Neuroleptička svojstva urapidila u uvjetima in vitro i in vivo

Radić, Božo

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:036239

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI
FAKULTET, BIOLOŠKI ODSJEK

Božo Radić

NEUROLEPTIČKA SVOJSTVA URAPIDILA U UVJETIMA *IN VITRO* I *IN VIVO*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Božo Radić

NEUROLEPTIC PROPERTIES OF URAPIDIL IN CONDITION *IN VITRO* AND *IN VIVO*

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Predraga Sikirića, te u Zavodu za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu pod vodstvom docentice dr. sc. Maje Jazvinšćak Jembrek, u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem mentorima koji su mi omogućili izradbu disertacije: profesoru Predragu Sikiriću koji me je naučio kako kreativno razmišljati u znanosti te mi dao povjerenje i slobodu za sve pokuse, docentici dr. sc. Maji Jazvinšćak Jembrek na velikoj pomoći, konstruktivnim kritikama i usmjeravanju u pisanju disertacije. Zahvaljujem kolegici Katarini Kolarić, tehničaru Ivanu Gržibovskom na velikom trudu pri izvođenju eksperimenata.

Mojoj Tihani zahvaljujem na strpljenju i ljubavi, bratu Ivanu na potpori u svim trenutcima, a svojim roditeljima Jeleni i Saši na slobodi i radosti koje su prenijeli na mene.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorska disertacija

NEUROLEPTIČKA SVOJSTVA URAPIDILA U UVJETIMA *IN VITRO* I *IN VIVO*

BOŽO RADIĆ

Institut Ruđer Bošković i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

SAŽETAK

Istražena su neuroleptička svojstva urapidila u štakora u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Urapidil je antihipertenziv, agonist centralnih 5-HT1a receptora i antagonist perifernih alfa 1 receptora s utjecajem na dopaminergičku transmisiju. Na stanicama PC12 i SH-SY5Y urapidil u dozi od 100 i 200 μM ne djeluje antioksidacijski (za razliku od kvercetina), niti zaustavlja smrt stanica izazvanu metamfetaminom (kao i haloperidol), ali dovodi do zaustavljanja aktivnosti efektorskih kaspaza 3/7 mitohondrijskog puta. *In vivo* u dozi od 0.25, 0.5 i 1 mg/štakoru intraperitonealno (i.p.), urapidil dovodi do povećanja lokomocije, bez izazivanja abnormalnih kretnji ili stereotipija karakterističnih za metamfetamin. Doze od 15, 20 i 25 mg/štakoru i.p. dovode do progresivne katalepsije, dok doza od 25 mg/štakoru i.p. urapidila u predtretmanu i posttretmanu zaustavlja hiperlokomociju i stereotipije izazvane metamfetaminom. Urapidil blokira aktivnost kaspaza 3/7 nakon primjene metamfetamina i iskazuje jasna neuroleptička svojstva, vjerojatno vežući se za dopaminske (D2) receptore.

(116 stranica, 24 slike, 6 tablica, 184 literaturna navoda, izvornik na hrvatskom jeziku)

Ključne riječi: urapidil, neuroleptici, metamfetamin, stanice PH12, stanice SYHS5, štakori

Mentori: prof. dr. sc. Predrag Sikirić
doc. dr. sc. Maja Jazvinšćak Jembrek

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

NEUROLEPTIC PROPERTIES OF URAPIDIL IN CONDITION *IN VITRO* AND *IN VIVO*

BOŽO RADIĆ

Ruder Boskovic Institute in Zagreb and Medical faculty, University of Zagreb

SUMMARY

Neuroleptic properties of urapidil were investigated *in vitro* and *in vivo* models in rats. Urapidil is an antihypertensive agent, agonist of central 5-HT1a and antagonist of peripheral alpha 1 receptors, with the effect on dopaminergic transmission. On PC12 and SH-SY5Y cells urapidil at doses of 100 and 200 μM is not acting like antioxidant (like quercetin does), nor stops cell death (like haloperidol) caused by methamphetamine, but blocks the activity of effector caspase 3/7 mitochondrial pathway. *In vivo* at a dose of 0.25, 0.5 and 1 mg/rat intraperitoneally (i.p.) it increases locomotion, but without causing abnormal movement or stereotypy like metamphetamine does. At doses of 15, 20 and 25 mg/rat i.p. urapidil causes progressive catalepsy. When applied as pretreatment and posttreatment it antagonizes metamphetamine induced hyperlocomotion and stereotypy. Urapidil blocks the activity of caspase 3/7 following administration of methamphetamine and expresses clear neuroleptic properties likely by binding to dopamine (D2) receptors.

(116 pages, 24 figures, 6 tables, 184 references, original in Croatian)

Key words: urapidil, neuroleptics, metamphetamine, cells PH12, cells SYHS5, rats

Supervisors: prof. dr. sc. Predrag Sikirić
doc. dr. sc. Maja Jazvinšćak Jembrek

SADRŽAJ

1. Uvod

1.1. Definicija problema 1

1.2. Ciljevi istraživanja 1

1.3. Opseg rada 2

1.4. Očekivani rezultati 4

1.5. Značaj rezultata i primjena u praksi 4

2. Pregled dosadašnjih istraživanja 6

2.1. Razlozi istraživanja neuroleptika i osnovni neurotransmisijski mehanizmi 7

2.1.1. Početci liječenja psihijatrijskih poremećaja neurolepticima 7

2.1.2. Mehanizmi djelovanja i učinci neuroleptika 7

2.1.3. Dopaminergički sustav i modeli 8

2.1.3.1. Četiri dopaminergička puta u mozgu 8

2.1.3.2. Modeli za dopaminergičku transmisiju 9

2.1.4. Glutamatergički sustav i modeli 10

2.1.5. Serotoninergički sustav i modeli 10

2.2. Animalni modeli za testiranje neuroleptičkih svojstava molekula 11

2.2.1. Osnovne karakteristike modela 11

2.2.2. Farmakološki modeli shizofrenije u glodavaca 12

2.2.3. Testovi na animalnim modelima koji predviđaju učinkovitost neuroleptika 13

2.2.3.1. Uvjetovana reakcija izbjegavanja 13

2.2.3.2. Stereotipija 14

2.2.3.3. Hiperlokomocija 14

2.2.3.4. Prekidanje pretpulsne inhibicije podražajnog refleksa (PPI) 15

2.2.3.5. Testovi relevantni za negativne i kognitivne simptome shizofrenije 16

2.2.3.6. Testovi koji predviđaju nuspojave neuroleptika 17

2.2.3.6.1. Testovi katalepsije 17

2.2.3.6.2. Prazni pokreti žvakanja (PPŽ) 18

2.3. Urapidil 19
2.3.1. Djelovanja urapidila preko dopaminergičkog sustava u središnjem živčanom sustavu 21
2.4. Metamfetamin 24
2.4.1. Molekularni mehanizmi neurotoksičnog djelovanja metamfetamina 25
2.4.2. Oksidacijski stres 25
2.4.3. Endogeni antioksidacijski sustavi 26
2.4.4. Uloga oksidacijskog stresa u metamfetaminom potaknutoj neurotoksičnosti 27
2.4.5. Apoptoza izazvana oksidacijskim stresom i neurotoksični učinak metamfetamina 30
2.4.6. Ostali molekularni mehanizmi u podlozi neurotoksičnog učinka metamfetamina 32
2.4.7. Uloga prijenosnika i receptora za dopamin u metamfetaminom izazvanoj toksičnosti 35
2.4.8. Učinak neurotoksičnih doza metamfetamina na ponašanje štakora 38
2.4.9. Metamfetamin i hipertermija 39
3. Materijali i metode 40
3.1. Pokusne životinje 41
3.2. Urapidil 41
3.3. Metamfetamin 41
3.4. Pokusni protokol 42
3.5. Bodovanje katalepsije 43
3.6. Bodovanje stereotipija 43
3.7. Mjerenje spontane lokomotorne aktivnosti 43
3.8. Mjerenje tjelesne temperature 44
3.9. Kultura stanica PC12 i SH-SY5Y 45
3.10. Kemikalije i materijal za staničnu kulturu 45
3.11. Lijekovi 46
3.12. Priprema otopina lijekova za primjenu u staničnoj kulturi 46

3.13. Medij i puferirana otopina za uzgoj i održavanje stanica PC12 i SH-SY5Y 46
3.14. Komplet za mjerenje aktivnosti kaspaza 3 i 7 46
3.15. Održavanje i presađivanje stanica PC12 i SH-SY5Y 47
3.16. Nasađivanje stanica za tretman lijekovima 47
3.17. Određivanje preživljenja stanica s pomoću MTT testa 47
3.18. Mjerenje razine nakupljanja unutarstaničnih RKV-a 48
3.19. Određivanje aktivnosti kaspaza-3/7 48
4. Statistika 50
4.1. Statistička obradba prikupljenih podataka 51
5. Rezultati 52
5.1. Učinak urapidila na lokomotornu aktivnost 53
5.2. Učinak predtretmanom urapidila na lokomotornu aktivnost 57
5.3. Učinak posttretmanom urapidila na lokomotornu aktivnost 61
5.4. Učinak urapidila na tjelesnu temperaturu 65
5.5. Učinak metamfetamina na tjelesnu temperaturu 66
5.6. Učinak urapidila kao predtretmana metamfetaminu na tjelesnu temperaturu 67
5.7. Učinak urapidila kao posttretmana metamfetaminu na tjelesnu temperaturu 68
5.8. Učinak urapidila na izazivanja katalepsije ovisno o dozi 69
5.9. Učinak predtretmana urapidilom na stereotipije izazvane metamfetaminom 71
5.10. Učinak posttretmana urapidilom na stereotipije izazvane metamfetaminom 72
5.11. Učinak metamfetamina na preživljenje stanica PC12 73
5.12. Učinak urapidila na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom 73
5.13. Učinak urapidila na preživljenje stanica SH-SY5Y tretiranih metamfetaminom 76
5.14. Učinak metamfetamina i urapidila na nakupljanje unutarstaničnih RKV-a na stanicama PC12 77

5.15. Učinak metamfetamina i urapidila na aktivnost kaspaza u uvjetima oksidacijskog stresa 78
5.16. Učinak haloperidola na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom 79
5.17. Učinak kvercetina na preživljenje i nakupljanje RKV-a na stanicama PC12 tretiranih metamfetaminom 80
6. Rasprava 82
6.1. *In vivo* učinci 83
6.1.1. Testovi hipertermije 83
6.1.2. Testovi lokomotorne aktivnosti 84
6.1.3. Testovi katalepsije 87
6.1.4. Testovi stereotipije 87
6.2. *In vitro* učinci 88
6.3. *In vitro* i *in vivo* 91
7. Zaključak 93
8. Literatura 95
Životopis 113

1. UVOD

1.1. Definicija problema

Kemijsko-fizikalna svojstva urapidila postala su poznata nakon njegove sinteze (Klemm i sur., 1977.), dok su mehanizam djelovanja urapidila i farmakološki profil proučeni te legislativno prihvaćeni pri puštanju na tržište 1981. godine (Schoetensack i sur., 1983.), gdje se uvodi u kliničku praksu kao antihipertenziv koji se i danas redovito primjenjuje (Buch, 2010.). Prema značajnom principu djelovanja svrstan je u kategoriju antagonista perifernih α1-adrenoreceptora te agonista centralnih serotonergičkih 5-HT1a receptora.

Razvijajući urapidil i tražeći potencijalno mjesto primjene, pojedina *in vitro* istraživanja 80-ih godina prošlog stoljeća upućuju na mogućnost djelovanja urapidila na neurotransmisiju dopamina (Jackisch i sur., 1987., Singer i sur., 1989.). S druge strane, do danas u literaturi postoji samo jedno opisano *in vivo* ispitivanje iz 70-ih godina prošlog stoljeća koje negira kvalitativni učinak urapidila kao centralnog blokatora dopamina (Schoetensack i sur., 1977.). Ostaje nejasno zbog čega učinci urapidila na dopaminergičku transmisiju nisu dalje istraživani jer bi to bitno promijenilo i budući tijek primjene urapidila u kliničkoj praksi.

Ovo istraživanje usmjereno je rasvjetljenju uloge urapidila kao potencijalnog neuroleptika ili spoja koji posjeduje neuroleptičke karakteristike, što daje novu dimenziju njegovoj upotrebi u odnosu na onu kakva postoji danas i mogućnost neke nove primjene u budućnosti.

1.2. Ciljevi istraživanja

Cilj je istražiti te potvrditi ili opovrgnuti neuroleptička svojstva i neuroleptički učinak urapidila na modelima za ispitivanje neuroleptika, djelujući primarno preko dopaminergičkog sustava.

1. *In vitro* – smanjujući toksično djelovanje metamfetamina na kulturi stanica PC12 i SH-SY5Y koje služe kao modeli za proučavanje svojstava dopaminergičkih neurona.
2. *In vivo* – na standardnim modelima za ispitivanje neuroleptika u štakora; izazivajući direktne i indirektne učinke koji upućuju na neuroleptička svojstva, bilo aktivacijom bilo inhibicijom dopaminergičkog sustava.

1.3. Opseg rada

Istraživanje je provedeno na nekoliko osnovnih bihevioralnih modela za ispitivanje svojstava potencijalnih neuroleptika u štakora težine 180–200 grama te modelima stanica PC12 i SH-SY5Y.

U *in vitro* modelu određivalo se sljedeće:

Nakon tretmana stanica PC12 i SH-SY5Y metamfetaminom, odnosno urapidilom, haloperidolom te kvercetinom određivali su se

1. Vijabilnost stanica putem MTT testa (sposobnosti mitohondrijskih dehidrogenaza da prevode žuti topljivi supstrat 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid (MTT) u formazan, ljubičasti produkt koji je netopiv u vodi.
   Cilj je dokazati neurotoksični učinak metamfetamina te istražiti učinak urapidila na preživljenje stanica nakon tretmana metamfetaminom.
2. Mjerenje unutarstaničnog nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta metodom fluorescencije s pomoću 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetata H_2DCF-dA.
   Cilj je dokazati značajno povišenje nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta nakon primjene metamfetamina te istražiti učinak urapidila samostalno i nakon tretmana metamfetaminom.
3. Aktivnost kaspaza-3/7 s pomoću komercijalnog kompleta (Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, Promega).
   Cilj je aktivirati unutarnji mitohondrijski (apoptotski) put nakon primjene metamfetamina te istražiti učinak urapidila na aktivnost kaspaza nakon tretmana metamfetaminom.

4. Učinak haloperidola kao tipičnog neuroleptika i antagonista D2 receptora na preživljenje stanica PC12 nakon tretmana metamfetaminom.
   Cilj je ispitati učinak haloperidola na smanjenje smrtnosti stanica nakon tretmana metamfetaminom.
5. Učinak kvercetina kao tipičnog antioksidanta iz skupine polifenola receptora na unutarstanično nakupljanje reaktivnih kisikovih vrsta na stanicama PC12 nakon tretmana metamfetaminom.
6. Cilj je ispitati učinak haloperidola na smanjenje smrtnosti stanica nakon tretmana metamfetaminom.

U *in vivo* modelu određivalo se sljedeće:

1. Učinak gradacijskih doza urapidila u štakora: 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 25 mg/životinji i praćenje životinja 2 sata od trenutka primjene.
   Cilj je direktno i/ili indirektno pokušati izazvati ponašanje ovisno o dozi, koje će se okarakterizirati kao posljedica neuroleptičkog učinka.
2. Primjena metamfetamina u dozi 40 mg/kg (Fukumura i sur., 1998.) s ciljem izazivanja dopaminergičke neurotoksičnosti koja se pratila 2 sata od trenutka primjene.
   Cilj je nedvojbeno izazvati promjenu ponašanja životinje kao posljedicu neurotoksičnosti dopaminergičke neurotransmisije.
3. Davanje neuroleptičke doze urapidila prije i poslije aplikacije metamfetamina očekujući antagonizaciju metamfetaminskog učinka.
   Cilj je pokušati spriječiti i/ili smanjiti izazvanu neurotoksičnost metamfetamina prateći karakteristične promjene ponašanja.
4. Praćenje promjene ponašanja u svim dozama urapidila i metamfetamina: učinak na lokomociju (Kelly i sur., 1998.), stereotipiju te izazivanje katalepsije (Costall i sur., 1974.). Učinak na dopaminergički sustav, bilo aktivacijom bilo blokadom, očituje se kao:
   a) promjena lokomotorne aktivnosti (kretanje u prostoru, prateći prijeđeni put u jedinici vremena)

b) nastup stereotipije (ponavljajuće radnje životinja kao što su vrtnja oko stražnjih šapa, vrtnja glavom, glodanje, grizenje, lizanje, »umivanje« šapama i sl.)

c) pojava katalepsije (vrijeme provedeno u nepomičnom položaju karakterističnom za neuroleptike).

5. Praćenje promjena tjelesne temperature samostalno i u kombinaciji urapidila i metamfetamina (očekivano povišenje temperature izazvano metamfetaminom te smanjenje temperature urapidilom).

1.4. Očekivani rezultati

Razjasniti farmakološki učinak urapidila i potvrditi njegova neuroleptička svojstva. Karakteristične promjene ponašanja te adekvatni testovi u štakora jasno bi pokazali da se urapidil ponaša kao neuroleptik u *in vivo* uvjetima. S druge strane, eksperimenti u kojima se koristi kombinacijom neuroleptičkih doza urapidila i metamfetamina potvrdili bi da je učinak urapidila najvjerojatnije posljedica blokade dopaminergičkog sustava. Dodatno, u *in vitro* istraživanjima na kulturi stanica dobila bi se stanična potvrda učinka te razjasnili unutarstanični mehanizmi promjena nastalih djelovanjem urapidila.

1.5. Značaj rezultata i primjena u praksi

Zbog česte primjene urapidila u kliničkoj praksi (trudnice u stanju preeklampsije i eklampsije, hipertenzivne krize, refraktorne hipertenzije), potvrdni rezultati trebali bi utjecati na drukčiji pristup u korištenju urapidila. Učinak urapidila kao lijeka koji posjeduje dopaminergički učinak i/ili neuroleptička svojstva svakako bi stvorio novi pogled pri primjeni, bilo u akutnoj bilo u kroničnoj varijanti.

Urapidil se često daje u akutnoj i kroničnoj terapiji hipertenzije, a ne zna se ima li to ikakvoga negativnog ili pozitivnog učinka na psihološko/psihijatrijski profil osobe. S druge strane, nikada nije objavljen niti jedan podatak o učinku urapidila na bolesnike oboljele od shizofrenije.

Svakako bi značajno bilo i praćenje novorođenčadi čije su majke primale urapidil jer urapidil prolazi placentarnu barijeru. Do danas se ne zna izaziva li učinak urapidila promjene na fetusu koje se očituju nakon rođenja.

S druge strane, potvrda neuroleptičkih svojstava otvara mogućnost primjene urapidila ili njemu sličnih analoga kao nove terapije u liječenju psihotičnih stanja i bolesti.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Razlozi istraživanja neuroleptika i osnovni neurotransmisijski mehanizmi

2.1.1. Početci liječenja psihijatrijskih poremećaja neurolepticima

Shizofrenija je psihijatrijski sindrom čija prevalencija iznosi 1%, što jasno pokazuje o koliko učestalom sindromu je riječ. Uzimajući u obzir psihopatološke karakteristike i promjene ponašanja, manifestacije shizofrenije podijeljene su u nekoliko skupina simptoma koje se sastoje od pozitivnih, negativnih i kognitivnih tipova. *Pozitivni simptomi* uključuju psihoze, manifestiraju se kao iluzije i halucinacije, zatim paranoja, nemir i hiperaktivnost. *Negativni simptomi* obuhvaćaju socijalno povlačenje, afektivnu tupost i nedostatak motivacije. Konačno, za *kognitivne promjene* tipične su promjene u učenju, memoriji, pažnji i izvršnim funkcijama (van Os i sur., 2009., Ibrahim i sur., 2011.). Unatoč sve boljem razumijevanju neurobiologije i patopsihologije toga sindroma, mnogi oboljeli imaju vrlo lošu prognozu. Terapija shizofrenije gotovo se uvijek temelji na farmakološkoj intervenciji neuroleptičkim lijekovima koji su uvedeni u kliničku praksu nakon otkrića učinaka prvog neuroleptika klorpromazina 1952. godine (Ban, 2007.).

2.1.2. Mehanizmi djelovanja i učinci neuroleptika

Glavni mehanizam kliničke djelotvornosti neuroleptika je smanjenje dopaminom posredovane neurotransmisije bilo antagonizacijom ili djelomičnom agonizacijom na D2 dopaminskim receptorima (Kapur i sur., 2003.). Na žalost, učinkovitost tih lijekova ograničena je na određene simptome shizofrenije i njihova primjena je povezana s ozbiljnim nuspojavama (Miyamoto i sur., 2005., van Os i sur., 2009., Pratt i sur., 2012.).

