Zmaj, Novi Sad.
234. Tejwani, G.A., Gudehithlu, K.P., Hanissian, S.H., Gienapp, I.E., Whitacre, C.C. and Malarkey, W.B. (1991). Facilitation of dimethylbenz(a)anthracene induced rat mammary tumorigenesis by restraint stress: role of beta-endorphine, prolactin and naltrexone. *Carcinogenesis*, **12**, 637-641.
235. Tejwani, G.A., Sheu, M.J., Sribanditmongkol, P. and Satyapriya, A. (1998). Inhibition of morphine tolerance and dependence by diazepam and its relation to μ -opioid receptors in the rat brain and spinal cord. *Brain Res.*, **797**, 305-312.
236. Tempel, A., Gardner, E.L. and Zukin, R.S. (1985). Neurochemical and functional correlates of naltrexone-induced opiate receptor upregulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 439-444.

237. Tempel, A., Gardner, E.L. and Zukin, R.S. (1984). Visualization of opiate receptor up-regulation by light microscopy autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 3893-3897.
238. Tempel, A. and Zukin, R.S. (1987). Neuroanatomical patterns of the mu, delta and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **84**, 4308-4312.
239. Thomas, J.P., Maiorino, M., Ursini, F. and Girotti, A.W. (1990). Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, **256**, 281-295.
240. Timbrell, J.A. (1993). Biotransformation of xenobiotics. In: Ballantyne, B., Marrs, T. and Turner, P. (Eds.): *General and applied toxicology*. Stockton Press, New York, 89-119.
241. Turrens, J.F. and Boveris, A. (2002). Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.*, **191**, 421-427.
242. Varagić, V.M. i Milošević, M.P. (2002). *Farmakologija*. Elit Medica, Beograd, 198-210.
243. Vathy, I. and Etgen, A.M. (1996). Effects of prenatal morphine and adult estrogen administration on mu-opioid inhibition of norepinephrine release from hypothalamic slices. *Neuroendocrinology*, **63**, 61-68.
244. Viganó, D., Rubino, T., Di Chiara, G., Ascari, I., Massi, P. and Parolaro, D. (2003). μ Opioid receptor signaling in morphine sensitization. *Neuroscience*, **117**, 921-929.
245. Vree, T.B., van Dongen, R.T. and Koopman-Kimenai, P.M. (2000). Codeine analgesia is due to codeine-6-glucuronide, not morphine. *Int. J. Clin. Pract.*, **54**(6), 395-398.
246. Vycudilik, W. (1988). Comparative morphine determination in parts of the brain using combined gas chromatography/mass spectrometry. A possibility for assessing survival time. *Z. Rechtsmed.*, **99** (4), 263-272.
247. Walfson, A.E. (1948). Estimation of total protein in liver homogenate. *Am. J. Clin. Path.*, **18**, 723.
248. Walker, J.M., Bowen, W.D., Walker, F.O., Matsumoto, R.R., De Costa, B. and Rice, K.C (1990). Sigma receptors: biology and function. *Pharmacol. Rev.*, **42**, 355-402.
249. Wallenstein, S.L. (1986). Crossover trials in clinical analgesic assays: studies of buprenorphine and morphine. *Pharmacotherapy*, **6**(5), 228-235.
250. Wardlaw, S.L., Thoron, L. and Frantz, A.G. (1982). Effects of sex steroids on brain beta-endorphin. *Brain. Res.*, **245**, 327-331.