Točnije, prva generacija antipsihotika, čiji predstavnici su, na primjer, klorpromazin i haloperidol, učinkoviti su uglavnom u uklanjanju pozitivnih simptoma shizofrenije.

Nadalje, dopaminergička blokada koju izazivaju dovodi do ekstrapiramidalnih nuspojava, koje se u kratkom roku karakteriziraju kao motoričke promjene slične onima kod Parkinsonove bolesti (bradikinezija, tremor, ukočenost mišića i položajna nestabilnost), dok dugotrajno liječenje dovodi do teških promjena, poput diskinezije, koju karakteriziraju neprirodni i nekontrolirani pokreti. Druge nuspojave koje se odnose na

inhibiciju dopamina uključuju akatizije (obrazac nervoznih pokreta poput vrtenja nogu, ljuljanja, tapšanja rukama ili nogama ili nemogućnosti da se dulje zadrži ista pozicija), distonije (nevoljni trzajevi, grčenje ili pomicanje mišića) i galaktoreju (Ellenbroek, 2012.).

Klozapin, olanzapin, kvetiapin, risperidon, aripiprazol su neuroleptici druge generacije spojeva ili atipični neuroleptici jer se za njih drži da će s manjom vjerojatnošću izazivati takve nuspojave. Ipak, oni mogu povećati tjelesnu težinu, izazvati dijabetes, te je njihova primjena povezana sa sedativnim svojstvima, epileptičkim napadima i drugim neželjenim učincima (Gardner i sur., 2008.). Većina tih spojeva također ima ograničenu učinkovitost protiv negativnih i kognitivnih simptoma shizofrenije, stoga je danas upitna korisnost koncepta koji pravi podjelu na tipične i atipične neuroleptike (Gardner i sur., 2009., Leuch i sur., 2009.).

2.1.3. Dopaminergički sustav i modeli

2.1.3.1. Četiri dopaminergička puta u mozgu

Danas se drži da postoje 4 relevantna puta dopaminergičke transmisije putem kojih se utječe na liječenje shizofrenije. Blokirajući te puteve, neuroleptici imaju pozitivne (antipsihotičke), ali i negativne učinke (nuspojave) na organizam.

Ti putevi su:

a) ***Mezolimbički*** (povezan s pozitivnim simptomima)
Anatomija: ventralno područje tegmentuma – *nucleus accumbens*
Fiziologija: motivacija, emocije, nagrada

b) ***Mezokortikalni*** (povezan s negativnim i kognitivnim simptomima)
Anatomija: ventralno područje tegmentuma – korteks
Fiziologija: kognitivne i izvršne funkcije (dorzolateralni prefrontalni korteks), emocije i afekti (ventromedijalni prefrontalni korteks)

c) ***Nigrostrijatalni*** (povezan s ekstrapiramidnim nuspojavama – parkinsonizam – i tardivnom diskinezijom. Sadržava oko 80% ukupne količine dopamina mozga.)
Anatomija: *substantia nigra* (*pars compacta*) – *striatum* (*caudatus* i *putamen*)
Fiziologija: stimulacija voljnih pokreta

d) ***Tuberoinfundibularni*** (povezan s hiperprolaktinemijom)
Anatomija: hipotalamus (arkuatna i periventrikularna jezgra) – infundibularna regija
Fiziologija: tonički inhibira otpuštanje prolaktina.

2.1.3.2. Modeli za dopaminergičku transmisiju

Opažanja i dosadašnja istraživanja dovela su do dopaminski uvjetovane hipoteze shizofrenije, koja predlaže da su barem pozitivni simptomi shizofrenije rezultat prekomjerne aktivnosti dopaminergičkih mezolimbičkih puteva (Kapur i sur., 2005., Mouri i sur., 2013.). Više dokaza danas potvrđuje tu hipotezu. Nedavno su studije pozitronskom elektronskom tomografijom pokazale da postoji povećanje sinteze dopamina u shizofrenih bolesnika koji do tada nikada nisu uzimali lijekove u odnosu na kontrolnu skupinu jednake dobi (Howes i sur., 2009., Brunelin i sur., 2010.). Isto tako je pokazano da amfetamin povećava otpuštanje dopamina kod bolesnika koji do tada nikada nisu uzimali lijekove u odnosu na kontrolnu skupinu (Breier i sur., 1997.).

Iz svega se može zaključiti da dopamin igra važnu ulogu u razumijevanju i proučavanju shizofrenije. U skladu s tim, animalni modeli koji se koriste za ispitivanje dopaminergičke transmisije imaju cilj kvantificirati promjene ponašanja kao odgovor na davanje psihoaktivnih supstanci i lijekova koji povećavaju nakupljanje dopamina u sinaptičkoj pukotini (*amfetamin i metamfetamin* povećavaju oslobađanje dopamina; *kokain* blokira ponovni unos dopamina, dok se *apomorfin* izravno veže i aktivira D2 receptore). S druge strane, molekule koje imaju sposobnost antagonizacije navedenih učinaka trebale bi imati neuroleptički učinak, a to se posebno odnosi na blokadu D2 dopaminskih receptora kao specifičnog mjesta djelovanja.

2.1.4. Glutamatergički sustav i modeli

S obzirom na to da dopaminergička hipoteza samostalno ne daje odgovarajuće objašnjenje za nekoliko značajki shizofrenije, osobito one koje se odnose na negativne i kognitivne simptome, pojavile su se i druge hipoteze o nastanku shizofrenije. Jedna od njih je poremećaj glutamatom posredovane neurotransmisije.

Glutamat je glavni ekscitacijski neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu i ostvaruje svoje djelovanje putem interakcije s ionotropnim receptorima za N-metil-D-aspartat (NMDA), alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionsku kiselinu (AMPA) i kainat, kao i s metabotropnim receptorima (Coyle i sur., 2012.). Jedan od važnih pokazatelja da glutamat može igrati ulogu u shizofreniji bio je dokaz smanjenja koncentracije glutamata u likvoru bolesnika s tim poremećajem (Kim i sur., 1980.). To je u skladu s činjenicom da se primjena subanestetičkih doza antagonista NMDA receptora, poput ketamina, fenilciklidina (»anđeoski prah«) i dizocilpina (također poznatog kao MK801), očituje psihomimetičkim aktivnošću i narušava kognitivne procese (Pratt i sur., 2012., Coyle i sur., 2012.). Ti učinci nalikuju na pozitivne i negativne simptome shizofrenije. Osim toga, akutni učinak tih spojeva povećava razinu izvanstaničnog dopamina u prefrontalnom korteksu i mijenja uzorak aktivacije dopaminergičkih neurona u *nucleusu accumbensu* (Carsson i sur., 2001., Large, 2007.).

Dakle, poremećena glutamatergička transmisija može biti uključena u patofiziologiju shizofrenije (Kristiansen i sur., 2007., Coyle i sur., 2012.).

Kao i kod dopamina, standardizirani farmakološki modeli koji ispituju djelovanje neuroleptika čiji se učinak temelji na glutamatergičkoj hipotezi, imaju za cilj blokiranje NMDA-receptora (Moghaddam i sur., 2003., Large, 2006.).

2.1.5. Serotoninergički sustav i modeli

Ideja da serotonin može biti uključen u patofiziologiju shizofrenije u velikoj mjeri temelji se na činjenici da halucinogene tvari, kao što su dietilamid lizergične kiseline (LSD), psilocibin i meskalin, barem djelomično, djeluju modulacijom receptora serotonina tipa 2 (5-HT2) (Vollenweider i sur., 2010.). U glodavaca, akutna ili kronična primjena tih lijekova potiče abnormalnosti u ponašanju, kao što su grebanje, lupkanja prednjim šapama, nekontrolirani trzajevi glavom i povlačenje donje usnice (Meltzer i sur., 2003., Vollenweider i sur., 2010.). Neki od tih učinaka mogu ovisiti o funkcionalnoj

interakciji između dopaminskih i serotoninskih puteva u mozgu (Meltzer, 1999., Carlsson i sur., 2001., Meltzer i sur., 2003.). Neke studije pokazuju da se uz smanjenje gustoće 5-HT2a receptora u prefrontalnom korteksu pacijenata javlja i značajno povećanje gustoće dopaminskih D2 receptora u *nucleusu caudatusu*, što upućuje na to da disfunkcija serotonergičke aktivnosti može pridonijeti promjeni dopaminergičkih funkcija prisutnih u shizofreniji (Meltzer, 1999., Kapur i sur., 2005.).

Otkriće da učinci nekih neuroleptika mogu biti posljedica, barem djelomično, sposobnosti njihovog vezanja na različite 5-HT receptore, posebno 5-HT2a i 5-HT1a, upućuje na zaključak da serotonin može igrati važnu ulogu u razumijevanju shizofrenije (Meltzer i sur., 2011.). U tom kontekstu, serotonergički modeli shizofrenije izazivaju se primjenom izravnih agonista, kao što je halucinogen 2,5-dimetoksi-4-iodoamfetamin (DOI), koji je kemijski i djelovanjem sličan LSD-u ili spojevima koji oslobađaju serotonin, kao što je 3,4 metiledenioksimetamfetamin (MDMA) (Castagne i sur., 2009., Peleg-Raibstein i sur., 2012.).

2.2. Animalni modeli za testiranje neuroleptičkih svojstava molekula

2.2.1. Osnovne karakteristike modela

Istraživanja na laboratorijskim životinjama predstavljaju neizbježan pristup za proučavanje poremećaja u ponašanju koji se odnose na mentalna oboljenja i otkrivanje novih farmakološki djelatnih molekula, koje bi bile potencijalni kandidati za razvoj lijekova, odnosno liječenje oboljelih (Castagne i sur., 2009., Pratt i sur., 2012.).

Animalni modeli, međutim, moraju ispuniti kriterije valjanosti. Model mora prikladno imitirati neurobiološki mehanizam poremećaja (*konstruktivna valjanost*). Također, mora postojati sličnost promjene u ponašanju kod modela i u kliničkoj praksi, mora postojati sličnost s humanim ponašanjem (*usporedna valjanost*). Na kraju, vrlo je bitna i prediktivna karakteristika modela (*prediktivna valjanost*), odnosno procjena specifičnosti i senzitivnosti modela na uočavanje farmakološkog učinka, da bi se što više smanjila mogućnost lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata.

2.2.2. Farmakološki model shizofrenije u glodavaca

Do danas su razvijene tri glavne neurokemijske hipoteze shizofrenije u skladu s molekulama (lijekovima) koje ostvaruju svoje međudjelovanje s neurotransmisijom dopamina, serotonina i/ili glutamata. Lijekovi koji interferiraju s tim sustavima izazivaju određene promjene u ponašanju u laboratorijskih životinja (glodavaca), koje je moguće antagonizirati aplikacijom neuroleptika. Modeli su prikazani u tablici 1 (Gobira i sur., 2013.):

Tablica 1. Povezanost bihevioralnih testova, simptoma i farmakološkog djelovanja kod proučavanja neuroleptika u laboratorijskih glodavaca

Bihevioralni testovi	Simptomi shizofrenije	Farmakološko djelovanje
Uvjetovana reakcija izbjegavanja	-	-
Stereotipije	Pozitivni simptomi: stereotipije, agitacija	Dopaminski agonisti, NMDA antagonisti
Hiperlokomocija	Pozitivni simptomi: agitacija, hiperaktivnost	Dopaminski agonisti, NMDA antagonisti
Prekidanje pretpulsne inhibicije podražajnog refleksa	Kognitivni simptomi: deficit pažnje	Dopaminski agonisti, NMDA antagonisti, 5-HT2 agonisti
Smanjenje socijalne interakcije	Negativni simptomi: socijalno povlačenje	NMDA antagonisti
Pogoršani rezultati u Morrisovom vodenom labirintu ili testu prepoznavanja objekata	Kognitivni simptomi: poremećaji memorije i učenja	NMDA antagonisti

2.2.3. Testovi na animalnim modelima koji predviđaju učinkovitost neuroleptika

Određivanje neuroleptičke aktivnosti laboratorijskih životinja sastoji se od procjene je li ispitivani lijek u mogućnosti spriječiti ili povratiti određene promjene ponašanja koje imaju karakteristični bihevioralni obrazac nakon primjene farmakoloških spojeva (Tablica 1) te se određuju uvjetovana reakcija izbjegavanja (URI), stereotipija, hiperlokomocija i prekidanje pretpulsne inhibicije podražajnog refleksa (PPI).

2.2.3.1. Uvjetovana reakcija izbjegavanja

Za razliku od drugih modela, URI ne zahtijeva aplikaciju farmakološkog sredstva da bi se izazvalo abnormalno ponašanje (točnije, to nije farmakološki model u punom smislu te riječi). URI je jedan od najstarijih klasičnih testova s ciljem predviđanja terapijskog učinka potencijalnog neuroleptika (Wadenberg, 2010.). Kod URI-ja, životinje su trenirane da izbjegnu pojavu negativne stimulacije, obično strujnog udara, nakon svjetlećeg ili zvučnog podražaja, pokazujući specifičan odgovor u nekom prostoru (obično prozirnom kavezu), kao što je bijeg na drugu stranu kaveza (Geyer i sur., 2003., Castagne i sur., 2009.).

Neuroleptici blokiraju URI (životinje ne izbjegavaju strujni udar) u dozama koje ne ometaju sposobnost bijega životinje nakon početka poticaja, a koje koreliraju s klinički relevantnim dozama (Wadenberg, 2010.). Zanimljivo je da je potrebno oko 70% zasićenja strijatalnih D2 receptora za inhibiciju URI-ja, što je slično pragu potrebnom za terapijski učinak neuroleptika kod ljudi (Wadenberg i sur., 2000., Geyer i sur., 2003., Wadenberg, 2010.). Osim toga, taj test ima nisku razinu lažno pozitivnih rezultata, kao što je slučaj sa sedativnim lijekovima (npr. benzodiazepinima), koji narušavaju oba izbjegavanja (reakciju na podražaj i na strujni udar). Što se tiče prediktivne valjanosti, taj test je pouzdan za identifikaciju novih lijekova, te je jednostavan, brz i jeftin. No njegova usporedna valjanost jako je niska (Wadenberg, 2010.).

2.2.3.2. Stereotipija

Stereotipija je izrazito obilježje shizofrenije karakterizirano ponavljajućim, nepromjenjivim i besmislenim, nesvrsishodnim ponašanjem. U novije vrijeme stereotipija je definirana kao fenomen koji obuhvaća isključivo ponavljajuće motoričke radnje, na taj način ih razlikujući od perseveracija koje su specifične za kognitivne promjene ponašanja (Morrens i sur., 2006.). Stereotipija se lako potakne kod glodavaca te se očituje kao »umivanje« šapama, mirisanje, grizenje šipki na kavezu, hod unatrag, itd. Te reakcije mogu biti inducirane izravnim (apomorfin) i neizravnim (amfetamin/metamfetamin) dopaminergičkim agonistima. Čini se da je reakcija potaknuta posebice stimulacijom D2 receptora u dorzalnom strijatumu, te manje u *nucleusu accumbensu*, pretpostavljenom mjestu za terapeutsku aktivnost neuroleptika (Peleg-Raibstein i sur., 2012.).

Razni tipični i atipični neuroleptici inhibiraju apomorfinom i amfetaminom/metamfetaminom izazvane stereotipije. Antagonisti NMDA receptora također induciraju stereotipije, a poremećaji izazvani tim spojevima, bilo akutno bilo kronično, također se mogu spriječiti primjenom neuroleptika (Porsolt i sur., 2010., Bondi i sur., 2012.). Prednost tog testa jest da se stereotipije mogu lako kvantificirati, uz minimalne troškove i brze rezultate. Antagonizacija stereotipija primjenom neuroleptika ima dobru prediktivnu valjanost. Ipak, činjenica da takvo ponašanje više ovisi o dopaminergičkom djelovanju u dorzalnom strijatumu nego u *nucleusu accumbensu* (pretpostavljenom mjestu za neuroleptički učinak lijekova) pokazuje da je njegova konstruktivna valjanost ograničena (Peleg-Raibstein i sur., 2012.).

2.2.3.3. Hiperlokomocija

Povećanje kretanja (lokomotorne aktivnosti) izazvano lijekovima kod glodavaca slično je pozitivnim simptomima shizofrenije. Takav je učinak rezultat povećane dopaminergičke aktivnosti u mezolimbičkom putu i *nucleusu accumbensu* (Iversen, 1987.).

Učinak se može potaknuti davanjem izravnih i neizravnih dopaminergičkih agonista (Geyer i sur., 2003., Peleg-Raibstein i sur., 2012.), ili antagonistima NMDA receptora (Large 2007., Pratt i sur., 2012.).

Što se tiče prediktivne valjanosti, hiperlokomocija se učinkovito sprječava tipičnim i atipičnim neurolepticima (Moreira i sur., 2005., Leitte i sur., 2008., Castagne i sur., 2009.). Ipak, spojevi koji izazivaju sedativni učinak mogu dati lažno pozitivne rezultate. Stoga je pri testiranju potrebna obvezna kontrolna grupa tako da se vidi učinak na osnovno spontano kretanje, kako bi se osiguralo da smanjenje hiperlokomocije nije sekundarni učinak sedativnog djelovanja lijeka. Između ostalih parametara, drugi problem vezan uz primjenu testa hiperlokomocije je nedostatak standardizacije – trajanje ispitivanja, intenzitet svjetla u sobi, veličina prostora za ispitivanje, itd.

Unatoč nedostatcima, taj test ima nisku cijenu i dobru reproducibilnost. Osim toga, reakcija se lako procjenjuje, što je prikladno za početno ispitivanje novih kandidata neuroleptika u glodavaca (Peleg-Raibstein i sur., 2012.). Tipični primjeri testiranja su učinci haloperidola i klozapina nasuprot povećanoj lokomotornoj aktivnosti izazvanoj amfetaminom/metamfetaminom.

2.2.3.4. Prekidanje pretpulsne inhibicije podražajnog refleksa (PPI)

PPI nastoji simulirati kognitivni deficit obradbe informacija, koji se obično javlja u bolesnika sa shizofrenijom. Kod kontrolnih zdravih životinja, neočekivani glasan zvučni podražaj (*puls*) izaziva tipičan odgovor nazvan podražajni refleks (npr. bijeg na drugu stranu kaveza ili jaki drhtaj tijela). No ako pulsu prethodi slabiji, tiši zvučni podražaj (*pretpuls*, koji sam po sebi ne potiče podražajni refleks), tada je podražajni refleks nakon pulsa inhibiran (dakle, riječ je o pretpulsnoj inhibiciji). Osobe koje boluju od shizofrenije imaju manjak PPI, što znači da pokazuju podražajni refleks čak i kada pulsu prethode pretpulsevi (Geyer i sur., 2002., Geyer i sur., 2003., Li i sur., 2009.). Tretman s izravnim ili neizravnim agonistima dopamina oponaša deficit obradbe informacija karakterističnih za shizofreniju, što utječe na poremećaj PPI (Geyer i sur., 2001.). Taj se učinak može antagonizirati neurolepticima, kao što su klozapin, haloperidol, klorpromazin, risperidon i kvetiapin (Swerdelow i sur., 1998., Geyer i sur., 2001.). Serotonergički agensi poput

DOI ili MDMA također su u mogućnosti izazvati deficit PPI (Geyer i sur., 2001., Geyer i sur., 2003., Adams i sur., 2008., Castagne i sur., 2009.). Drugi farmakološki mehanizam remećenja PPI jest primjena antagonista NMDA receptora. Takav model, za razliku od ostalih navedenih, omogućuje razlikovanje jesu li posrijedi učinci karakteristični za tipične, odnosno atipične neuroleptike (Geyer i sur., 2003., Porsolt i sur., 2010.), a eksperimentalni profil sličan je primjeni antagonista NMDA receptora u ljudi (Geyer i sur., 2003., Castagne i sur., 2009.). Taj test je značajan u istraživanjima neuroleptika jer ima visoku usporednu valjanost (kod ljudi se lako mjeri kao refleks treptanja očiju), ali manjkavost mu je što zahtijeva skuplju opremu. Specifični neuroleptički učinak očituje se u tome što lijek ponovno uspostavi PPI, bez utjecaja na reakciju izazvanu samim pulsom.

2.2.3.5. Testovi relevantni za negativne i kognitivne simptome shizofrenije

Neki testovi ponašanja, iako nisu specifično vezani uz shizofreniju i neuroleptičko djelovanje, mogu biti korisni u predviđanju učinkovitosti protiv negativnih simptoma shizofrenije. Većina njih sastoji se od antagonizacije određenih deficita izazvanih subanestetičkim dozama antagonista NMDA receptora. Jedan od primjera je test socijalne interakcije. Socijalna interakcija u štakora smanjuje se nakon aplikacije ketamina, fenciklidina i dizocilpina, a obnavlja se nakon davanja neuroleptika. Treba napomenuti da su učinci konzistentniji kada su u pitanju atipični neuroleptici (Lipska i sur., 2000., Lieberman i sur., 2008., Porsolt i sur., 2010., Peleg-Raibstein i sur., 2012.). Taj učinak nije specifičan samo za neuroleptike jer i anksiolitici povećavaju socijalnu interakciju u štakora. Unatoč nedostatcima, navedeni je test značajan za istraživanja s obzirom na to da sadašnji neuroleptici imaju vrlo ograničeno djelovanje na negativne simptome. Isto tako, kognitivni poremećaji, kao vrlo česti simptomi shizofrenije, ne poboljšavaju se sadašnjim lijekovima koji se koriste u liječenju. Prema tome, postoji potreba za lijekovima koji mogu poboljšati deficit učenja i pamćenja u tom poremećaju. Deficit pamćenja može se izazvati različitim protokolima i odrediti raznim testovima, ali treba napomenuti da u ovom slučaju ti testovi nisu specifični samo za testiranje neuroleptika (Lipska i sur., 2000., Lieberman i sur., 2008., Porsolt i sur., 2010., Peleg-Raibstein i sur., 2012.).

2.2.3.6. Testovi koji predviđaju nuspojave neuroleptika

Kratkotrajna primjena prve generacije neuroleptika izaziva ekstrapiramidne nuspojave koje uključuju rane i kasne simptome. Rani simptomi uključuju parkinsonizam (ukočenost mišića, usporene kretnje i tremor), distoniju i akatiziju, bradikineziju (usporenje pokreta) i tremor. Dugotrajna primjena prve generacije neuroleptika dovodi do kasnog simptoma koji se naziva tardivna diskinezija, a sastoji se od abnormalnih, prekomjernih i nehotičnih pokreta mišića lica i ekstremiteta (Egan i sur., 1996.). Unatoč brojnim istraživanjima, mehanizmi kojima se ostvaruju ti učinci do danas nisu potpuno razjašnjeni. Oni uključuju pojačanu osjetljivost na dopamin, ekscitotoksičnost, stvaranje slobodnih radikala i smanjenje gustoće dopaminskih transportera (Casey i sur., 2000.).

Za otkrivanje spojeva koji izazivaju te nuspojave i razumijevanje mehanizama njihovog djelovanja primjenjuju se testovi navedeni u tablici 2 (Gobira i sur., 2013.).

Tablica 2. Bihevioralni testovi i moguće ekvivalentne nuspojave neuroleptika u glodavaca

Bihevioralni testovi	Nuspojave	Tretman
Katalepsija	Parkinsonizam, ekstrapiramidni učinci	Akutni
Prazni pokreti žvakanja	Tardivna diskinezija	Kronični

2.2.3.6.1. Testovi katalepsije

Katalepsija se u laboratorijskih životinja definira kao nemogućnost ispravljanja nametnutog stava. Test se vrlo često izvodi i sastoji se od mjerenja latencije do pomicanja životinje iz neobičnog i neugodnog tjelesnog položaja (Sanberg i sur., 1988.). Najčešće se koristi procjena na šipki, u kojoj je životinja postavljena tako da se stražnjim šapama

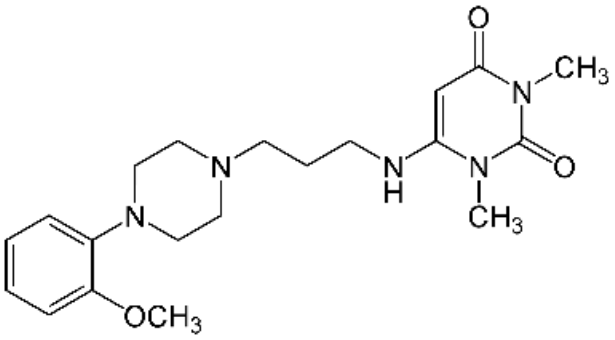
oslanja na podlogu, a prednje šape su joj postavljene na šipku koja se nalazi iznad podloge. Mjeri se vrijeme potrebno da životinja pomakne obje prednje šape sa šipke ili da se cijela popne na šipku (odvoji stražnje šape od podloge). Test katalepsije često se rabi za ispitivanje neuroleptika s ciljem procjene poticanja ekstrapiramidalnih nuspojava, odnosno sposobnost izazivanja katalepsije je jasna pretpostavka neuroleptičkih svojstava ispitivane supstance. Općenito, doze koje su potrebne za izazivanje katalepsije su one pri kojima je zauzeto oko 80% D2 receptora u strijatumu, što je više nego za predviđeni neuroleptički učinak, koji zahtijeva oko 65–70% zauzimanja D2 receptora (Wadenberg i sur., 2010.). Doza lijeka potrebna da se izazovu katalepsija i neuroleptički učinak varira u rasponu od vrlo male, kao što je slučaj za haloperidol, do vrlo visoke, kao što je slučaj za klozapin (Gerlach i sur., 1991., Moreira i sur., 2005.). Dodatno, doze neuroleptika koje su potrebne da bi se izazvala katalepsija kod životinja, dobro koreliraju s dozama koje izazivaju ekstrapiramidne nuspojave kod ljudi (Gerlach i sur., 1991.). Prema tome, taj test ima vrlo visoku prediktivnu valjanost, a uz to je jeftin, jednostavan, reproducibilan i lako se izvodi (Sanberg i sur., 1988., Hoffman i sur., 1995.).

2.2.3.6.2. Prazni pokreti žvakanja (PPŽ)

Jedna od najznačajnijih nuspojava neuroleptika je tardivna diskinezija. Klinički je značajna zbog visoke prevalencije, jakog utjecaja na kvalitetu života te trajanja i nakon što se ukine terapija neurolepticima (Tarsy i sur., 1977., De Leon, 2007., Woods i sur., 2010.). Najkorišteniji i prihvaćen test za proučavanje te nuspojave u štakora je test orofacijalne diskinezije, koja se očituje kao »prazni« pokreti žvakanja (PPŽ) jer životinja u ustima nema hranu (Klawans i sur., 1972.). Test nije prikladan za miševe jer su oni mnogo manji i imaju znatno brže pokrete koji prekrivaju jasno uočavanje i kvantifikaciju orofacijalnih pokreta (Tomiyama i sur., 2001.). Valjanost testa PPŽ temelji se na sličnosti s tardivnim diskinezijama kod ljudi jer su simptomi kronični, promjenjivi i nastavljaju se dugo nakon prestanka uzimanja ispitivane molekule (Turrone i sur., 2003.). Sve životinje koje su izložene dugotrajnom učinku neuroleptika ne razviju PPŽ, nego incidencija raste s dobi. Simptomi se katkad mogu potaknuti stresom, što je slično kliničkim opažanjima u ljudi (Ellison i sur., 1989., Crowley i sur., 2012.). Obično se životinje tretiraju sporo otpuštajućim (depo) preparatima neuroleptika, kao što su haloperidol i flufenazin u

trajanju od 4 do 36 tjedana (Stoessl i sur., 1989., Petersen i sur., 2000.). Kod određivanja stupnja PPŽ, životinje se postave u odvojene kaveze sa zrcalima ispod dna kaveza da bi pokreti usta i čeljusti bili lakše uočljivi. Nakon vremena prilagodbe mjeri se broj PPŽ. PPŽ je definiran kao jedno otvaranje usta koje nije usmjereno fizičkom objektu. Također se mjere ukupno trajanje facijalnog tremora i broj izbacivanja jezika u jedinici vremena (Burger i sur., 2005.). Kod životinje do pojave PPŽ dolazi nakon 3–4 tjedna od početka davanja neuroleptika (kratkoročni PPŽ). Drži se da kratkoročni PPŽ više reflektira akutne ekstrapiramidne nuspojave, za razliku od dugoročnog PPŽ koji odgovara razvoju tardivne diskinezije. Ipak, prediktivna valjanost PPŽ kao modela za procjenu tardivne diskinezije i danas je kontroverzna jer je riječ o kompleksnom entitetu s različitim očitovanjem kod ljudi (Egan i sur., 1996., Marchese i sur., 2004.).

2.3. Urapidil



Slika 1. Kemijska struktura urapidila

Godine 1948. opisano je da N^2-supstituirani fenilpiperazini posjeduju adrenergičku aktivnost (Bovet i sur., 1948.). Do otkrića urapidila pokazano je da derivati fenilpiperazina imaju širok spektar djelovanja; od hipotenzivnog (blokiranje alfa receptora), depresivnog učinka na središnji živčani sustav, antidepresivnog do antihistaminskog. Čak su se neki od spojeva prikazali prikladnima za liječenje endogene i egzogene psihoze. Ipak, u eksperimentima provedenima na životinjama, nijedan od

spojeva koji je imao svojstva alfa blokatora nije dostizao značajan terapeutski potencijal na hipertenziju. S obzirom na to da su tahikardija, ortostatska hipertenzija i dijareja sprječavale upotrebu klasičnog alfa blokatora fentolamina, opće je stajalište bilo da spojevi koji blokiraju postsinaptičke alfa receptore neće biti prikladni kao antihipertenzivi.

Urapidil, kemijskog naziva 6- {3- [4- (o-metoksifenil) piperazinil] -propilamino} - l, 3-dimetiluracil (Slika 1), jest spoj koji su 1976. godine sintetizirali Klemm i Prüsse u istraživačkom laboratoriju Byk Gulden Pharmaceuticals u Konstanzu u Njemačkoj. Odabran je iz velike skupine fenilpiperazina koji su bili supstituirani s pirimidinima, piridinima, kvinazolinom, teofilinom, imidazolom ili uracilom. Odnos učinka na hipotenziju, postsinaptičku blokadu alfa receptora i centralnu sedaciju služio je kao kriterij odabira. Tražio se spoj koji bi izazivao hipotenziju blokirajući alfa receptore, a ne bi imao značajan centralni sedativni učinak. Od ispitivanih molekula, urapidil se pokazao kao najbolji jer se nakon određivanja koeficijenta permeabilnosti očekivalo da prema tom koeficijentu također ima dobru parenteralnu apsorpciju i može prelaziti krvno-moždanu barijeru (Klemm, 1981.) Kod štakora i psa urapidil se jako dobro apsorbira, gotovo 100%. Brzina apsorpcije nakon intraduodenalne primjene karakterizirana je poluvremenom apsorpcije urapidila od 0,6 sati.

U pokusima obilježavanja s radioaktivnim ugljikom (^{14}C-urapidil) kod čovjeka, određena mu je maksimalna bioraspoloživost od 72%. Peroralna primjena ^{14}C-urapidila doseže svoj maksimum koncentracije u krvi unutar 30 minuta. Nakon apsorpcije vidljiva je i brza distribucija u organizmu. Po intravenskoj primjeni nalazi se u većini tkiva i organa za 10 do 20 minuta, dok se kod peroralne primjene komparativne koncentracije vide nakon 2 do 3 sata. Radioaktivna istraživanja na homogenatima mozga pokazala su da je mala količina radioaktivnog urapidila prošla krvno-moždanu barijeru. Pokazalo se da je poluvrijeme distribucije ^{14}C-urapidila 1,5–2 sata, dok je poluvrijeme eliminacije bilo 9–10 sati. Nakon 24 sata prisutno je samo 4 do 5% ^{14}C-urapidila u krvi. Nakon ponovljene peroralne primjene (2 puta dnevno, u 8 i 16 sati) ^{14}C-urapidila u štakora stabilno stanje postiže se nakon 3 dana, odnosno poslije 5. aplikacije. Maksimalna koncentracija nakon višekratne primjene je oko 25% veća nego nakon jednokratne primjene. Izlučivanje urapidila je 43% urinom i oko 50% zbog bilijarne ekskrecije, a potpuno izlučivanje događa se nakon 48 sati (Schoetensack i sur., 1983.).

Tri glavna puta preko kojih se metabolizira većina urapidila su p-hidroksilacija i O-demetilacija metoksifenilnog prstena te N^1-demetilacija uracilnog ostatka. Oko 15% se izluči urinom nemetabolizirano (Schoetensack i sur., 1983.).

2.3.1. Djelovanje urapidila preko dopaminergičkog sustava u središnjem živčanom sustavu

Schoetensack i suradnici 1977. godine objavljuju prvi rad koji ispituje učinke urapidila na dopaminergičku transmisiju te u tom radu zaključuju da urapidil u dozi od 10 do 100 mg/kg primijenjen peroralno ima centralno sedativni učinak u miševa, štakora, mačaka i pasa, koji se može prekinuti različitim vanjskim podražajem (npr. glasan zvuk ili jako svjetlo). Spontana pokretljivost u miševa je smanjena kada se peroralno primijeni u dozi od 10 mg/kg. Jednostavni obrambeni refleksi kod miševa nestaju od 80 mg/kg. Na 100 mg/kg urapidil smanjuje spontanu pokretljivost i motoričku koordinaciju na pokretnoj traci u miševa. U normotenzivnih štakora, nakon peroralne primjene od 25 do 100 mg/kg, na elektroencefalogramu (EEG) potencijali moždane aktivnosti korteksa su niske amplitude i visoke frekvencije. NREM i REM faze sna promijenjene su u korist pospane i tihe, ali budne faze. Kod primjene akustičnog ili svjetlosnog podražaja moguće je u svakom trenutku poremetiti opisane EEG karakteristike. Peroralno apliciran urapidil kod štakora inhibira uvjetovani refleks izbjegavanja, ali samo u dozama u kojima dovodi i do smanjenja mišićne koordinacije. U dozama do 200 mg/kg nema učinak na stereotipije izazvane d-amfetaminom u štakora. Taj rezultat sugerira da urapidil nema blokirajući učinak na dopaminske receptore. S druge strane, intraperitonealna primjena od 0,2 mg/kg u miševa štitila je od letalnog učinka d-amfetamina, koji nastaje zbog hipertermije posljedično otpuštanju katekolamina (Mantegazza i sur., 1970.), a samostalno primijenjen peroralno u dozi od 10 mg/kg značajno snižava tjelesnu temperaturu. Bitno je naglasiti da urapidil nema hipotenzivni učinak primijenjen peroralno do 80 mg/kg u štakora, što pokazuje da opisane reaktivne i spontane promjene ponašanja nisu uzrokovane promjenama kardiovaskularnih funkcija (Schoetensack i sur., 1977.).

Smisao tih ispitivanja bio je pokazati da se urapidil razlikuje od klasičnih predstavnika lijekova s učinkom na središnji živčani sustav. Zbog toga su se gore navedeni učinci uspoređivali s klorpromazinom (antipsihotik), diazepamom (sedativ-

hipnotik) i klonidinom (antihipertenziv). Dokaz da nema učinka na uvjetovani refleks izbjegavanja i amfetaminom inducirano glodanje (stereotipije) razlikovao ga je od klorpromazina. Nije imao utjecaja na spinalne reflekse u decerebriranih mačaka, što mu je davalo različitost u odnosu na diazepam (djelovanje preko GABAergičkog sustava). Sposobnost, pak, da životinje neovisno o primijenjenoj dozi uvijek reagiraju na zvučni ili svjetlosni podražaj razlikovala ga je od svih triju spojeva (klorpromazina, diazepama i klonidina). Zbog tih učinaka urapidil je dobio farmakološki značaj jer je postalo vidljivo da je riječ o novom i drukčijem spoju. U godinama koje slijede pokazano je da urapidil ipak ima utjecaj na dopaminergičku neurotransmisiju (Kellar i sur., 1984., Pugsley i sur.,1986., Jackisch i sur., 1987.).

L-3-4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) je prekursor u sintezi neurotransmitera dopamina, noradrenalina i adrenalina. L-DOPA nastaje enzimatskom hidroksilacijom aminokiseline L-tirozina te se dekarboksilacijom pretvara u dopamin, koji dalje prelazi u noradrenalin uz dopamin hidroksilazu. Noradrenalin prelazi u adrenalin putem fentolamin N-metiltransferaze. Pokazano je da urapidil ovisno o dozi proporcionalno utječe na sintezu katekolamina u mozgu štakora.

Kellar i suradnici (1984.) pokazuju testom kompetitivne inhibicije da urapidil ima umjereni afinitet za dopaminske D2 receptore. Na homogenatima mozga štakora obilježeni su dopaminski receptori radioaktivnim tricijem vezanim na spiperon (^{3}H-spiperona). U koncentraciji od 3.7±0.5 μM urapidil inhibira vezanje ^{3}H-spiperona na 50% D2 receptora u tijelu strijatuma štakora.

Pugsley i suradnici (1986.) objavljuju da intraperitonealna primjena urapidila u dozi od 3, 10 i 30 mg/kg, 30 minuta prije aplikacije NSD 1013 (3-hidroksibenzilhidrazin), blokatora L-dopa dekarboksilaze, dovodi do povećane akumulacije L-DOPA u moždanom deblu (regiji zaduženoj za sintezu noradrenalina) i *corpusu striatumu* (regiji zaduženoj za sintezu dopamina). Sve tri doze povećavaju koncentracije L-DOPA u moždanom deblu, a doze od 10 i 30 mg/kg u *corpusu striatumu* (Pugsley i sur., 1986.). Taj rezultat je jasno pokazao da urapidil utječe na sintezu dopamina u *corpusu striatumu,* a Pugsley i sur. pretpostavili su da urapidil vjerojatno direktno blokirajući postsinaptičke D2 receptore, kompenzatorno povećava dopaminsku sintezu, što je bio poznat učinak neuroleptika haloperidola i klorpromazina. Dodatno, indirektno su zaključili da blokada

D2 receptora urapidilom nije značajna za njegov hipotenzivni učinak jer snažan blokator D2 receptora spiroperidol nema utjecaj na krvni tlak štakora.

Jackisch i suradnici (1987.) istražuju učinke urapidila na rezovima mozga kunića, a dopaminergičku neurotransmisiju prate s pomoću promjena u razini dopamina obilježenog radioaktivnim tricijem (^{3}H-DA) u *nucleusu caudatusu*. Rezovi *nucleusa caudatusa* preinkubirani su s 0,1 μmol/L ^{3}H-DA. Pokazali su da urapidil potiče otpuštanje dopamina iz *nucleusa caudatusa*, a vrlo potentan učinak iskazuje se uz 10 μM urapidila. Taj učinak bio je nešto manji kada se prije urapidila preko perfuzora primijenilo 1μM nomifensina (blokator ponovnog unosa noradrenalina i dopamina), ali je i dalje postojao. Značajno je da se učinak antagonista D2 receptora domperidona na otpuštanje dopamina smanjio za oko 30% uz prisutnost 1 μM urapidila. Slično, inhibicijski učinak selektivnog agonista D2 receptora LY 171555 također je značajno smanjen uz prisutnost 1 μM urapidila. Kompetitivna inhibicija urapidila s antagonistom domperidonom i agonistom LY 171555 pokazuje antagonizirajuća svojstva urapidila na D2 receptore. Uspoređujući urapidil s domperidonom, zaključili su da je urapidil mnogo slabiji antagonist D2 receptora jer je 0.1 μM domperidona potrebno da se otpusti oko 40% dopamina, dok urapidil takav učinak ostvaruje s 30 puta većom koncentracijom. Zanimljivo, učinak urapidila na dopaminergičku neurotransmisiju iskazao se djelujući na vezikule koje skladište dopamin u živčanim završetcima tako što se izlazak ^{3}H-DA povećao za 160% uz prisutnost 10 μM urapidila (Jackisch i sur., 1987.).

Singer i suradnici (1989.) testiraju učinak urapidila na dopaminergičku neurotransmisiju u *nucleusu accumbensu* i *corpusu striatumu* štakora određivanjem omjera 3,4-dihidroksifeniloctene kiseline (DOPAC) i dopamina. Dopamin se u stanici metabolizira u DOPAC s pomoću monoaminooksidaze, pri čemu nastaje vodikov peroksid. Nakon intravenske aplikacije 30 mg/kg urapidila, vidljivo je da je u *nucleusu accumbensu* omjer DOPAC/dopamin porastao za oko 38% s maksimalnim učinkom nakon 30 minuta i da je statistički značajni učinak u odnosu na kontrolu trajao 2 sata. Učinak je bio vidljiv već nakon primjene doze od 5 mg/kg. S druge strane, urapidil je povećao omjer DOPAC/dopamin i u *corpusu striatumu*. U oba slučaja vidljiv je jasan proporcionalan učinak ovisan o dozi (pojačavao se od 5 do 30 mg i.v.), s time da je bio izraženiji u *corpusu striatumu* nego u *nucleusu accumbensu*. Da bi se usporedio učinak na dopaminergičku neurotransmisiju, ispitan je i učinak neuroleptika haloperidola.