251. Wehner, F., Wehner, H.D., Subke, J., Meyermann, R. and Fritz, P. (2000). Demonstration of morphine in ganglion cells of the hippocampus from victims of heroin overdose by means of anti - morphine antiserum. *Int. J. Legal. Med.*, **113**, 117-120.
252. Weid, M., Ziegler, J. and Kutchan, T.M. (2004). The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **101**(38), 13957-13962.
253. Weiland, N.G. and Wise, P.M. (1990). Estrogen and progesterone regulate opiate receptor densities in multiple brain regions. *Endocrinology*, **126**, 804-808.
254. Weiss, B. (2002). Commentary: sex differences in the neurobehavioral toxicity of endocrine disruptors. *Crime Times*, **8**(4), 1-3.
255. Weitz, C.J., Faull, K.F. and Goldstein, A. (1987). Synthesis of the skeleton of morphine molecule by mammalian liver. *Nature (London)*, **330**, 674-677.
256. Weitz, C.J., Lowney, L.I., Faull, K.F., Feistner, G. and Goldstein, A. (1986). Morphine and codeine from mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**(24), 9784-9788.
257. Werling, L.L. and McMahon, P.N. (1989). Selective changes in mu opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86** (16), 6393-6397.
258. Wiesenfeld-Hallin, Z. (2005). Sex differences in pain perception. *Gender Med.*, **2**(3), 137-145.
259. Winterbourn, C.C. (1995). Free radical toxicology and antioxidant defence. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **22**, 877-880.
260. Wolfe, T.R. and Caravati, M. (1995). Massive dextromethorphan ingestion and abuse. *Am. J. Emerg. Med.*, **13**(2), 174-176.
261. Wolff, T., Samuelsson, H. and Hedner, T. (1996). Concentrations of morphine and morphine metabolites in CSF and plasma during continuous subcutaneous morphine administration in cancer pain patients. *Pain*, **68**, 209-216.
262. Xu, B.Q., Aasmundstad, T.A., Lillekjendlie, B., Bjorneboe, A., Christophersen, A.S. and Morland, J. (1997). Effects of ethanol on ethylmorphine metabolism in isolated rat hepatocytes: characterization by means of a multicompartamental model. *Pharmacol. Toxicol.*, **80**(4), 171-181.
263. Yeh, S.Y. and Krebs, H.A. (1979). Isolation and identification of morphine *n*-oxide α - and β - dihydromorphines, β - or γ - isomorphine, and hydroxylated morphine as morphine metabolites in several mammalian species. *J. Pharm. Sci.*, **68**(2), 133-140.

264. Yoburn, B.C., Goodman, R.R., Cohen, A.H., Pasternak, G.W. and Inturrisi, C.E. (1985). Increased analgesic potency of morphine and increased brain opioid binding site in the rat following chronic naltrexone treatment. *Life Sci.*, **36**, 2325-2329.
265. Yoburn, B.C. and Inturrisi, C.E. (1988). Modification of the response to opioid and non opioid drugs by chronic opioid antagonist treatment. *Life Sci.*, **42**, 1689-1696.
266. Zhang, Y.T., Zheng, (Q.S.), Pan, J. and Zheng, R.L. (2004). Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morphine and protected by antioxidants. *Pharm. Tox.*, **95**(2), 53-58.
267. Zhou, J.F., Yan, X.F., Ruan, Z.R., Peng, F.Y., Cai, D. and Yuan, H. (2000). Heroin abuse and nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation. *Biomed. Envir.Sci.*, **13**, 131-139.
268. Zhu, W., Bilfinger, T.V., Baggerman, G., Goumon, Y. and Stefano, G.B. (2001). Presence of endogenous morphine and morphine 6 glucuronide in human heart tissue. *Int. J. Mol. Med.*, **7**(4), 419-422.
269. Zubieta, J.K., Dannals, R.F. and Frost, J.J. (1999). Gender and age influences on human brain mu-opioid receptor binding measured by PET. *Am. J. Psychiatry*, **156**, 842-848.