Haloperidol u dozi od 2 do 5 mg/kg pokazao je značajno povećanje omjera DOPAC/dopamin, otprilike 2 puta veće u odnosu na urapidil. Dodatno, metodom ^{3}H-DA pokazali su da 1 μmol/L urapidila potiče izlazak dopamina iz *nucleusa accumbensa* kada se stimulira električnom strujom, dok bez stimulusa nema učinka. S druge strane, 10 μmol/L urapidila značajno potiče izlazak dopamina bez električne stimulacije, dok učinak sa stimulacijom nije testiran. Ti rezultati idu u prilog prethodnim opservacijama da urapidil ima sposobnost blokade dopaminskih receptora (Kellar i sur., 1984., Pugsley i sur., 1986.). Nadalje, učinak urapidila na otpuštanje dopamina iz *nucleusa accumbensa* nakon električnog podražaja podupire pretpostavku da urapidil blokira presinaptičke D2 receptore, što je u skladu s rezultatima otpuštanja dopamina iz *nucleusa caudatusa* kunića (Jackisch i sur., 1987.).

Zaključno, u jedinom radu koji *in vivo* ispituje neuroleptički potencijal urapidila na animalnim modelima za testiranje neuroleptika, zaključuje se da urapidil nema sposobnost blokade dopaminskih receptora (Schoetensack i sur., 1977.). Suprotno tome, u godinama koje slijede, na *ex vivo* modelima pokazuje se da urapidil ima sposobnost blokiranja dopaminskih receptora (Kellar i sur., 1984., Pugsley i sur., 1986., Jackisch i sur., 1987., te Singer i sur., 1989.). Ipak, ostaje nejasno zašto ta svojstva urapidila nikada nisu do kraja ispitana na *in vivo* modelima.

2.4. Metamfetamin

Metamfetamin je simpatomimetički amin iz skupine psihoaktivnih droga i učestalo se zloupotrebljava zbog svojih euforičnih, stimulirajućih, empatogenih i halucinogenih svojstava (Yu i sur., 2015.). Mnogi od tih učinaka na središnji živčani sustav posljedica su djelovanja na monoaminske neurotransmiterske sustave, odnosno akutne stimulacije serotoninske, norepinefrinske i posebice dopaminergičke neurotransmisije. Primjena metamfetamina uzrokuje neravnotežu u oslobađanju i povratnom unosu dopamina, norepinefrina i epinefrina stvarajući stanje izrazite euforije, nakon čega slijede sati stimulacije i uzbuđenosti. Dugotrajna primjena metamfetamina izaziva trajna oštećenja i poremećaje oslobađanja serotonina i dopamina na živčanim završetcima aksona, apoptotičku smrt monoaminergičkih neurona i smanjenje kognitivnih sposobnosti kao posljedicu neurodegeneracije (Cadet i sur., 2003., Marshall i sur., 2012., Panenka i sur.,

2013.). Prvi put je sintetiziran iz efedrina daleke 1893. godine. Iako ima visoki potencijal za nastanak ovisnosti, i danas se koristi u medicinske svrhe, uključujući liječenje poremećaja pozornosti s hiperaktivnošću (ADHD) u djece, kao i za kratkotrajnu terapiju refraktorne (nereagirajuće) pretilosti (Kish, 2008.). Tehnike oslikavanja mozga potvrdile su prisutnost neurodegenerativnih promjena kod ovisnika o metamfetaminu. Pokazano je da su te neurodegenerativne promjene povezane sa smanjenjem broja prijenosnika za dopamin i serotonin u mnogim regijama mozga, sa smanjenjem razine tirozin hidroksilaze, ključnog enzima u putu proizvodnje dopamina, kao i sa smanjenjem razine samog dopamina (Sekine i sur., 2003., Sekine i sur., 2006., McCann i sur., 2008., Krasnova i sur., 2009., Ares-Santos i sur., 2013.).

2.4.1. Molekularni mehanizmi neurotoksičnog djelovanja metamfetamina

Iako su brojne studije pokazale štetne učinke metamfetamina na brojne elemente živčanog sustava, stanični i molekularni mehanizmi neurotoksičnog djelovanja metamfetamina još su velikim dijelom nerazjašnjeni (Yu i sur., 2015.). S druge strane, razumijevanje svih patoloških mehanizama koji pridonose neurotoksičnosti metamfetamina moglo bi znatno pridonijeti razvoju novih terapijskih pravaca usmjerenih prema sprječavanju i liječenju neurotoksičnih i neurodegenerativnih procesa.

Dosadašnja istraživanja upućuju na niz molekularnih mehanizama u podlozi neurotoksičnog djelovanja metamfetamina, uključujući oksidacijski stres, ekscitotoksičnost, promijenjenu funkciju mitohondrija, stres endoplazmatskog retikuluma, te hipertermiju i upalu, pri čemu je posebna pozornost usmjerena prema međusobnoj interakciji navedenih patoloških procesa koji u konačnici rezultiraju odumiranjem neurona (Krasnova i sur., 2009., Yu i sur., 2015.).

2.4.2. Oksidacijski stres

Kisik zbog svojega jakog redoks potencijala služi kao glavni akceptor elektrona u procesima stvaranja metaboličke energije u mitohondrijima. Zbog nepotpune redukcije kisika tijekom aerobnog metabolizma nastaju, međutim, vrlo reaktivni spojevi, tzv. reaktivne kisikove vrste (RKV), kao što su superoksidni anion, vodikov peroksid,

hidroksilni radikal i drugi. RKV-e imaju važnu ulogu u fiziološkim uvjetima jer djeluju kao sekundarni glasnici u redoks-osjetljivim metaboličkim putevima i reguliraju redoks-osjetljive proteine koje mogu reverzibilno oksidirati i reducirati te tako modulirati njihovu funkciju, što može utjecati na raznovrsne stanične procese (Wang i sur., 2010.). Ako se u stanicama nalaze u koncentracijama koje su veće od fizioloških, RKV-e će poremetiti redoks ravnotežu u stanici i dovesti je u stanje oksidacijskog stresa. U reakcijama sa staničnim makromolekulama, RKV-e tada uzrokuju strukturalne promjene brojnih biomolekula i tako modificiraju njihovu funkciju i/ili razinu aktivnosti. Kao najčešće posljedice suviška RKV-a, nastaju peroksidacija lipida, oksidacija proteina i oksidacija baza nukleinskih kiselina. Osim toga, pojačana aktivacija redoks-osjetljivih signalnih puteva može izazvati promjene u aktivnosti transkripcijskih faktora i utjecati na ekspresiju gena (Wang i sur., 2010.).

Mozak sisavaca drži se posebno osjetljivim na posljedice oksidacijskog stresa. Neuroni imaju jako visoku razinu aktivnosti, pa prema tome i veliku potrebu za energijom, što je izravno povezano s povećanom proizvodnjom RKV-a u usporedbi s drugim tjelesnim stanicama. S druge strane, mozak nema učinkovite antioksidacijske obrambene mehanizme, ima veliki udio polinezasićenih masnih kiselina u membranskim lipidima, koje su posebice podložne lipidnoj peroksidaciji, a u odnosu na ostala tkiva ima povećane koncentracije iona željeza i bakra koji kroz Fentonovu reakciju mogu pokrenuti stvaranje RKV-a (Halliwell, 2006.). Mitohondrijska produkcija RKV-a ponajprije se odnosi na otpuštanje superoksidnog aniona iz reakcija transportnog lanca elektrona. Superoksid brzo prelazi (spontano ili enzimatski) u vodikov peroksid koji, pak, u Fentonovoj reakciji s prijelaznim metalima može prijeći u hidroksilni radikal. Hidroksilni radikal drži se glavnim uzrokom oksidacijskih oštećenja jer ne postoji enzimatski sustav unutar stanice koji je izravno zadužen za njegovo uklanjanje.

2.4.3. Endogeni antioksidacijski sustavi

Kako bi se zaštitile od štetnih učinaka RKV-a, stanice su tijekom evolucije razvile širok spektar antioksidacijskih mehanizama. Ti mehanizmi uključuju antioksidacijske enzime (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, tioredoksini), kao i neenzimske antioksidanse (kao što su glutation, vitamin E, vitamin C, koenzim Q10). Ta

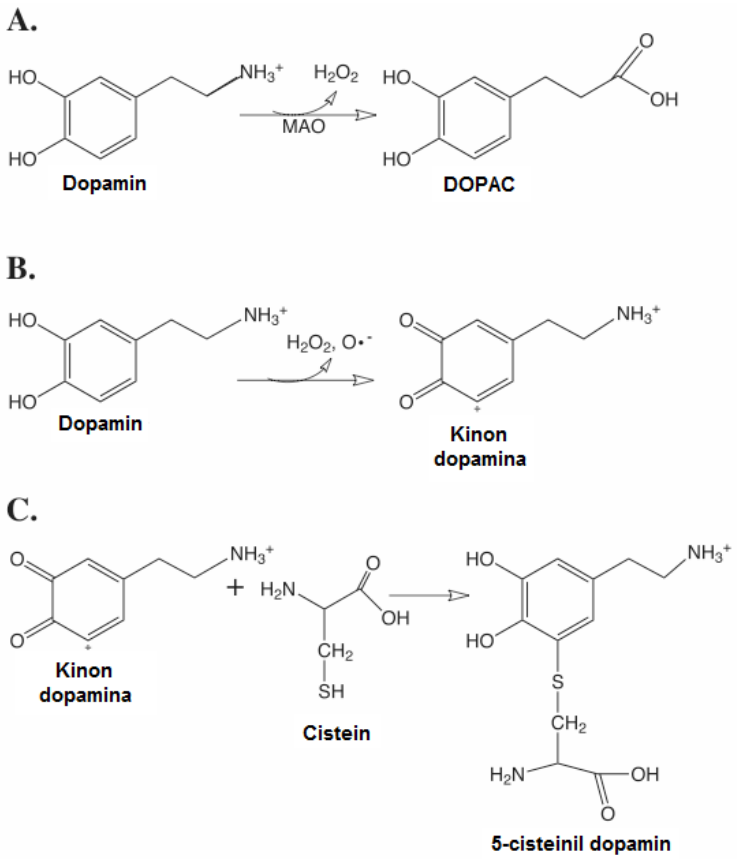
kombinacija antioksidacijskih proteina i manjih molekula nudi stanicama prilagodljiv sustav za kontrolu unutarstaničnih RKV-a. Visoka učinkovitost tih sustava postiže se različitom lokalizacijom antioksidansa, njihovim biokemijskim svojstvima te različitom inducibilnošću antioksidacijskih enzima (Wang i sur., 2010.).

Glutation je ključni neproteinski antioksidans koji sudjeluje u kontroli razine RKV-a u neuronima, a ujedno i glavni tiol prisutan u moždanom tkivu. Javlja se u dva oblika, reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG), a njihov omjer (GSH/GSSG) koristi se kao indikator oksidacijskog statusa stanice. Najvažniji enzimatski obrambeni mehanizam je superoksid dismutaza, koja uklanja superoksidni radikal razlažući ga na vodikov peroksid i kisik. U matriksu mitohondrija nalaze se forme koje sadrže mangan u aktivnim mjestima (MnSOD), a u međumembranskom prostoru mitohondrija i ostatku stanice one s bakrom i cinkom (CuZnSOD). Da bi zaštita od RKV-a bila učinkovita, superoksid dismutaze moraju funkcionirati zajedno s enzimima koji uklanjaju vodikov peroksid. U mozgu su to primarno glutation peroksidaze koje uklanjaju vodikov peroksid tako da istovremeno s redukcijom vodikovog peroksida oksidiraju dvije molekule glutationa (GSH), pri čemu nastaju voda i GSSH (Halliwell, 2006.).

2.4.4. Uloga oksidacijskog stresa u metamfetaminom potaknutoj neurotoksičnosti

Pretpostavlja se da je u temeljima neurotoksičnog djelovanja metamfetamina njegova strukturalna sličnost s molekulom dopamina, što mu omogućava unos u dopaminergičke aksone. To za posljedicu ima oslobađanje dopamina iz sinaptičkih mjehurića u citoplazmu, a potom i u ekstraneuronalni prostor mehanizmom obrnutog prijenosa putem prijenosnika za dopamin (Sulzer i sur., 2005., Goodwin i sur., 2009.). Naime, unos metamfetamina dovodi do značajnog otpuštanja dopamina u ekstraneuronalni prostor jer kroz prijenosnik za dopamin istovremeno unosi metamfetamin, a iznosi dopamin (Ares-Santos i sur., 2013.). Prema rezultatima Pubilla i sur. (2005.), istovremeno s oslobađanjem dopamina u citosol, metamfetamin aktivira α7 nikotinske receptore za acetilkolin, što vjerojatno dovodi do depolarizacije i porasta koncentracije kalcija u sinaptosomima. Prema njima, to aktivira protein kinazu C (PKC) i dušik oksid sintazu, čime započinje proces oksidacije dopamina u citosolu. Samooksidacijom otpuštenog dopamina dolazi do stvaranja RKV-a, kao što su

superoksidni radikal, hidroksilni radikal, vodikov peroksid i kinoni dopamina koji, kao što je prethodno spomenuto, izazivaju oksidacijska oštećenja staničnih makromolekula, remete ravnotežu unutarstaničnih antioksidacijskih obrambenih mehanizama i dovode stanicu u stanje oksidacijskog stresa (Cadet i sur., 1998., Miyazaki i sur., 2006.). S druge strane, dopamin u citosolu može se metabolizirati s pomoću monoamino oksidaze-B (MAO-B) uz nastanak 3,4-dihidroksifenil octene kiseline (DOPAC) i vodikovog peroksida, koji reagira s ionima prijelaznih metala i tvori vrlo toksičan i reaktivan hidroksilni radikal u Fentonovoj reakciji (Ares-Santos i sur., 2013.). Takvi neželjeni učinci posredovani suviškom RKV-a pridonose metamfetaminom potaknutoj degeneraciji živčanih završetaka, kao i pokretanju stanične smrti nakon aktivacije redoks-osjetljivih signalnih puteva u stanici (Wang i sur., 2008., Krasnova i sur., 2009.). U prilog tome idu rezultati istraživanja koji pokazuju da predtretmani učinkovitim antioksidansima (N-acetil-L-cistein, askorbinska kiselina, vitamin E) mogu spriječiti propadanje monoaminergičkih aksona (De Vito i sur., 1989.). Na stanicama PC12 pokazano je da toksične koncentracije metamfetamina smanjuju aktivnost antioksidacijskih enzima katalaze i glutation peroksidaze (Li i sur., 2012.). Također, pojačana ekspresija glutation peroksidaze, enzima koji ima važnu ulogu u odstranjenju vodikovog peroksida, zaštitila je stanice PC12 od porasta nakupljanja RKV-a i stanične smrti (Hom i sur., 1997.).



Slika 2. Nastanak RKV metabolizmom i oksidacijom dopamina. (A.) Monoaminooksidaza (MAO) metabolizira dopamin u DOPAC, pri čemu nastaje vodikov peroksid. (B.) Spontanom ili enzimatskom oksidacijom dopamina nastaje kinon dopamina i RKV-e. (C.) Kinon dopamina može reagirati s reduciranim –SH grupama na cisteinskim ostatcima proteina, pa nastaju konjugati 5-cisteinil dopamina.

Vezano uz oksidacijski stres, neurotoksični učinak metamfetamina povezuje se i s ekscitotoksičnošću, odnosno pretjeranom aktivacijom receptora za glutamat. *In vivo* je utvrđeno da antagonisti receptora za glutamat mogu smanjiti neurodegeneraciju dopaminskih i serotoninskih živčanih završetaka. Protektivni učinak MK-801, nekompetitivnog antagonista N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora za glutamat, potvrđen je i na modelu PC12 stanica (Uemura i sur., 2003.). Ti rezultati upućuju na interakciju receptora za dopamin i receptora za glutamat u postizanju neurotoksičnog učinka metamfetamina (Krasnova i sur., 2009.). Toksičnost glutamata povezana je s produkcijom superoksidnih radikala i dušikovog oksida (NO), što dodatno pridonosi

stanju oksidacijskog stresa (Gunasekar i sur., 1995.). U reakciji superoksidnog aniona s NO nastaje peroksinitrit, reaktivna dušikova vrsta (RDV) s vrlo jakim neurotoksičnim djelovanjem, što za posljedicu primarno ima nitrozilaciju brojnih staničnih proteina, ali i modifikaciju ostalih staničnih makromolekula i organela (Beckman i sur., 1996., Ares-Santos i sur., 2013., Yu i sur., 2015.). U istraživanju provedenom na stanicama PC12 utvrđena je povećana ekspresija 27 nitroziliranih proteina s raznovrsnim staničnim funkcijama (Zhang i sur., 2013.). U skladu s navedenim, inhibitori dušik oksid sintaze mogu smanjiti toksični učinak metamfetamina u kulturi stanica (Sheng i sur., 1996.), dok spojevi koji djeluju kao hvatači peroksinitrita mogu spriječiti inhibiciju lanca prijenosa elektrona u mitohondriju i tako smanjiti poremećaj funkcije mitohondrija, koji je također u podlozi neurotoksičnog djelovanja metamfetamina (Brown i sur., 2005.). *In vivo*, hipertermija je također jedno od bitnih obilježja metamfetaminom posredovane toksičnosti. Drži se da je i hipertermija povezana s povećanom proizvodnjom RKV-a i povećanom oksidacijom dopamina (Ares-Santos i sur., 2013.). Osim hipertermije, treba istaknuti da je u *in vivo* uvjetima jedan od bitnih elemenata neurotoksičnog djelovanja metamfetamina aktivacija mikroglije koja i sama proizvodi reaktivne spojeve kisika i dušika, i na taj način putem imunoloških procesa ubrzava oksidacijske reakcije i neurodegeneraciju (Krasnova i sur., 2009.).

2.4.5. Apoptoza izazvana oksidacijskim stresom i neurotoksični učinak metamfetamina

Drži se da su povećano nakupljanje RKV-a i pridruženi oksidacijski stres ključni za metamfetaminom potaknuto pokretanje programirane stanične smrti, tj. apoptoze. Apoptozu karakteriziraju specifične morfološke i biokemijske promjene poput kondenzacije kromatina, zaokruživanja i smanjenja stanica, »pupanja« dijelova stanične membrane i posljedičnog odvajanja apoptotskih tjelešaca. Dva su osnovna puta koja dovode do aktivacije apoptoze: vanjski put, koji je posredovan receptorima smrti, i unutarnji ili mitohondrijski put, koji je povezan s otpuštanjem citokroma c u citoplazmu (Bredesen i sur., 2006.). U mitohondrijskom putu važnu ulogu imaju proteini porodice Bcl-2. Tu porodicu čine proapoptotski članovi (npr. Bax, Bak i Bid) i antiapoptotski članovi (npr. Bcl-2), o čijoj međusobnoj interakciji i ovisi sam proces pokretanja

apoptoze. Nakon aktivacije proapoptotskih proteina dolazi do njihova premještanja iz citosola na membranu mitohondrija, što dovodi do permeabilizacije membrane mitohondrija i oslobađanja proapoptotskih čimbenika poput citokroma c, čimbenika indukcije apoptoze (engl. *apoptosis-inducing factor*, AIF) i proteina Smac/DIABLO iz mitohondrija u citosol. Najbolje proučeni proapoptotski čimbenik, citokrom c, tvori citoplazmatski kompleks s ATP-om i proteinom Apaf-1 (engl. *apoptotic protease-activating factor-1*), čime se aktivira inicijatorska kaspaza-9 i formira apoptosom (kompleks citokroma c, kaspaze-9 i Apaf-1). Nakon toga pokreće se kaskada događaja u stanici, što uključuje aktivaciju kaspaze-3 i cijepanje enzima poli (ADP-riboze) polimeraze (PARP), koji je uključen u popravak oštećenja DNK molekule (Wisessmith i sur., 2009., Estaquier i sur., 2012., Chen i sur., 2016.).

Enzimi kaspaze pripadaju porodici proteaza koje sadrže aminokiselinu cistein u aktivnom mjestu. Dijele se u dvije skupine: inicijatorske i efektorske kaspaze. Inicijatorske kaspaze, kaspaze -2, -8 i -9, djeluju na inaktivne oblike efektorskih kaspaza i aktiviraju ih. Glavne efektorske kaspaze mitohondrijskog puta su kaspaza-3 i kaspaza-7 koje djeluju na druge proteine u stanici, bilo da ih aktiviraju ili dovode do gubitka njihove funkcije. Aktivacija kaspaze-3 i cijepanje poli (ADP-riboze) polimeraze potvrđeni su na modelima metamfetaminom izazvane toksičnosti u miševa (Deng i sur., 2000.). Inhibicija oba proteina može spriječiti metamfetaminom izazvanu smrt stanice i oštećenja dopaminergičkih neurona (Uemura i sur., 2003., Iwashita i sur., 2004.). Kao što je već prethodno istaknuto, povećano nakupljanje RKV-a i pridruženo oštećenje DNK drže se glavnim okidačima u pokretanju apoptoze jer metamfetamin izaziva oksidaciju DNK i mijenja ekspresiju gena koji su uključeni u popravak DNK (Cadet i sur., 2002., Tokunaga i sur., 2008., Johnson i sur., 2015.). U prisutnosti antioksidansa (vitamina E) aktivacija kaspaza je smanjena, a preživljenje stanica povećano (Wang i sur., 2008.). NO i peroksinitrit dovode se u vezu s pokretanjem apoptoze, kao i s promjenama u ekspresiji antiapoptotskog proteina Bcl-2 i proapoptotskih proteina Bad, Bax i Bid (Jayanthi i sur., 2001.), što dovodi do formiranja kanala u membrani mitohondrija, gubitka potencijala membrane mitohondrija i već spomenutog otpuštanja proteina mitohondrija u citosol i pokretanja apoptoze.