7. SAŽETAK

U okviru ove doktorske disertacije:

- Izvršeno je uspješno izolovanje opijatnih alkaloida iz humanih bioloških uzoraka: moždanog tkiva, krvi, urina i žuči, kao i bioloških uzoraka eksperimentalnih životinja: moždanog tkiva i krvi, primenom postupka čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE - Solid Phase Extraction).
- Modifikovan je postupak za kvalitativnu i kvantitativnu GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) analizu bioloških uzoraka.
- Utvrđena je distribucija opijatnih alkaloida: morfina, kodeina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u humanim biološkim uzorcima moždanog tkiva (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima).
- Dobijeni rezultati pružaju mogućnost selekcije istih delova moždanog tkiva kod muških i ženskih osoba, i to: moždane kore i bazalnih jedara kao pouzdanih uzoraka za identifikaciju i utvrđivanje sadržaja opijata.
- Utvrđena je distribucija opijatnih alkaloida: morfina, kodeina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u biološkim uzorcima moždanog tkiva (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima) i krvi eksperimentalnih životinja (pacova), u različitim vremenskim periodima (5, 15, 45 i 120 minuta) od tretiranja životinja heroinom.
- Za tretiranje životinja je korišćen heroin - zaplenjena droga, što predstavlja inovaciju u odnosu na ranija istraživanja u kojima su životinje tretirane čistim supstancama heroinom ili morfinom.
- Utvrđene su razlike u distribuciji opijatnih alkaloida u delovima moždanog tkiva eksperimentalnih životinja.
- Najveća procentualna zastupljenost opijata je određena u istim delovima moždanog tkiva životinja oba pola i to u moždanoj kori i bazalnim jedrima ali u različitim vremenskim periodima.

- Najveći sadržaj opijata je određen u moždanom tkivu ženki nakon 15 minuta, a kod mužjaka nakon 45 minuta, što ukazuje na bržu distribuciju opijata iz krvi u mozak kod ženki u odnosu na mužjake pacova.
- Utvrđen je maksimalan sadržaj opijata u istom vremenskom periodu (15 minuta) u krvi eksperimentalnih životinja oba pola. Međutim, kod mužjaka su određene znatno veće vrednosti koncentracija opijata u odnosu na ženke, što se može objasniti bržom distribucijom opijata iz krvi u moždano tkivo ženki.
- Utvrđeno je da je distribucija opijata u humanom moždanom tkivu kod pripadnika suprotnih polova kao i moždanom tkivu mužjaka i ženki pacova (nakon 120 minuta od tretiranja heroinom), identična.
- Ispitivanjem uticaja opijata na markere oksidativnog stresa u jetri eksperimentalnih životinja suprotnih polova, utvrđeno je smanjenje aktivnosti enzima (nakon 120 minuta od tretiranja životinja heroinom): katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GSH-Px), peroksidaze (Px) i ksantin-oksidge (XOD).

Na osnovu rezultata dobijenih analizom bioloških uzoraka umrlih osoba i bioloških uzoraka eksperimentalnih životinja, opravdano je zaključiti da je u mehanizmu umiranja navedena distribucija opijatnih alkaloida od značaja, kako po regionalnim strukturama centralnog nervnog sistema, tako i po polnom dimorfizmu. Poremećaji aktivnosti enzima oksidativnog stresa su značajan kofaktor u mehanizmu nastanka nagle smrti kod opijatnih zavisnika, zbog visoke osetljivosti struktura centralnog nervnog sistema na oksidativni stres.

8. SUMMARY

The work carried out in the frame of this Ph.D. thesis may be summarized as follows:

- Opiate alkaloids were successfully isolated from human biological samples: brain tissue, blood, urine, and bile, as well as from biological samples of experimental animals: brain tissue and blood, by applying procedures of solid phase extraction (SPE).
- A modified procedure was worked out for qualitative and quantitative GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) analyses of biological samples.
- The distribution of opiate alkaloids: morphine, codeine, acetylcodeine, 6-acetylmorphine, and heroine in human biological samples of brain tissue (cortex, brain stem, amigdala and basal nuclei) was established.
- The obtained results offer the possibility of selecting the same parts of brain tissue with males and females, namely, the cortex and basal nuclei, as reliable samples for identifying and assesment of contents of opiates.
- It was established how the opiate alkaloids: morphine codeine, acetylcodeine, 6-acetylmorphine and heroine are distributed in biological samples of brain tissue (cortex, brain stem, amigdala and basal nuclei) and blood of experimental animals (rats) in different time periods (5, 15, 45 and 120 min) after the animal treatment with heroine.
- Animals were treated using seized heroine, which is a novelty compared to previous investigations in which animals were treated with pure substances – heroine or morphine.
- Certain differences were found in respect of the distribution of opiate alkaloids in particular brain compartments of tested animals.
- The highest percentual presence of the opiates was found in the same compartments of brain tissue of the animals of both sexes, in the cortex and basal nuclei, but in the different time periods.

- The highest content of opiates in the brain tissue of female animals was measured 15 min and with male animals 45 min after the treatment, which indicates faster distribution of opiates from blood to brain in the female compared to male rats.
- Maximal content of opiates in the same time period (15 min) was determined in blood of animals of both sexes. The values measured in the males were significantly higher compared to the opiate levels in blood of female animals, which suggests a faster passage of the opiates from blood to brain tissue in female animals.
- It was found that the distribution of opiates in brain tissues of dead human subjects and in rats 120 min after treatment with heroine is identical irrespective of the sex.
- Study of the effect of opiates on the markers of oxidative stress in the liver of tested animals of opposite sexes measured 120 min after the treatment with heroine showed a lowered activity of the following enzymes: catalase (CAT), glutathion-peroxidase (GSH-Px), peroxidase (Px) and xanthine oxidase (XOD).

On the basis of the results obtained by analyzing biological samples of dead subjects and biological samples of experimental animals it can be rightly concluded that in dying mechanism the observed distribution of opiate alkaloids is of significance, both in respect of the regional structures of the central nervous system and sex dimorphism. The disturbances in the activity of the enzymes of oxidative stress represent a significant co-factor in the mechanism of occurrence of a sudden death with opiate addicts, because of the high sensitivity of the central nervous system to the oxidative stress.

9. BIOGRAFIJA



Mr Maja Đurendić-Brenesel (rođ. Đurendić) rođena je 2. novembra 1973. godine u Novom Sadu. Osnovnu, kao i Hemijsko-tehnološku školu završila je u Novom Sadu sa odličnim uspehom.

Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu (grupa Hemija, smer diplomirani hemičar) je upisala školske 1992/93. godine. Diplomski rad "Sinteza novih D-seko i D-homo derivata 5-androstena" je odbranila 1996. god., sa prosečnom ocenom u toku studija 9,54.

U toku osnovnih studija je dobila izuzetnu nagradu Univerziteta u Novom Sadu iz hemije za urađen temat, kao i nagradu za postignut uspeh na studijama (1996. god.).

Poslediplomske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu (grupa Hemija) upisala je 1996. god. U toku poslediplomskih studija je bila učesnik na dva naučno-istraživačka projekta Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije: "Sinteza i fizičko-hemijska ispitivanja biološki aktivnih jedinjenja i njihovih analoga" na Katedri za organsku hemiju i "Bioremedijacija zemljišta i podzemnih voda zagađenih naftom i naftnim derivatima" na Katedri za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine.

Dobila je nagradu Ministarstva nauke i zaštite životne sredine za izuzetne rezultate postignute u realizaciji projekata iz programa osnovnih istraživanja za period 2002-2003. god. (2004. god.).

Magistarski rad pod nazivom "Metodologija projektovanja monitoringa voda u slučaju ekscenih situacija u naftnoj industriji", odbranila je 2001. god., sa prosečnom ocenom u toku poslediplomskih studija 9,86.

U toku poslediplomskih studija (1996-2002. god.) držala je vežbe iz predmeta: Organska hemija II, Teorijski osnovi organske hemije, Hemijska proizvodnja, Zaštita okoline i Toksikološka hemija, na PMF-u u Novom Sadu.

Izabrana je u zvanje i na radno mesto asistenta-pripravnika za naučnu oblast Hemija (predmet: Tehnologija zaštite životne sredine) na PMF-u u Novom Sadu 23. novembra 1999. godine.

Od 1. novembra 2002. godine je zaposlena na Institutu za sudsku medicinu, Klinički centar, Novi Sad, kao toksikolog. Stalni je sudski veštak.