Metamfetamin također može aktivirati vanjski put preko receptora smrti, a kaspaza-3 i kaspaza-8 su medijatori toga tzv. FasL/Fas puta smrti. FasL pripada skupini citokina,

a njegova ekspresija je pod kontrolom upravo onih transkripcijskih faktora koji su inducirani toksičnim dozama metamfetamina. Metamfetaminom izazvana aktivacija kaspaze-3 preko FasL/Fas puta može se umanjiti tretmanom s antagonistima D1 receptora za dopamin, što upućuje na važan doprinos dopamina u aktivaciji toga puta (Jayanthi i sur., 2005.).

2.4.6. Ostali molekularni mehanizmi u podlozi neurotoksičnog učinka metamfetamina

Zbog svojih lipofilnih i kationskih svojstava, metamfetamin može difundirati do mitohondrija i u njima se nakupljati. Akumulacijom pozitivno nabijenih molekula može doći do promjena u elektrokemijskom gradijentu, inhibicije proizvodnje ATP-a, nedostatka stanične energije za metaboličke potrebe te cjelokupnog poremećaja funkcije mitohondrija, koji posljedično dovodi do pojačane proizvodnje RKV-a unutar stanice i apoptoze (Wu i sur., 2007.). Metamfetamin također može smanjiti i aktivnost enzima unutar lanca prijenosa elektrona i na taj način pridonijeti smanjenju zaliha ATP-a. Osim toga, polimeraza PARP za popravak oštećene DNK koristi NAD^+ kao supstrat i tako dodatno može pridonijeti smanjenju zaliha ATP-a i nepovratnom energetskom kolapsu stanice (Krasnova i sur., 2009.).

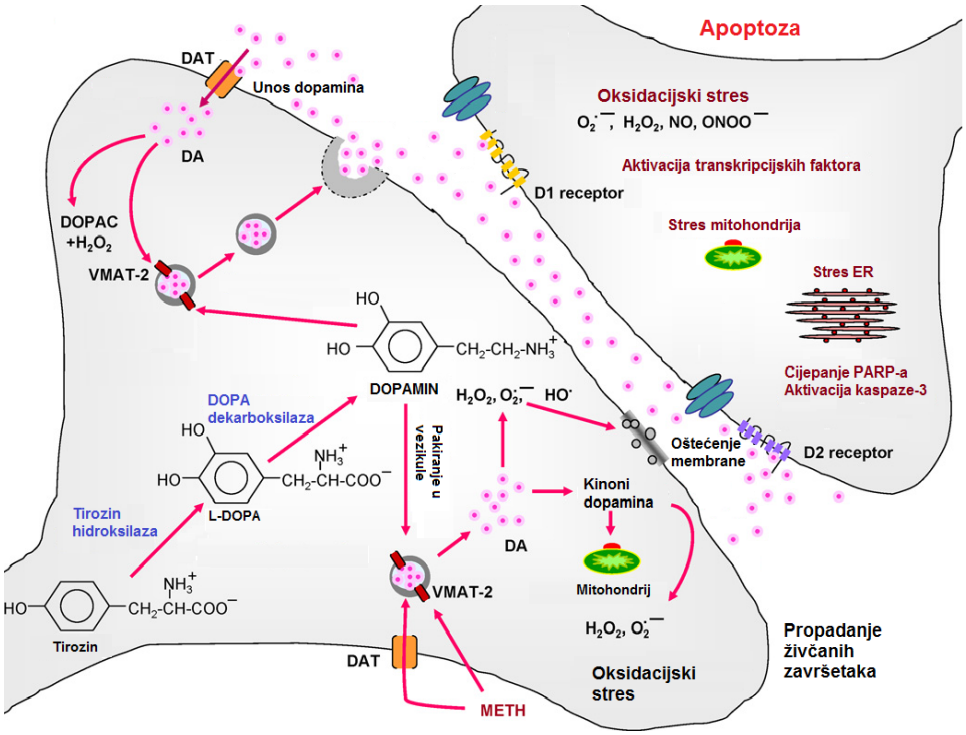
Osim poremećaja funkcije mitohondrija, oksidacijski stres izazvan metamfetaminom može dovesti i do poremećaja funkcije endoplazmatskog retikuluma. Endoplazmatski retikulum važan je za pohranu unutarstaničnog kalcija, čiji suvišak može pokrenuti aktivaciju proteaze kalpaina i posljedično apoptozu (Suwanjang i sur., 2012.).

Nekoliko je studija pokazalo da neurotoksične koncentracije metamfetamina mogu potaknuti autofagiju, proces u kojem se nakupine oštećenih i mutiranih proteina, kao i oštećeni stanični organeli pakiraju unutar autofagosoma i potom spajaju s lizosomom i razgrađuju (Castino i sur., 2008., Yu i sur., 2015.). Metamfetaminom izazvano nakupljanje citoplazmatskih inkluzija koje odgovaraju autofagnim vakuolama potvrđeno je i u PC12 stanicama (Fornai i sur., 2004., Fornai i sur., 2008.). Metamfetamin također izaziva promjene u funkciji ubikvitin/proteosom sustava koji ima primarnu ulogu u razgradnji oštećenih i mutiranih proteina. Moguće je da dopamin ima ulogu u poremećaju

funkcije sustava ubikvitin/proteosom i formiranju inkluzija jer se te promjene mogu spriječiti inhibicijom sinteze dopamina i antagonistima D2 receptora za dopamin, kao i izazvati agonistima D1 receptora za dopamin (Lazzeri i sur., 2007., Fornai i sur., 2008.). Samo formiranje inkluzija, čini se, ovisi o nakupljanju RKV-a jer se može spriječiti u prisutnosti antioksidansa (Fornai i sur., 2004.). Budući da autofagija ima ključnu ulogu u razgradnji proteina oštećenih oksidacijom, pretpostavlja se da dopaminom izazvano nakupljanje RKV-a potiče agregaciju oštećenih proteina, što dovodi do pojačanja autofagije kao protektivnog mehanizma u obrani od metamfetaminom izazvanih promjena (Castino i sur., 2008.). U skladu s tim, sprječavanjem autofagije s 3-metiladeninom dolazi do oligomerizacije proapoptotskog proteina Bax, permeabilizacije membrane mitohondrija i apoptoze u stanicama PC12, dok se taj toksični učinak može spriječiti u prisutnosti inhibitora kaspaza (Castino i sur., 2008.). I u kulturi dopaminergičkih neurona mezencefalona farmakološka ili genetička inhibicija autofagije potiče apoptozu preko aktivacije kaspaze-3. Na istom je modelu pokazano da se utišavanjem PKCδ izrazito smanjuje metamfetaminom potaknuta autofagija, poremećaj funkcije proteosoma i nakupljanje ubikvitiniranih proteinskih agregata, u korelaciji s preživljenjem (Lin i sur., 2012.).

Primjena metamfetamina dovodi i do promjena u ekspresiji gena. Poznato je da metamfetamin povećava ekspresiju nekoliko transkripcijskih faktora iz porodice AP-1 (npr. c-jun, c-fos). Pretpostavlja se da su te promjene povezane s nakupljanjem RKV-a. RKV-e imaju važnu ulogu u regulaciji redoks-osjetljivih unutarstaničnih signalnih puteva, što podrazumijeva i regulaciju transkripcijskih faktora (Potashkin i sur., 2006.). RKV-e sudjeluju u regulaciji transkripcijskih faktora iz različitih porodica (AP-1, AP-2, NF-κB), koji su uključeni u odgovor na oštećenje neurona te imaju važnu ulogu u smrti, odnosno preživljenju neurona (Krasnova i sur., 2009.). Vezano uz metamfetaminom potaknutu toksičnost, čini se da je uloga transkripcijskog faktora c-fos primarno protektivna, dok c-jun i aktivacija signalnog puta Jun-N-terminalne kinaze (JNK) pridonose toksičnim učincima metamfetamina (Wang i sur., 2008., Krasnova i sur., 2009.). Transkripcijski faktor p53 također je bitan za toksični učinak metamfetamina. Oksidacijska oštećenja DNK potiču aktivaciju p53 i pokretanje apoptotičkih signalnih puteva (Yu i sur., 2015.). Na stanicama PC12 i SH-SY5Y izlaganje metamfetaminu izazvalo je apoptozu, uz karakterističnо oslobađanje citokroma c iz mitohondrija, porast

ekspresije aktiviranog (pocijepanog) oblika kaspaze-3 i proteina Bax i PARP, dok je ekspresija Bcl-2 proteina bila smanjena. Svi su ti učinci bili dokinuti utišavanjem proteina PUMA-e (engl. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), ključnog posrednika neuronalne apoptoze koji se direktno ili indirektno veže na antiapoptotske proteine porodice Bcl-2, a čija je transkripcija pod kontrolom p53 (Chen i sur., 2016.). Također, metamfetamin smanjuje fosforilaciju duž signalnog puta kinaze Akt (Wu i sur., 2015.). Nizvodno od kinaze Akt, istraživanja na stanicama PC12 pokazala su važnu ulogu signalnog puta serin/treonin kinaze mTOR, ciljne molekule djelovanja rapamicina u sisavaca (engl. *mammalian target of rapamycin*), u toksičnom djelovanju metamfetamina (Li i sur., 2012., Li i sur., 2016., Wu i sur., 2015.). Molekula mTOR mjesto je integracije brojnih unutarstaničnih signalnih puteva s ulogom u održavanju energetske homeostaze i staničnom odgovoru na prisutnost stresora, a aktivacija mTOR povezana je s indukcijom autofagije nakon tretmana metamfetaminom (Li i sur. 2012., Li i sur., 2016.).



Slika 3. Shematski prikaz staničnih i molekularnih mehanizama u podlozi metamfetaminom izazvane toksičnosti.

Kao što se vidi na slici 3, metamfetamin (METH) ulazi u dopaminergičke neurone putem prijenosnika za dopamin (DAT) i pasivnom difuzijom. Unutar neurona, METH ulazi u sinaptičke vezikule posredstvom vezikularnoga monoaminskog prijenosnika (VMAT-2) i uzrokuje oslobađanje dopamina u citoplazmu promjenama u ravnoteži pH. U citoplazmi dolazi do autooksidacije dopamina u toksične kinone dopamina, uz istovremeno stvaranje superoksidnog aniona i vodikovog peroksida. To dalje dovodi do povećanog stvaranja hidroksilnih radikala i uzrokuje unutarstanični oksidacijski stres, što uključuje i poremećaj funkcije mitohondrija i lipidnu peroksidaciju presinaptičkih membrana. Dio toksičnog učinka dopamina posredovan je aktivacijom receptora za dopamin. Interakcijom dopamina i D1 receptora aktiviraju se različiti transkripcijski faktori koji pokreću signalne puteve povezane sa smrću neurona (modificirano prema: Krasnova i sur., 2009.).

2.4.7. Uloga prijenosnika i receptora za dopamin u metamfetaminom izazvanoj toksičnosti

Metamfetamin posredstvom prijenosnika za dopamin (DAT) i vezikularnoga monoaminskog prijenosnika 2 (VMAT-2) dovodi do oslobađanja dopamina u međustanični prostor, kao i u citosol dopaminergičkih živčanih završetaka, što upućuje na njihovu važnu ulogu u metamfetaminom izazvanoj toksičnosti (Larsen i sur., 2002., Sulzer i sur., 2005.). Pretpostavlja se da ravnoteža između vezikularnog, citoplazmatskog i izvanstaničnog dopamina ima ključnu ulogu u neurotoksičnim učincima metamfetamina (Fumagalli i sur., 1998.).

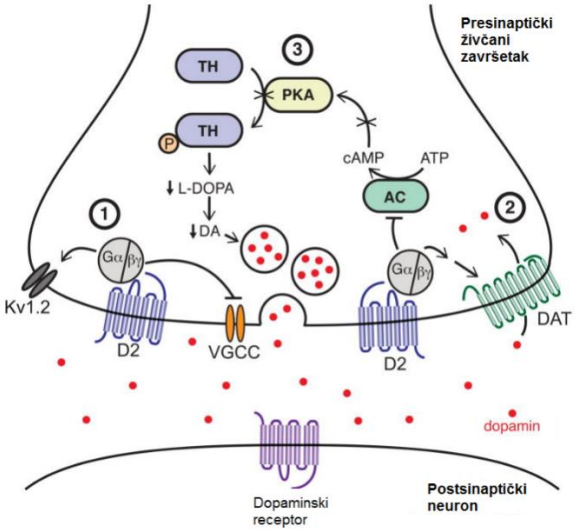
Brojna su istraživanja pokazala da dugotrajna primjena metamfetamina mijenja aktivnost prijenosnika za dopamin na način da dovodi do obrnutog prijenosa, a osim toga smanjuje i njihov broj (Fumagalli i sur., 1998., Sandoval i sur., 2001.). Mehanizmom obrnutog prijenosa metamfetamin mobilizira dopamin iz intraneuronalnih skladišta i povećava njegovu koncentraciju u izvanstaničnom prostoru, što dalje dovodi do autooksidacije i stvaranja RKV-a. VMAT-2 je odgovoran za unos dopamina u sinaptičke vezikule, gdje se dopamin uobičajeno pohranjuje odmah nakon sinteze te je na taj način zaštićen od metabolizma i samooksidacije (Ares-Santos i sur., 2013.). Budući da smanjuje funkciju VMAT-2, metamfetamin dovodi do preraspodjele dopamina unutar živčanih

završetaka. Kao rezultat smanjene funkcije VMAT-2, koncentracija dopamina u citosolu raste, a u citosolu postoje povoljni uvjeti za početak procesa oksidacije (Ares-Santos i sur., 2013.). Inhibitori VMAT-2, npr. rezerpin, povećavaju stupanj oštećenja dopaminergičkih aksona izloženih metamfetaminu (Kuhn i sur., 2008.). Također, u kulturama neurona porijeklom od miševa koji ne eksprimiraju VMAT-2, utvrđen je porast nakupljanja RKV-a u usporedbi s rezultatima dobivenima u kulturi neurona porijeklom od miševa s normalnom ekspresijom VMAT-2 (Larsen i sur., 2002.).

Zbog metamfetaminom potaknutoga pojačanog otpuštanja dopamina u ekstraneuronalni prostor, dolazi i do pojačane aktivacije receptora za dopamin, što ima vrlo važnu ulogu u brojnim fiziološkim učincima metamfetamina, uključujući ovisnost. Dosadašnja istraživanja pokazuju da postsinaptički receptori za dopamin sudjeluju i u neurotoksičnom djelovanju metamfetamina. Ukupno ima pet metabotropnih receptora za dopamin (D1-D5) koji su spregnuti s G-proteinima. Ti se receptori dijele u dvije skupine: D1-slična porodica (uključuje D1 i D5 receptor) i D2-slična porodica (uključuje D2, D3 i D4 receptor), a primarno se razlikuju prema svojoj sposobnosti da moduliraju aktivnost adenilat ciklaze i akumulaciju cikličkog adenozin monofosfata (cAMP).

Receptori D1 i D5 stimuliraju proizvodnju cAMP i nisu smješteni na dopaminergičkim neuronima, dok receptori D2-slične porodice inhibiraju adenilat ciklazu (Ares-Santos i sur., 2013.) i oni su većinom smješteni na neuronima koji nisu dopaminergički te posreduju u brojnim funkcijama vezanima uz dopaminergički sustav, što primarno uključuje regulaciju lokomotorne aktivnosti, kognitivnih funkcija i motivacije. Zbog toga su receptori iz D2-slične porodice mjesto farmakološke intervencije u liječenju brojnih psihijatrijskih poremećaja (Ford, 2014.). Autoreceptori iz D2-slične porodice smješteni su na dopaminergičkim neuronima i imaju važnu ulogu u regulaciji njihove aktivnosti. Oni moduliraju dopaminergičku neurotransmisiju na način da kontroliraju sintezu, oslobađanje i povratni unos dopamina mehanizmom povratne inhibicije, što se ostvaruje direktno regulacijom provodljivosti kalijevih iona i indirektno kontrolom ekspresije tirozin hidroksilaze i prijenosnika za dopamin. Prema tome, aktivacijom tih receptora smanjuje se podražljivost dopaminergičkih neurona i oslobađanje dopamina (Slika 4).

Drži se da se ovaj mehanizam autoinhibicije ostvaruje uglavnom posredstvom receptora D2 (Ford, 2014.). Alternativnim prekrajanjem D2 mRNA nastaju dvije izoforme receptora, kratka (D2S) i duga (D2L), koje se razlikuju u 29 aminokiselina unutar treće unutarstanične petlje, no i u lokalizaciji i funkcijama. Izoforma D2S ima veći afinitet za dopamin i učinkovitije inhibira adenilat ciklazu, dok je izoforma D2L postsinaptički receptor odgovoran za kataleptički učinak antipsihotika haloperidola (Usalli i sur., 2000.). Posebno je značajno da se aktivacijom D2 autoreceptora mijenjaju potkrjepljujuća svojstva psihoaktivnih droga, pa tako i metamfetamina (Miyamoto i sur., 2015.). *In vivo* se oslobađanje dopamina inhibira agonistima D2S receptora, a povećava antagonistima D2S receptora. Kao što je prikazano na slici, vezanjem agonista za receptor D2, aktiviraju se različiti signalni putevi, što osim spomenute adenilat ciklaze, uključuje i modulaciju mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK), kao i modulaciju kalijevih i kalcijevih kanalića.



Slika 4. Shematski prikaz regulacije dopaminergičke neurotransmisije posredstvom D2-autoreceptora. Na presinaptičkim živčanim završetcima D2 autoreceptori reguliraju oslobađanje, unos i sintezu dopamina. (1) Autoreceptori inhibiraju oslobađanje vezikula s dopaminom aktivacijom Kv1.2 kanalića za kalij i inhibicijom ulaska kalcija kroz kalcijeve kanale regulirane naponom (VGCC). (2) Presinaptički D2 receptori povećavaju brzinu povratnog unosa dopamina povećanjem ekspresije prijenosnika za

dopamin (DAT) u plazmatskoj membrani, kao i direktnim interakcijama s postojećim prijenosnicima, čime se povećava njihova aktivnost. (3) Dugotrajna aktivacija D2 autoreceptora smanjuje fosforilaciju tirozin hidroksilaze (TH) putem protein kinaze A (PKA), čime se smanjuje sinteza i pakiranje dopamina u vezikule (preuzeto iz: Ford, 2014.).

Antagonisti D2 receptora mogu smanjiti toksične učinke metamfetamina (Xu i sur., 2005.). Inaktivacija D2 receptora sprječava metamfetaminom izazvano smanjenje razine dopamina, aktivaciju astrocita i mikroglije, te hipertermički odgovor. Nadalje, istraživanja na životinjama pokazuju da je u nedostatku D2 receptora smanjena aktivnost prijenosnika za dopamin u strijatumu, što dovodi do smanjenja dopamina u citosolu, te da je smanjen sadržaj dopamina unutar vezikula, pa posljedično tome i njegovo otpuštanje unutar živčanih završetaka (Ares-Santos i sur., 2013.). U prisutnosti metamfetamina, D2 receptor tvori kompleks s prijenosnikom za dopamin i potencira njegovu aktivnost. Osim tog učinka na formiranje kompleksa s prijenosnikom za dopamin, čini se da je i učinak na smanjenje funkcije VMAT-2 specifičan samo za D2 receptore (Hadlock i sur., 2010.).

SCH23390, antagonist receptora D1 i D5, također može smanjiti neurotoksično djelovanje metamfetamina supresijom aktivacije kaspaza 3 i 8, inhibicijom aktivacije signalnog puta JNK kinaze, smanjenjem stresa endoplazmatskog retikuluma, te povećanjem ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2 (Jayanthi i sur., 2005., Xu i sur., 2005., Ares-Santos i sur., 2013.). Povrh toga, inaktivacija D1 receptora djeluje neuroprotektivno kod metamfetaminom izazvane toksičnosti sprječavanjem hipertermije, smanjenjem sadržaja dopamina i preraspodjelom dopamina unutar živčanih završetaka (Ares-Santos i sur., 2013.).

2.4.8. Učinak neurotoksičnih doza metamfetamina na ponašanje štakora

Metamfetamin djeluje kao psihomotorni stimulans koji potiče lokomotornu aktivnost kada se primijeni u niskim dozama, a stereotipno ponašanje kada se primijeni u višim dozama (Kelly i sur., 1975., Kuczenski i sur., 1999.). Drži se da su metamfetaminom uzrokovane stereotipije i lokomotorna hiperaktivnost posredovane dopaminergičkom neurotransmisijom u *nucleusu accumbensu* i *nucleusu caudatusu*

(Creese i sur., 1974.; Kelly i sur., 1975.; Kelly i sur., 1976.; Lucot i sur., 1980.). Neurotoksičnost uzrokovana metamfetaminom mijenja funkcije posredovane dopaminom, pa može poslužiti kao koristan model funkcionalnih posljedica umjerenog smanjenja koncentracije dopamina (Wallace i sur., 1999.).

2.4.9. Metamfetamin i hipertermija

Hipertermija uzrokovana metamfetaminom važan je pokazatelj neurotoksičnosti (Bowyer i sur., 1992., Bowyer, 1994.). Uvjeti koji dovode do inhibiranja ili poticanja hipertermije uzrokovane metamfetaminom, jednako tako utječu na smanjenje razine dopamina i TH u dorzalnom strijatumu (*nucleus caudatus*, *putamen*) (Bowyer i sur., 1992., Bowyer, 1994.), s time da snižavanje tjelesne temperature ipak nije preduvjet neuroprotekcije. Kada kod štakora tjelesna temperatura prijeđe 41,5 °C, drži se da dolazi do nepovratnog oštećenja monoaminskih živaca te da se tada više ne može utjecati na neurotoksičnost (Bowyer i sur., 1995.). Iako neurotoksičnost i hipertermija uzrokovane metamfetaminom direktno koreliraju, preduvjet neuroprotektivnog djelovanja ispitivanih tvari nije snižavanje tjelesne temperature (Cappon i sur., 1996.). Tako je dokazano da alfa-fenil–N-terc-butil nitron (PBN) (36 ili 60 mg/kg), dan štakorima prije metamfetamina (4 × 10 mg/kg s.c.), smanjuje gubitak dopamina u strijatumu, ali ne utječe na hipertermiju, nego sprječava nastanak oksidacijskog stresa (Cappon i sur., 1996.). U hipertermiji uzrokovanoj metamfetaminom ulogu imaju i σ (sigma) receptori koji se nalaze u hipotalamusu i odgovorni su za održavanje i promjene tjelesne temperature (Gundlach i sur., 1986., Rawls i sur., 2002.).

3. MATERIJALI I METODE

IN VIVO MATERIJALI:

3.1. Pokusne životinje

U pokusima su korišteni Wistar štakori, stari 3–4 mjeseca i mase oko 180–220 g. Uzgojeni su i držani na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u kontroliranim uvjetima pri konstantnoj temperaturi okoliša (21 ± 2 °C) i sustavu osvjetljenja 12 sati svjetlo/12 sati mrak, sa svjetlom od 7 ujutro. Štakorima su hrana (peleti za glodavce) i voda bile dostupne *ad libitum*, osim 12 sati prije početka pokusa, kada im je uskraćena hrana. Štakori su tijekom pokusa odvajani svaki u svoj kavez da se ne bi međusobno napadali. Životinje su izvagane i obilježene prije početka pokusa. Nisu bile naviknute na pokusne uvjete (aplikacija lijekova intraperitonealno i subkutano, otvoreni kavezi bez stelje, kavezi za lokomotornu aktivnost), niti su trenirane. Svaka životinja je u pokusu korištena samo jednom.

3.2. Urapidil

U pokusu je korišten komercijalni urapidil hidroklorid proizvođačâ Nycomed/Takeda Austria GmbH, Linz i Nycomed/Takeda GmbH Singen, Njemačka.

Štakorima se intraperitonealno aplicirala otopina u dozama od 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 i 25 mg po životinji, uvijek u ekvivolumenu od 5 mL. Ekvivalentna doza po tjelesnoj težini iznosila bi od 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 i 125 mg/kg.

3.3. Metamfetamin

U pokusu je korišten metamfetamin hidroklorid, tablete od 5 mg (Abbott Laboratories, Illinois, SAD). Tableta metamfetamina izmrvljena je u tarioniku i od nje je napravljeno 5 ml suspenzije u fiziološkoj otopini (Pliva, Zagreb, Hrvatska) koja se aplicirala potkožno u dozi od 40 mg/kg.

***IN VIVO* METODE:**

3.4. Pokusni protokol

Raspored pokusnih životinja po skupinama, postupci s njima i vrijeme provedbe tih postupaka prikazani su u tablici 3. U svakoj grupi bilo je 6 životinja.

Tablica 3. Raspored životinja u pokusima po skupinama

GRUPE	PARAMETRI MJERENJA			
	Stereotipija	Lokomocija	Katalepsija	Hipertermija
Kontrola 0.9% NaCl	+	+	+	+
Urapidil 0.25 mg	+	+	+	+
Urapidil 0.5 mg	+	+	+	+
Urapidil 1 mg	+	+	+	+
Urapidil 2 mg	+	+	+	+
Urapidil 5 mg	+	+	+	+
Urapidil 10 mg	+	+	+	+
Urapidil 15 mg	+	+	+	+
Urapidil 20 mg	+	+	+	+
Urapidil 25 mg	+	+	+	+
Metamfetamin 40 mg s.c.+Urapidil 25 mg	+	+	+	+
Urapidil 25 mg + Metamfetamin 40 s.c.	+	+	+	+

3.5. Bodovanje katalepsije

Ponašanje životinja promatrano je 2 sata nakon aplikacije urapidila uz mjerenje ukupnog vremena provedenog u kataleptičkom položaju i bodovanje 0–5 prema Costallu i sur. (1974.), prema sljedećoj skali: 0 = 0 min, 1 = 0.1–2.5 min, 2 = 2.6–5.0 min, 3 = 5.1–10.0 min, 4 = 10.1–20.0, 5 = >20.1.

3.6. Bodovanje stereotipija

Ponašanje životinja promatrano je prva 2 sata nakon aplikacije urapidila i metamfetamina, snimano (Logitech web kamera, Morges, Švicarska) i bodovano prema sustavu (Costall i sur., 1973.) tako da je: 0 – ponašanje jednako normalnoj životinji, 1 – povremeno njuškanje, konstantno istraživanje okoline, 2 – kontinuirano njuškanje, povremeno istraživanje okoline, 3 – kontinuirano njuškanje, povremeno grizenje, glodanje ili lizanje (umivanje); vrlo kratki periodi lokomotorne aktivnosti, 4 – kontinuirano grizenje, glodanje ili lizanje (umivanje); bez lokomotorne aktivnosti.

3.7. Mjerenje spontane lokomotorne aktivnosti

Lokomotorna aktivnost snimala se (Logitech web kamera, Morges, Švicarska) pod svjetlom jačine 80 luksa, od 12 do 16 h u staklenom kavezu s ucrtanim pravokutnicima na podlozi dimenzija 22 × 40 cm unutar 2 sata. Kao parametri lokomotorne aktivnosti mjerili su se horizontalna i vertikalna lokomotorna aktivnost, započinjanje pokreta te vrijeme provedeno u pokretu unutar 2 sata. Horizontalna lokomotorna aktivnost mjerila se brojanjem prijeđenih pravokutnika konvertiranih u centimetre u staklenom kavezu. Vertikalna lokomotorna aktivnost mjerila se brojanjem podizanja na stražnje noge (dok su obje prednje šape u zraku). Vrijeme provedeno u pokretu izmjereno je u sekundama, s time da je pokret morao trajati dulje od sekunde. Početak pokreta mjerio se ako je trajao dulje od 1 sekunde, a prethodilo mu je ponašanje životinje bez pokreta u trajanju duljem od 1 sekunde (Kelly i sur., 1998.).

3.8. Mjerenje tjelesne temperature

Tjelesna temperatura štakorica mjerena je rektalnim digitalnim termometrom (Zepter Vital System, Wollerau, Švicarska) prije aplikacije urapidila i metamfetamina te svakih 30 minuta tijekom 2 sata nakon aplikacije kombinacije urapidila i metamfetamina.

IN VITRO MATERIJALI:

3.9. Kultura stanica PC12 i SH-SY5Y

Stanice PC12 uobičajeni su model za proučavanje farmakoloških svojstava dopaminergičkih neurona. Porijeklom su od feokromocitoma (tumora kromafinih stanica) srži nadbubrežne žlijezde štakora (Green i sur., 1976.). Neuroendokrinog su porijekla, te sintetiziraju, skladište i u ovisnosti o kalciju otpuštaju dopamin putem prijenosnika za dopamin. Potvrđeno je da eksprimiraju D2 i D4 autoreceptore iz D2-slične porodice receptora, tirozin hidroksilazu, prijenosnik za dopamin i VMAT-2 (Pothos i sur., 1998., Weatherspoon i sur., 1999.).

Stanice SH-SY5Y porijeklom su iz humanog neuroblastoma. Također imaju obilježja neuronalnih stanica i eksprimiraju dopaminergičke markere. Mogu transportirati dopamin (posjeduju i plazmatski i vezikularni prijenosnik za dopamin), eksprimiraju enzime za sintezu i metabolizam dopamina, te D2 i D3 receptore za dopamin (Presgraves i sur., 2004.).

3.10. Kemikalije i materijal za staničnu kulturu

Sve kemikalije potrebne za održavanje stanične kulture bile su iz komercijalnih izvora: 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetat (H_2DCF-dA; Sigma, SAD), dimetil-sulfoksid (DMSO; Kemika, Hrvatska), etanol (Kemika, Hrvatska), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; Fluka, SAD), fetalni goveđi serum (FBS; Sigma, SAD), L-glutamin (Sigma, SAD), kalij-klorid (Kemika, Hrvatska), kvercetin (Sigma, SAD), medij za uzgoj stanica (Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM; Sigma, SAD), 3-(4,5-dimethiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid (MTT; Sigma, SAD), natrij-hidrogenkarbonat (Kemika, Hrvatska), natrij-hidrogenfosfat (Alkaloid), natrij-hidroksid (Kemika, Hrvatska), natrij-karbonat (Kemika, Hrvatska), natrij-klorid (Sigma, SAD), penicilin-streptomicin otopina (Sigma, SAD), tripsin (Sigma, SAD).

3.11. Lijekovi

U pokusima su korišteni lijekovi: urapidil (Alfa Aesar, SAD), haloperidol (Belupo, Hrvatska), i metamfetamin (Sigma, SAD).

3.12. Priprema otopina lijekova za primjenu u staničnoj kulturi

- urapidil (otopljen u DMEM-u; koncentracija matične otopine 4 mM, namješten pH na 7.4 i profiltrirano kroz 0.45μm filtar)
- haloperidol (ampula 5 mg/ml, razrijeđena u DMEM-u do radne koncentracije 1,10 i 100 μM)
- metamfetamin (otopljen u DMEM-u, koncentracija matične otopine 1.2 mM).

3.13. Medij i puferirana otopina za uzgoj i održavanje stanica PC12 i SH-SY5Y

Medij za uzgoj stanica: DMEM medij obogaćen s 10% (stanice SH-SY5Y) ili 15% (stanice PC12) fetalnim govođim serumom inaktiviranim 60 minuta na 56 ˚C, 2 mM L-glutaminom, te 100 U/ml penicilina i 100 μg/ml streptomicina; pH 7.4.

PBSA (puferirana otopina soli za ispiranje stanica): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4; pH 7.4.

3.14. Komplet za mjerenje aktivnosti kaspaza 3 i 7

Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, SAD): supstrat za kaspaze-rodamin 110 (bis-N-CBZ-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspartat amid ili Z-DEVD-R110) Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 pufer za kaspaze.

IN VITRO METODE:

Kultura stanica PC12 i SH-SY5Y

3.15. Održavanje i presađivanje stanica PC12 i SH-SY5Y

Stanice smo uzgajali u posudama za staničnu kulturu površine 25 cm^2 u 5 ml medija u inkubatoru (Heraeus, SAD), na 37 °C pri 5% CO_2, i uz relativnu vlažnost 95%. Medij je zamijenjen svježim svaka 2–3 dana. Nakon što su stanice prekrile podlogu na kojoj su rasle, razrijeđene su na način da je prvo odsisan medij, stanice su isprane sa 2 × 2 ml PBSA, a potom sa 1 ml otopine koja sadrži 0.05% tripsin i 1 mM EDTA u PBSA. Stanice su zatim ostavljene 5 minuta u inkubatoru kako bi se pod djelovanjem tripsina odvojile od podloge. Aktivnost tripsina inhibirali smo dodatkom 2 ml medija (proteaze iz seruma cijepaju tripsin). Nakon resuspendiranja, u posudi za staničnu kulturu ostavili smo 1/10 stanične suspenzije, te na to dodali stanični medij do punog volumena od 5 ml.

3.16. Nasađivanje stanica za tretman lijekovima

Za određivanje preživljenja nakon tretmana metamfetaminom, odnosno metamfetaminom u prisutnosti urapidila, haloperidola ili kvercetina, mjerenje nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta i aktivnost kaspaza-3/7, 5 × 10^3 stanica nasadili smo u pločice za uzgoj sa 96 bunarčića u 100 µl medija i ostavili preko noći da se prilijepe za podlogu prije početka tretmana.

3.17. Određivanje preživljenja stanica s pomoću MTT testa

MTT test temelji se na sposobnosti mitohondrijskih dehidrogenaza da prevode žuti topljivi supstrat 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid u formazan, ljubičasti produkt koji je netopiv u vodi. Količina proizvedenog formazana izravno je proporcionalna broju vijabilnih stanica. Tu smo metodu koristili za određivanje preživljenja stanica PC12 i SH-SY5Y tretiranih metamfetaminom, odnosno urapidilom, haloperidolom ili kvercetinom.

Nakon završetka tretmana, u svaki smo bunarčić dodali 0.5 mg/ml MTT-a u 40µl DMEM medija i inkubirali 3 h na 37 °C. Zatim smo otopili nastali formazan dodavanjem 160 µl dimetil-sulfoksida (DMSO) i očitali apsorbanciju pri valnoj duljini od 570 nm (Multiscan MS, Labsystems).

3.18. Mjerenje razine nakupljanja unutarstaničnih RKV-a

Unutarstanično nakupljanje RKV-a odredili smo metodom koja se temelji na fluorescenciji s pomoću 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetata (H_2DCF-dA). Princip metode je da se 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetat, nefluorescirajuća fluorogena proba, unutar stanice hidrolizira s pomoću esteraza, a zatim prisutne RKV-e oksidiraju taj hidrolizirani i deacetilirani oblik (H_2DCF) u fluorescirajući diklorofluorescin (DCF). Budući da je intenzitet fluorescentnog signala proporcionalan količini prisutnih RKV, mjerenjem fluorescencije moguće je odrediti prooksidacijski potencijal neurotoksina i intenzitet oksidacijskog stresa u stanici. Nakon završetka tretmana metamfetaminom i urapidilom, stanice PC12 isprali smo sa 2 × 100 µl PBSA, dodali 100 µM H_2DCF u 50 µl PBSA, te inkubirali tijekom 30 minuta u inkubatoru kako bi 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetat ušao u stanice. Nakon odsisavanja preostale boje, stanice su ponovno isprane s PBSA i tijekom 60 minuta inkubirane u PBSA kako bi H_2DCF reagirao s RKV-ama unutar stanice. Fluorescenciju smo izmjerili na fluorescencijskom spektrofotometru (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron Corporation, SAD) pri valnoj duljini pobuđivanja 485 nm i valnoj duljini emisije 538 nm.

3.19. Određivanje aktivnosti kaspaza-3/7

Za određivanje aktivnosti kaspaza 3 i 7 koristili smo komercijalni komplet (Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay, Promega, SAD) na pločici sa 96 bunarčića prema uputama proizvođača. U kompletu se nalaze pufer koji lizira stanice i supstrat za kaspaze (Z-DEVD-R110) koji nakon cijepanja kaspaza emitira fluorescenciju. Količina nastaloga fluorescentnog produkta proporcionalna je aktivnosti kaspaza-3/7. Miješanjem supstrata i pufera u omjeru 1:100 pripremili smo reagens. U mikrotitarske bunarčiće s nasađenim stanicama dodali smo volumen reagensa jednak volumenu medija (50 µl), promiješali

smo na miješalici na 300–500 rpm te inkubirali na sobnoj temperaturi 2 h. Zatim smo izmjerili fluorescenciju s valnom duljinom pobuđivanja od 485 nm i mjerenjem emisije na 538 nm (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron Corporation, SAD).

4. STATISTIKA

4.1. Statistička obradba prikupljenih rezultata

Za statističku obradbu rezultata korišteni su programi Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, SAD), Statistica 10 (StatSoft Inc., SAD), Microsoft Office Excel (Microsoft Office Professional Plus 2013). Rezultati su prikazani grafički i tablično. Dobiveni parametri testirani su na normalnost distribucije koristeći Kolmogorov-Smirnoff test. U slučaju normalne distribucije, korišteni su jednostruka analiza varijance (ANOVA) te post-hoc testovi, za usporedbu s kontrolnom skupinom (Dunnettov test), te za usporedbu svih skupina međusobno (Tukeyev test). U slučaju nenormalne distribucije, korišteni su neparametrijski Kruskal-Wallis test te post-hoc Mann-Whitney U test.

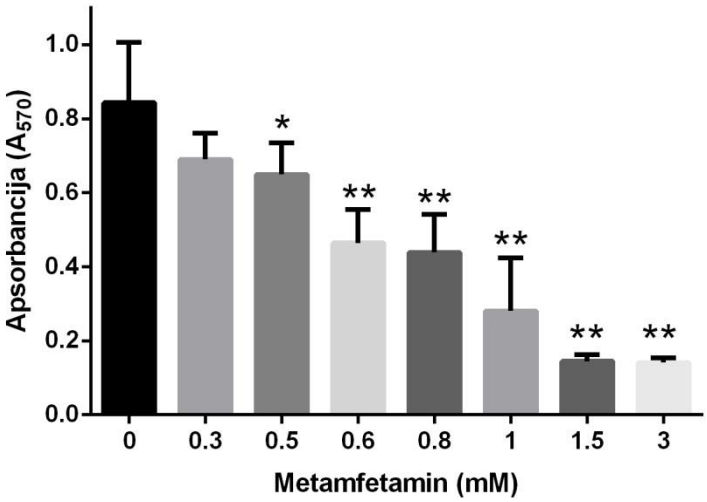
Ovisno o vrsti podataka i napravljenom testu, rezultati su izraženi kao medijan / minimum / maksimum te srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti, ili kao postotak u usporedbi s kontrolom. Sve analize u kojima je vrijednost $p < 0.05$, držane su statistički značajnima.

5. REZULTATI

***IN VITRO*:**

5.1. Učinak metamfetamina na preživljenje stanica PC12

Da bi se odredila krivulja doza – odgovor, stanice PC12 tretirane su tijekom 24 sata rastućim koncentracijama metamfetamina (u rasponu 0.3–3 mM). Nakon završetka tretmana, vijabilnost stanica određena je s pomoću MTT testa. Kao što je prikazano na slici 5, metamfetamin je u ovisnosti o primijenjenoj koncentraciji smanjio preživljenje stanica PC12. Budući da je značajnije smanjenje preživljenja ustanovljeno kod stanica tretiranih 0.6 mM metamfetaminom, ta je koncentracija korištena za daljnja istraživanja potencijalno neuroprotektivnog djelovanja urapidila.

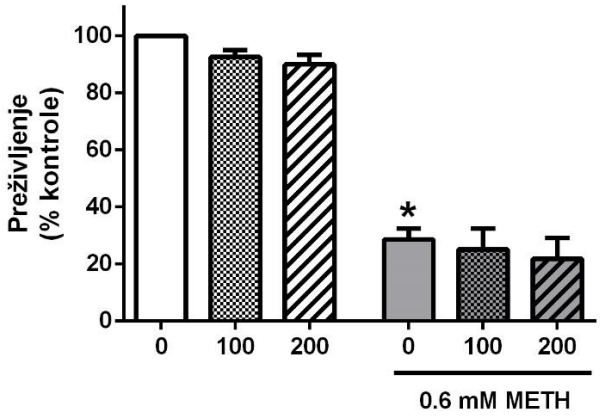


Slika 5. Toksični učinak metamfetamina na stanicama PC12. Prikazani su rezultati mjerenja vijabilnosti s pomoću MTT testa nakon tretmana metamfetaminom tijekom 24 sata (n=5). Za statističku obradbu koristili smo jednostruku analizu varijance i Dunnettov test (*P < 0.01; **P < 0.001 u usporedbi s kontrolnom skupinom).