Objavila je ukupno 30 naučnih radova i saopštenja: šest radova u vodećim časopisima međunarodnog značaja, četiri poglavlja u monografijama, jedan rad saopšten na skupu međunarodnog značaja i trinaest radova saopštenih na skupu nacionalnog značaja štampanih u celini, četiri saopštenja na međunarodnim i dva saopštenja na domaćim naučnim skupovima štampanih u izvodu. Takođe je učesnik na osam projekata za potrebe privrede od 1999. do 2003. godine.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTCIJA INFORMACIJA**

Redni broj	
RBR	
Identifikacioni broj	
IBR	
Tip dokumentacije:	Monografska dokumentacija
TD	
Tip zapisa:	Tekstualni štampani materijal
TZ	
Vrsta rada:	Doktorska disertacija
VR	
Autor:	Mr Maja Đurendić-Brenesel
AU	
Mentor:	Dr Neda Mimica-Dukić, red. prof. PMF-a u Novom Sadu
MN	
Naslov rada:	Distribucija opijatnih alkaloida u mozgu
NR	
Jezik publikacije:	srpski (latinica)
JP	
Jezik izvoda:	s/e
JI	
Zemlja publikacije:	Srbija
ZP	
Uže geografsko područje:	Vojvodina
UGP	
Godina:	2007.
GO	
Izdavač:	Autorski reprint
IZ	
Mesto i adresa:	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
MA	
Fizički opis rada:	Broj poglavlja: 9. Strana: 160. Lit. citata: 269. Tabela: 9. Slika: 106.
FO	
Naučna oblast:	Hemija
NO	
Naučna disciplina:	Biohemija
ND	
Predmetna odrednica/ključne reči:	Opijatni alkaloidi, heroin, humani mozak, mozak pacova, moždana kora, bazalna jedra, SPE, GC-MS, markeri oksidativnog stresa, jetra
PO	
Čuva se:	Biblioteka Departmana za hemiju PMF-a u Novom Sadu
ČU	
Važna napomena:	
VN	
Izvod:	U ovoj doktorskoj disertaciji je uspešno izvršeno izolovanje opijatnih alkaloida iz humanih bioloških uzoraka (moždanog tkiva, krvi, urina i žuči) kao i bioloških uzoraka eksperimentalnih životinja (moždanog tkiva i krvi) primenom postupka čvrsto-tečne ekstrakcije (SPE-Solid Phase Extraction). Modifikovan je postupak za kvalitativnu i kvantitativnu GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) analizu bioloških uzoraka.

Utvrđena je distribucija opijatnih alkaloida: morfina, kodeina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u humanim biološkim uzorcima moždanog tkiva (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima), pri čemu je najveći sadržaj opijata određen u moždanoj kori i bazalnim jedrima, podjednako kod muških i ženskih osoba.

Utvrđena je distribucija opijatnih alkaloida: morfina, kodeina, acetilkodeina, 6-acetilmorfina i heroina u biološkim uzorcima moždanog tkiva (moždanoj kori, moždanom stablu, amigdali i bazalnim jedrima) i krvi eksperimentalnih životinja (pacova), u različitim vremenskim periodima (5, 15, 45 i 120 minuta) od tretiranja životinja heroinom.

Najveći sadržaj opijata je određen u moždanoj kori i bazalnim jedrima, podjednako kod mužjaka i ženki pacova ali u različitim vremenskim periodima. U uzorcima krvi je najveći sadržaj opijata određen u istom vremenskom periodu kod životinja oba pola, pri čemu su kod mužjaka određene znatno veće vrednosti koncentracija, što ukazuje na bržu distribuciju opijata iz krvi u mozak kod ženki u odnosu na mužjake pacova.

Utvrđeno je da je distribucija opijata u humanom moždanom tkivu kod pripadnika suprotnih polova kao i moždanom tkivu mužjaka i ženki pacova (nakon 120 minuta od tretiranja heroinom), identična.