5.2. Učinak urapidila na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom

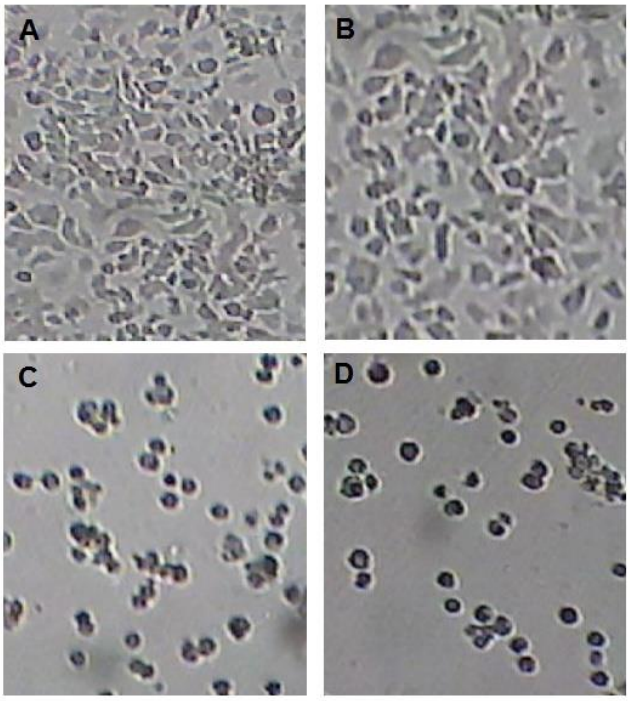
Da bi se postigao značajni toksični učinak metamfetamina, stanice PC12 tretirane su koncentracijom od 0.6 mM metamfetamina tijekom 24 sata. Za istraživanje potencijalno neuroprotektivnog učinka urapidila korišteno je 100 i 200 μM urapidila, a najveće koncentracije koje su primijenjene samostalno nisu utjecale na preživljenje stanica PC12. Analizom obradbe rezultata MTT testa utvrđeno je da je 0.6 mM metamfetamin značajno smanjio preživljenje

stanica PC12 ($P < 0.0001$ prema Tukey testu nakon jednostruke ANOVA-e). Preživljenje je iznosilo 28.57 ± 3.91% u odnosu na kontrolnu skupinu. Dodatak urapidila u 100 i 200 μM koncentraciji nije uzrokovao značajne promjene preživljenja u usporedbi sa stanicama tretiranima samo metamfetaminom. Kod stanica PC12 tretiranih 0.6 mM metamfetaminom i 100 μM urapidilom preživljenje je iznosilo 25.04 ± 7.44%, dok je u prisutnosti dvostruko veće koncentracije urapidila i metamfetamina preživljenje bilo 21.77 ± 7.29% u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica.



Slika 6. Učinak urapidila na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom. Stanice su tijekom 24 sata tretirane 0.6 mM metamfetaminom i/ili 100 i 200 μM urapidilom. Preživljenje stanica nakon tretmana određeno je s pomoću MTT testa. Tretman metamfetaminom značajno je smanjio preživljenje stanica PC12 (*$P < 0.0001$ prema Tukey testu nakon jednostruke ANOVA-e), dok urapidil nije utjecao na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom. Prikazani su rezultati iz 6 neovisnih eksperimenata i predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu pogrešku srednje vrijednosti.

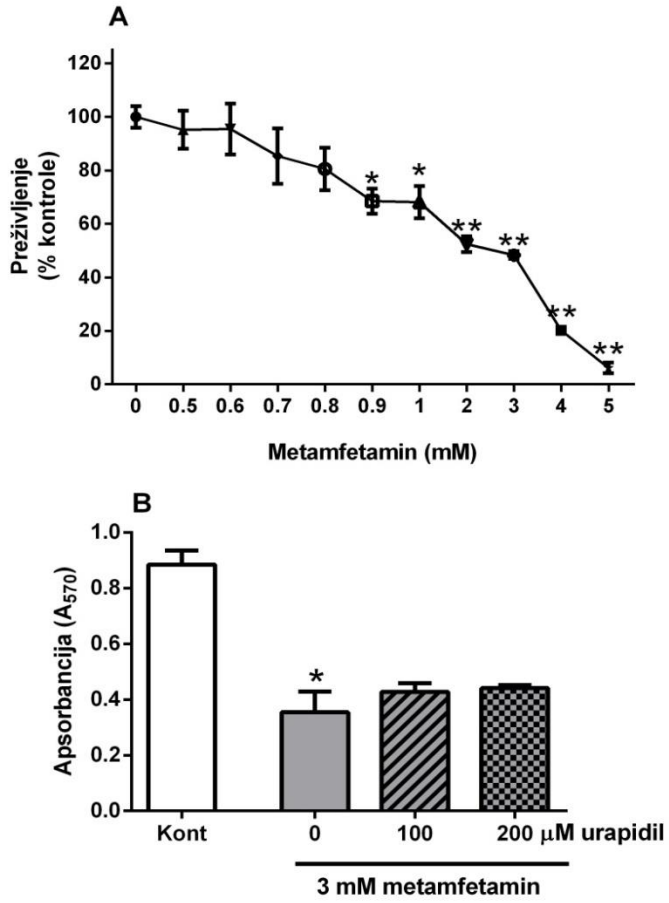
Učinak metamfetamina očitovao se i u promijenjenoj morfologiji stanica PC12. Nakon izlaganja 0.6 mM metamfetaminu, tijela neurona bila su manja i zaokružena, stanice slabije prilijepljene za podlogu, a izdanci neurona vidljivo kraći (Slika 7).



Slika 7. Morfološke promjene stanica PC12 nakon tretmana metamfetaminom i urapidilom. Morfologija stanica PC12 fotografirana svjetlosnim mikroskopom (povećanje 200 puta). A) kontrolna skupina stanica B) stanice tretirane 100 μM urapidilom C) stanice tretirane 0.6 mM metamfetaminom D) stanice istovremeno tretirane urapidilom i metamfetaminom.

5.3. Učinak urapidila na preživljenje stanica SH-SY5Y tretiranih metamfetaminom

Učinak urapidila istražen je i na stanicama SH-SY5Y. Metamfetamin je u ovisnosti o koncentraciji smanjio preživljenje i te dopaminergičke linije, a za postizanje toksičnog učinka bile su potrebne veće koncentracije nego na stanicama PC12. Primijenjen u kombinaciji sa 3 mM metamfetaminom, koncentraciji pri kojoj je prvi put prema krivulji doza – odgovor preživljenje stanica SH-SY5Y bilo manje od 50% (48.33 ± 1.45%), 100 i 200 μM urapidil nije promijenio citotoksično djelovanje metamfetamina na stanicama SH-SY5Y.



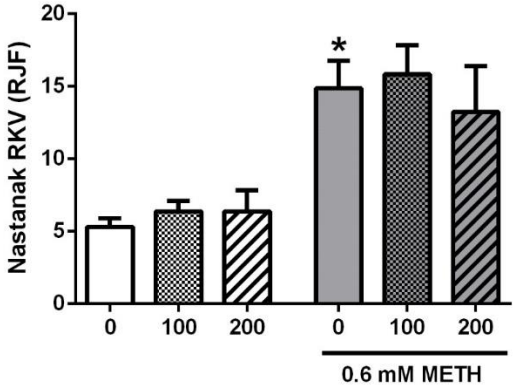
Slika 8. Učinak metamfetamina i urapidila na stanicama SH-SY5Y.

A) Prikazani su rezultati mjerenja vijabilnosti s pomoću MTT testa nakon tretmana metamfetaminom tijekom 24 sata (n=2). Za statističku obradbu korišteni su jednostruka analiza varijance i Dunnettov test (*$p < 0.01$; **$p < 0.001$ u usporedbi s kontrolnom skupinom). B) Stanice su tijekom 24 sata tretirane 3 mM metamfetaminom i/ili 100 i 200 μM urapidilom. Tretman metamfetaminom značajno je smanjio preživljenje stanica (*$p < 0.001$ prema Tukey testu nakon jednostruke ANOVA-e), dok urapidil nije imao učinka na toksični učinak

metamfetamina. Prikazani su rezultati iz 2 neovisna eksperimenta i predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu pogrešku srednje vrijednosti.

5.4. Učinak metamfetamina i urapidila na nakupljanje unutarstaničnih RKV-a na stanicama PC12

Jedan od bitnih elemenata neurotoksičnog učinka metamfetamina vezan je uz porast RKV-a, što stanicu dovodi u stanje oksidacijskog stresa. Da bi se potvrdilo da je u temeljima neurotoksičnog učinka metamfetamina u kulturi stanica PC12 njegova sposobnost da pokrene autooksidaciju dopamina i nakupljanje toksičnih RKV-a, stvaranje RKV-a nakon tretmana sa 0.6 mM metamfetaminom, kao i sa 100 i 200 μM urapidilom određeno je fluorescentnom metodom s pomoću H_2DCF-dA. U bazalnim uvjetima izmjerena je razina RKV-a od 5.308 ± 0.58 RJF (relativne jedinice fluorescencije). Stanice PC12 tretirane samo sa 100 μM i 200 μM urapidilom imale su sličnu razinu endogenih RKV-a kao i stanice iz kontrolne skupine. U skladu s očekivanjima, tretman metamfetaminom izazvao je vrlo veliki porast RKV-a unutar stanice. Izmjerena je fluorescencija od 14.88 ± 0.58 RJF, što predstavlja porast od 180% u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod stanica PC12 tretiranih i urapidilom i metamfetaminom, nije bilo značajnih promjena u razini oksidacijskog stresa u usporedbi sa stanicama tretiranima samo metamfetaminom (Slika 9).



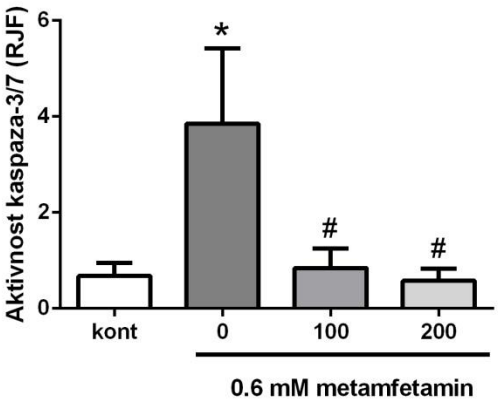
Slika 9. Učinak metamfetamina na nakupljanje unutarstaničnih RKV-a.

Metamfetamin (0.6 mM, 24 sata) je izazvao snažan porast RKV-a unutar stanice (*P < 0.01 prema Tukey testu nakon jednostruke ANOVA-e). Urapidil (100 i 200 μM) primijenjen samostalno, kao i u kombinaciji s metamfetaminom nije utjecao na razinu RKV-a. Rezultati

prikazuju srednju vrijednost ± standardnu pogrešku srednje vrijednosti iz 3 neovisna pokusa izvedena u kvadripletu.

5.5. Učinak metamfetamina i urapidila na aktivnost kaspaza u uvjetima oksidacijskog stresa

Aktivacija unutarnjega (mitohondrijalnog) apoptotskog puta i posljedično efektorskih kaspaza, posebice kaspaza-3 i -7, važna je za neurotoksično djelovanje metamfetamina. Stoga je analiziran učinak metamfetamina i urapidila na aktivnost spomenutih efektorskih kaspaza. Utvrđeno je da izlaganje 0.6mM metamfetaminu tijekom 24 sata povećava aktivnost kaspaza-3/7. U kontrolnoj skupini stanica aktivnost kaspaza iznosila je 0.68 ± 0.08 RJF, a u stanicama tretiranima 0.6 mM metamfetaminom 3.85 ± 0.45 RJF ($P < 0.0001$ prema Tukey testu nakon jednostruke analize varijance). Povećanje aktivnosti kaspaza-3/7 u potpunosti je inhibirano u prisutnosti 100 i 200 μM urapidila.

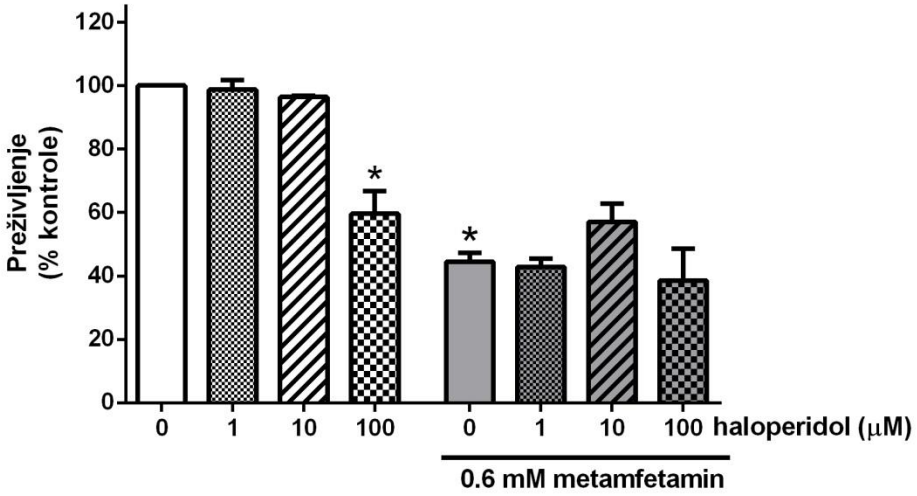


Slika 10. Učinak metamfetamina i urapidila na aktivnost kaspaza-3 i -7.

Aktivnost kaspaza-3/7 mjerena je 24 h nakon tretmana 0.6 mM metamfetaminom i 100 i 200 μM urapidilom, kako je opisano u Materijalima i metodama. Metamfetamin je povećao aktivnost kaspaza-3/7 u odnosu na kontrolnu skupinu, a u skupini tretiranoj urapidilom aktivnost je vraćena na vrijednosti izmjerene u kontrolnoj skupini (*$P < 0.0001$ u odnosu na kontrolnu skupinu, $^{\#}P < 0.0001$ u odnosu na skupinu tretiranu metamfetaminom prema Tukey testu nakon jednostruke analize varijance). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± standardnu pogrešku srednje vrijednosti iz 4 neovisna pokusa izvedena u triplikatu.

5.6. Učinak haloperidola na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom

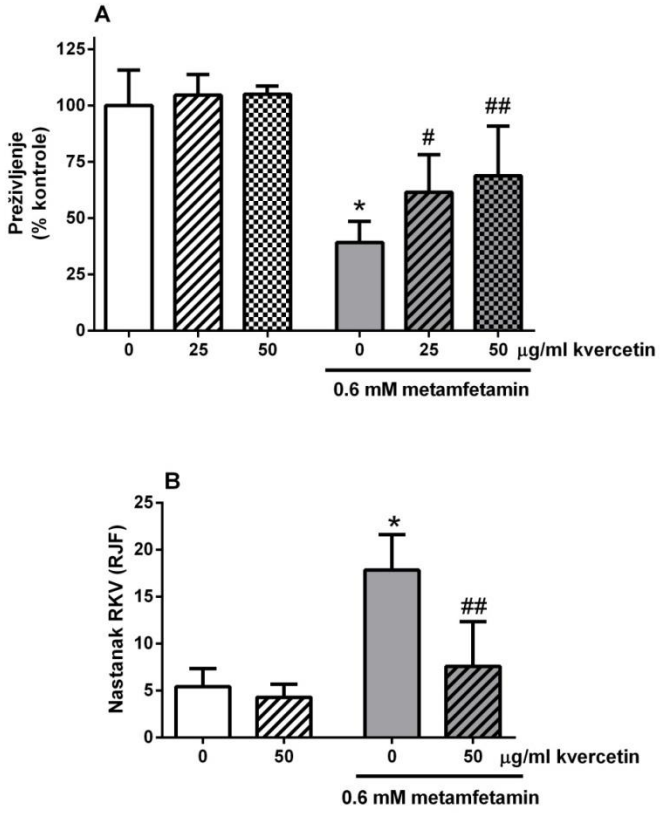
U nastavku istraživanja istražen je učinak haloperidola na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom. Haloperidol je lijek iz skupine tipičnih antipsihotika, a djeluje kao antagonist dopaminskih receptora D2. Kao što je prikazano na slici 7, haloperidol primijenjen u visokim koncentracijama i sam smanjuje preživljenje stanica PC12 ($P < 0.0001$ prema jednostrukoj analizi varijance i Tukey testu). U odnosu na kontrolnu skupinu, preživljenje u skupini tretiranoj sa 100 μM haloperidolom iznosilo je 59.65 ± 5.02%. Iako je u skupini tretiranoj s 10 μM haloperidolom preživljenje bilo veće nego u skupini tretiranoj samo 0.6 mM metamfetaminom (56.97 ± 3.35% naspram 44.44 ± 1.67%), to povećanje nije doseglo razinu statističke značajnosti. Također, treba naglasiti da toksični učinak 100 μM haloperidola nije bio vidljiv na stanicama koje su istovremeno tretirane sa 0.6 mM metamfetaminom ($P = 0.077$, preživljenje 38.52 ± 7.09).



Slika 11. Učinak haloperidola na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom. Stanice su tijekom 24 sata tretirane 0.6 mM metamfetaminom i/ili 1, 10 i 100 μM haloperidolom. Preživljenje stanica nakon tretmana određeno je s pomoću MTT testa. Haloperidol nije utjecao na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom (*$P < 0.0001$ prema Tukey testu nakon jednostruke ANOVA-e). Prikazani su rezultati iz 3 neovisna eksperimenta i predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu pogrešku srednje vrijednosti.

5.7. Učinak kvercetina na preživljenje i nakupljanje RKV-a na stanicama PC12 tretiranim metamfetaminom

Kvercetin je polifenol biljnog porijekla. Ima izrazito antioksidacijsko djelovanje i vrlo je potentan hvatač slobodnih radikala (Boots i sur., 2008.). U koncentracijama 25 i 50 μg/ml kvercetin je zaštitio stanice PC12 od toksičnog djelovanja metamfetamina (A), a primijenjen u najvećoj koncentraciji koja samostalno nije smanjila razinu RKV-a, značajno je smanjio endogeno nakupljanje RKV-a i razinu oksidacijskog stresa (B). U stanicama tretiranima samo sa 0.6 mM metamfetamina preživljenje je iznosilo 39.2 ± 2.1%, uz istovremeni porast RKV-a od 230% (sa 5.40 ± 0.79 na 17.82 ± 1.54 RJF). Preživljenje u prisutnosti 50 μg/ml kvercetina i metamfetamina bilo je 68.8 ± 6.4%, a endogena razina RKV-a spuštena je na 7.57 ± 2.74, što nije bilo statistički značajno različito u usporedbi s kontrolnom skupinom stanica (P = 0.749; Tukey test nakon jednostruke analize varijance).



Slika 12. Učinak kvercetina na preživljenje stanica PC12 tretiranih metamfetaminom i nakupljanje unutarstaničnih RKV-a.

Metamfetamin (0.6 mM, 24 sata) je smanjio preživljenje stanica PC12 i izazvao porast RKV-a unutar stanice (*P < 0.0001 u usporedbi s kontrolom prema Tukey testu nakon jednostruke

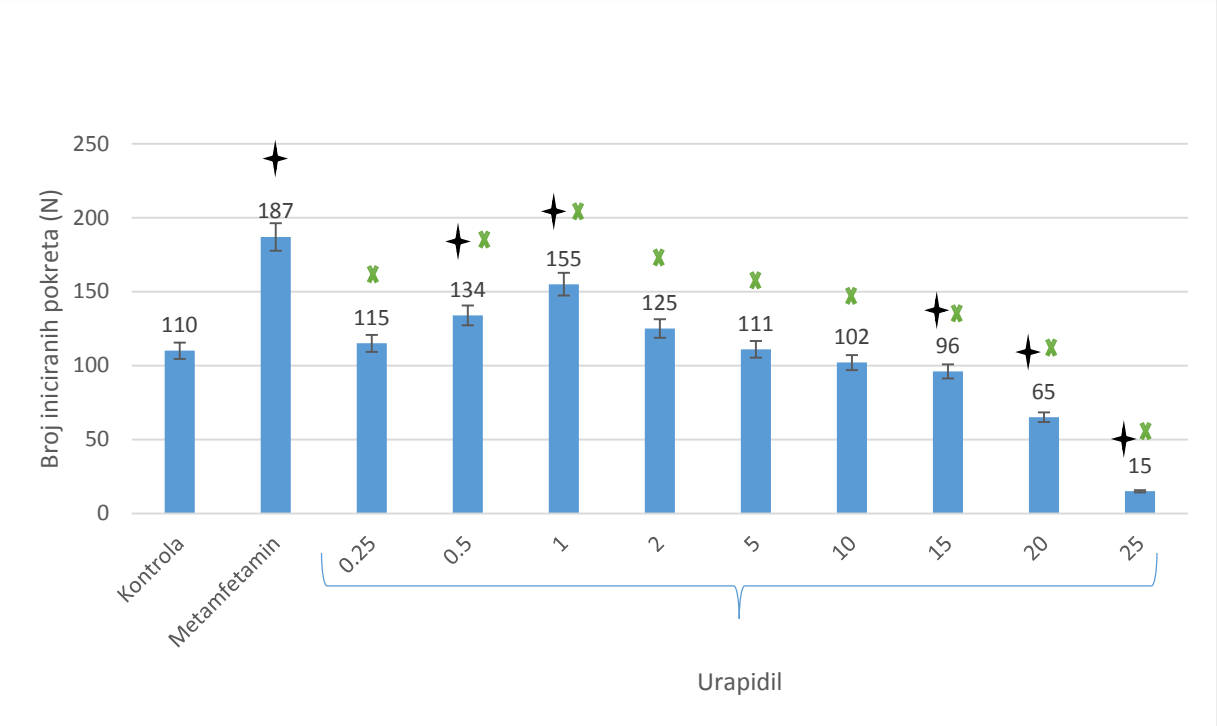
ANOVA-e). Kvercetin je u ovisnosti o koncentraciji smanjio citotoksični učinak metamfetamina i smanjio razinu RKV-a na vrijednosti izmjerene u kontrolnoj skupini stanica ($^{\#}P < 0.01$, $^{\#\#}P < 0.0001$ u odnosu na skupinu tretiranu 0.6 mM metamfetaminom; $^{*}P < 0.0001$ u usporedbi s kontrolom). Rezultati prikazuju srednju vrijednost ± standardnu pogrešku srednje vrijednosti iz 4 neovisna pokusa izvedena u tripletu.