Ispitivanjem uticaja opijata na markere oksidativnog stresa u jetri eksperimentalnih životinja suprotnih polova, utvrđeno je smanjenje aktivnosti enzima: katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GSH-Px), peroksidaze (Px) i ksantin-oksidaze (XOD).

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN Veća: 06.07.2005.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik:

Dr Mira Popović, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Mentor:

Dr Neda Mimica-Dukić, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Član:

Dr Ksenija Kuhajda, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

Član:

Dr Miloš Tasić, red. prof. Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Član:

Dr Vesna Ivetić, red. prof. Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

Član:

Dr Milan Popović, red. prof. Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF NATURAL SCIENCES & MATHEMATICS
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:
ANO
Identification number:
INO
Document type: Monography document
DT
Type of record: Printed text
TR
Contents code: PhD Thesis
CC
Author: Maja Đurendić-Brenesel, MSc
AU
Mentor: Prof. Dr. Neda Mimica-Dukić, Faculty of Sciences, Novi Sad
MN
Title: The distribution of opiate alkaloids in brain
TI
Language of text: Serbian
LT
Language of abstract: Ser./Engl.
LA
Country of publication: Serbia
CP
Locality of publication: Vojvodina
LP
Publication year: 2007.
PY
Publisher: Author's reprint
PU
Publ.place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
PP
Physical description: Chapters: 9. Pages: 160. Literature: 269. Tables: 9. Pictures: 106.
PD
Scientific field: Chemistry
SF
Scientific discipline: Biochemistry
SD
Subject/Key words: Opiate alkaloids, heroine, human brain, rat brain, cortex, basal nuclei, SPE, GC-MS, markers of oxidative stress, liver

SKW
UC:
Holding data: Institute of Chemistry (Library)
HD
Note:
N
Abstract: Opiate alkaloids were successfully isolated from human biological samples (brain tissue, blood, urine, and bile) as well as from biological samples of experimental animals (brain tissue and blood) by applying procedure of solid-phase extraction (SPE). A modified procedure was worked out for qualitative and quantitative analysis of biological samples by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The distribution of opiate alkaloids: morphine, codeine, acetylcodeine, 6-acetylmorphine, and heroine in human biological samples of brain

tissue (cortex, brain stem, amigdala and basal nuclei) was established, showing the highest content of opiates in the cortex and basal nuclei, equal with male and female persons.

It was established how the opiate alkaloids: morphine codeine, acetylcodeine, 6-acetylmorphine and heroine are distributed in biological samples of brain tissue (cortex, brain stem, amigdala and basal nuclei) and blood of experimental animals (rats) in different time periods (5, 15, 45 and 120 min) after the animal treatment with heroine.

The highest content of opiates was found in the cortex and basal nuclei, equal in the male and female rats, but in different time periods. In blood samples, the highest content of opiates was measured in the same period with animals of both sexes, the concentration in the males being significantly higher, indicating a faster passage of the opiates from blood to brain in the female compared to male rats.

Identical distribution of opiates was found in human brain tissue of both male and female subjects as in rats of both sexes (120 min after treatment with heroine).

Study of the effect of opiates on the markers of oxidative stress in the liver of tested animals of opposite sexes showed a lowered activity of the following enzymes: catalase (CAT), glutathion-peroxidase (GSH-Px), peroxidase (Px) and xanthine-oxidase (XOD).

AB

Accepted by the Scientific Board on: 06.07.2005.

ASB

Defended:

DE

Thesis defend board:

(Degree/name/surname/tittle/faculty)

DB

President:

Prof. Dr. Mira Popović, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Mentor:

Prof. Dr. Neda Mimica-Dukić, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member:

Prof. Dr. Ksenija Kuhajda, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Member:

Prof. Dr. Miloš Tasić, Faculty of Medicine, University of Novi Sad

Member:

Prof. Dr. Vesna Ivetić, Faculty of Medicine, University of Novi Sad

Member:

Prof. Dr. Milan Popović, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