***IN VIVO*:**

5.8. Učinak urapidila na lokomotornu aktivnost

a) *Inicijacija pokreta*

Određen je učinak urapidila u usporedbi s kontrolnom grupom i grupom tretiranom metamfetaminom. Vidljivo je da je broj iniciranih pokreta kod štakora tretiranih urapidilom u svim dozama značajno manji od metamfetamina, ali vidljiv je i značajan porast u skupinama koje su tretirane sa 0.5 i 1 mg urapidila, a potom značajan pad u skupinama tretiranima sa 15, 20 i 25 mg urapidila u odnosu na kontrolnu grupu. Metamfetamin je značajno povećao broj započetih pokreta u odnosu na kontrolu, kako je bilo očekivano (Slika 13).

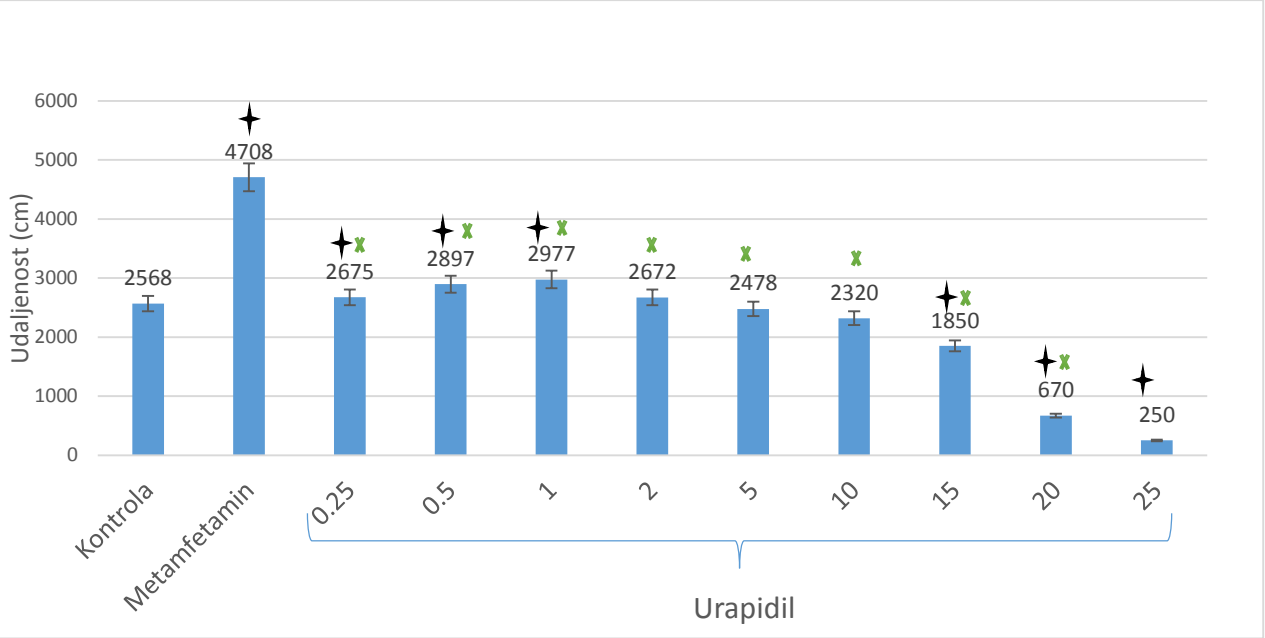


Slika 13. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD ukupnog broja (N) iniciranih pokreta po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 mg/životinji i.p.).

✦ naspram kontrole; ✘ naspram metamfetamina; $P < 0.05$

b) *<u>Horizontalna udaljenost</u>*

Određen je učinak urapidila u usporedbi s kontrolnom grupom i grupom tretiranom metamfetaminom. Vidljivo je da je ukupna prosječna prijeđena udaljenost u svim grupama tretiranima urapidilom značajno manja od metamfetamina, ali vidljiv je i značajan porast u skupinama koje su tretirane sa 0.25, 0.5 i 1 mg urapidila, potom značajan pad u skupinama tretiranima sa 10, 15, 20 i 25 mg urapidila u odnosu na kontrolnu grupu. Metamfetamin je očekivano značajno povećao broj iniciranih pokreta u odnosu na kontrolu (Slika 14).

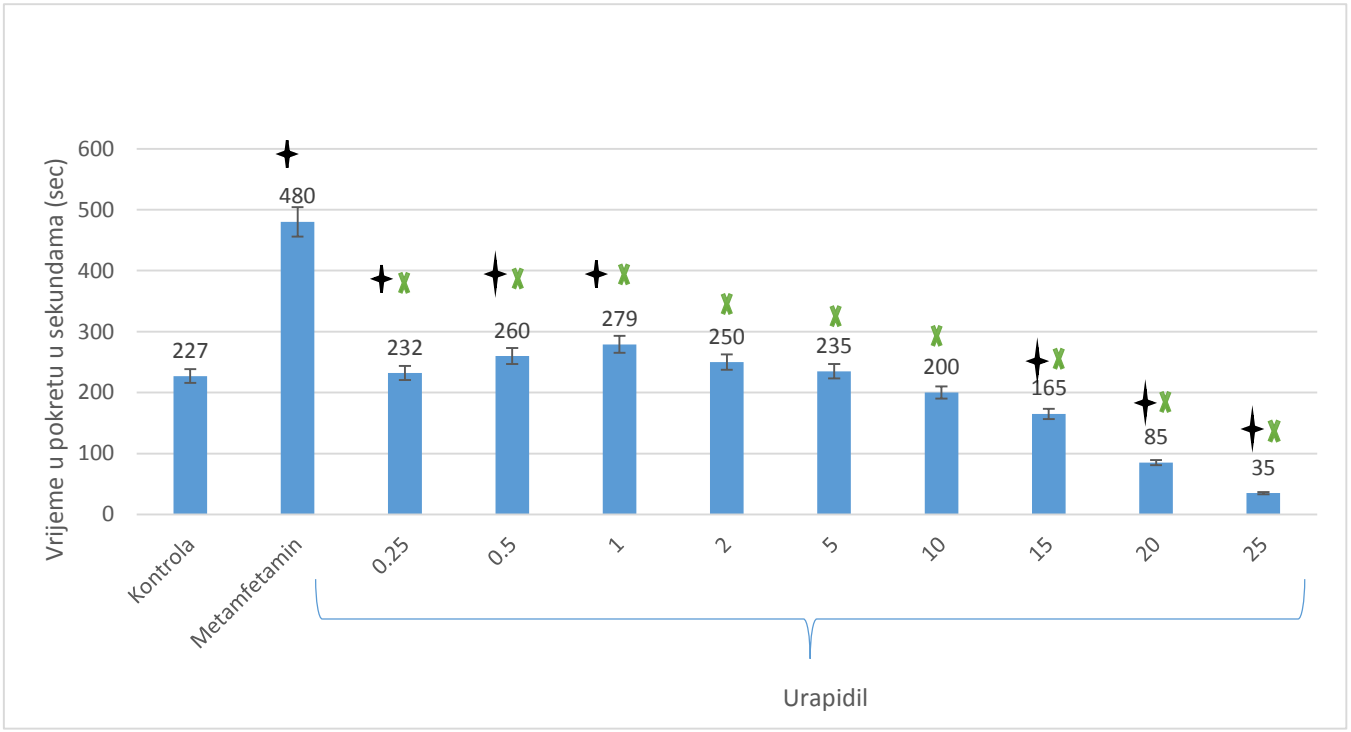


Slika 14. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD ukupne udaljenosti (cm) po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 mg/životinji i.p.).

✦ naspram kontrole; x naspram metamfetamina; $P < 0.05$

c) *Vrijeme u pokretu*

Određen je učinak urapidila na vrijeme provedeno u pokretu. Vidljivo je da je ukupno prosječno vrijeme u pokretu u svim skupinama tretiranima urapidilom značajno manje od skupine tretirane metamfetaminom, ali vidljiv je i značajan porast u skupinama koje su tretirane sa 0.25, 0.5 i 1 mg urapidila, potom značajan pad u skupinama tretiranima sa 15, 20 i 25 mg urapidila u odnosu na kontrolnu grupu. Metamfetamin je očekivano značajno povećao broj iniciranih pokreta u odnosu na kontrolu (Slika 15).

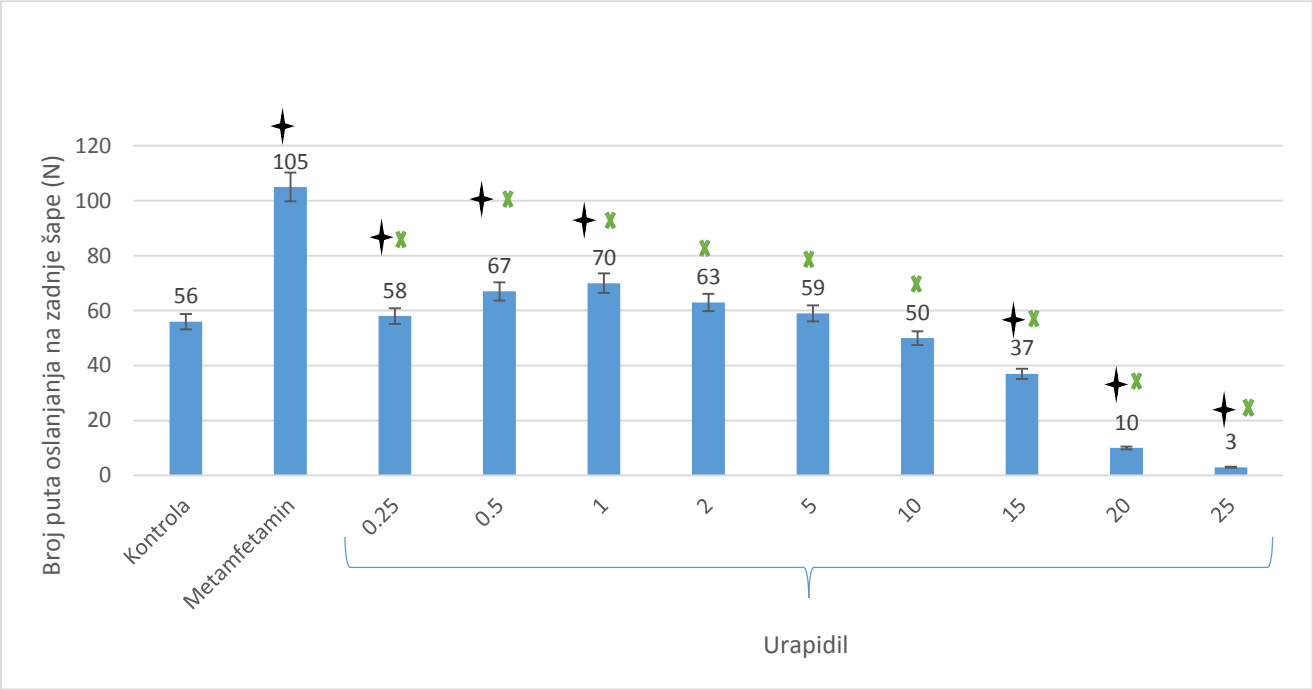


Slika 15. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD vremena u pokretu u sekundama (sec) po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 mg/životinji i.p.).

✦ naspram kontrole; ✕ naspram metamfetamina; $P < 0.05$

d) <u>Oslanjanje na zadnje šape</u>

Određen je učinak urapidila na oslanjanje na zadnje šape. Vidljivo je da je prosječna vrijednost ukupnog oslanjanja na zadnje šape u svim dozama značajno manja od metamfetamina, ali vidljiv je i značajan porast u skupinama koje su tretirane sa 0.25, 0.5 i 1 mg urapidila, potom značajan pad u skupinama koje su tretirane sa 15, 20 i 25 mg urapidila u odnosu na kontrolnu grupu. Metamfetamin je očekivano značajno povećao broj iniciranih pokreta u odnosu na kontrolu (Slika 16).



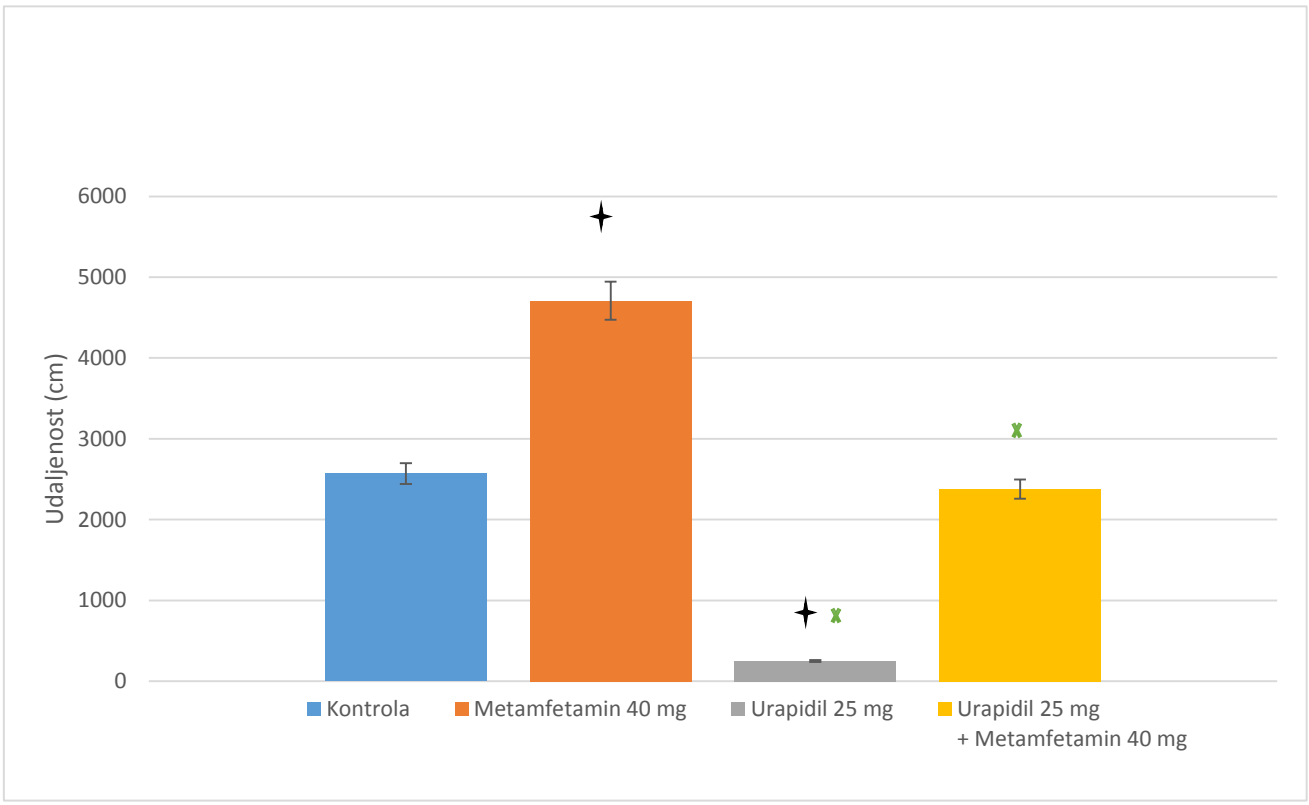
Slika 16. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD broja puta (N) oslanjanja na zadnje šape po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 mg/životinji i.p.).

✦ naspram kontrole; ✘ naspram metamfetamina; $P < 0.05$

5.9. Učinak predtretmanom urapidila na lokomotornu aktivnost

a) <u>Horizontalna udaljenost</u>

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min prije (predtretman) aplikacije metamfetamina, na prijeđenu horizontalnu udaljenost. Vidljivo je da je predtretman urapidilom značajno smanjio potencijalno djelovanje metamfetamina. Iskazani su i učinci samog metamfetamina koji očekivano povećava horizontalnu udaljenost, dok, s druge strane, samostalno primijenjen urapidil značajno smanjuje horizontalnu udaljenost u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 17).

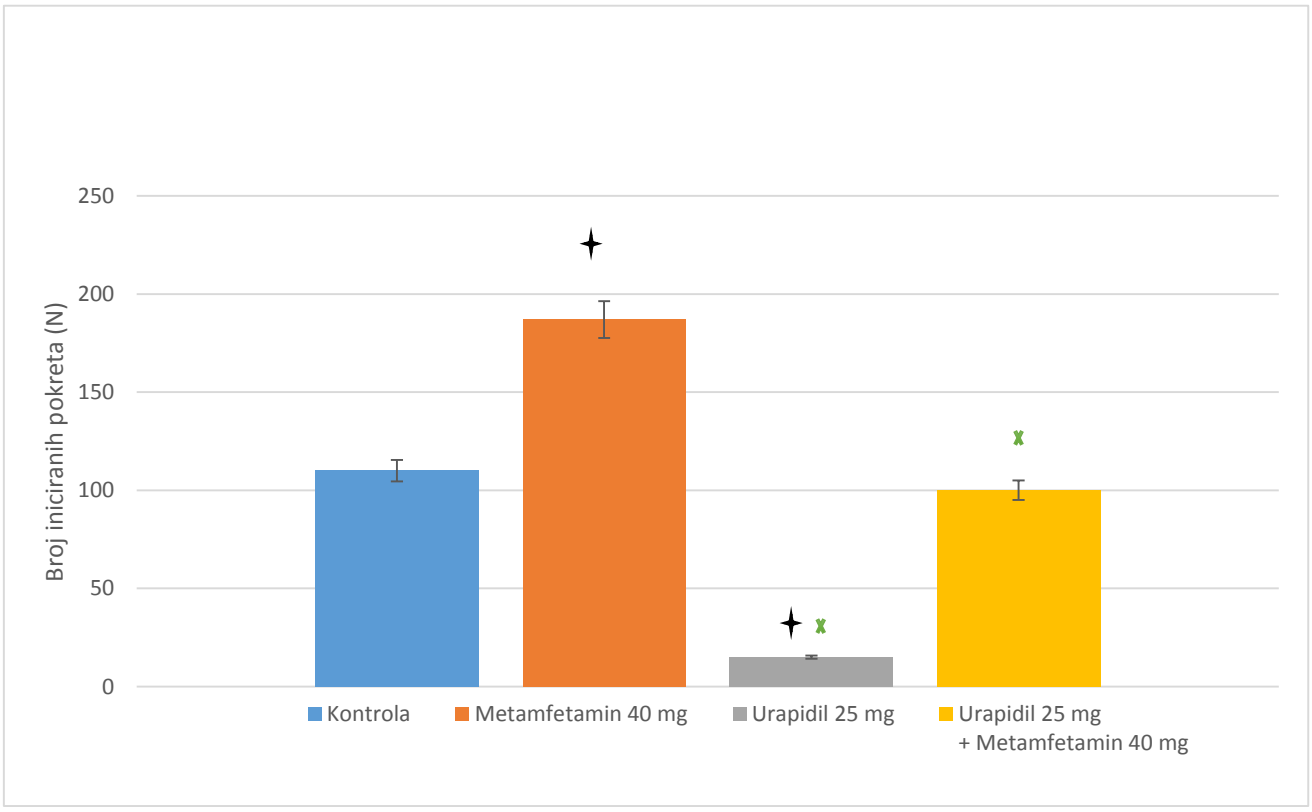


Slika 17. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD ukupne udaljenosti (cm) po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 25 mg/životinji i.p. i predtretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. prije metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; x naspram metamfetamina; $P < 0.05$

b) <u>Inicijacija pokreta</u>

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min prije (predtretman) aplikacije metamfetamina, na broj iniciranih pokreta. Vidljivo je da je predtretman urapidilom zaustavio potencijalno djelovanje metamfetamina. Iskazani su i učinci samog metamfetamina koji očekivano povećava broj iniciranih pokreta, dok, s druge strane, samostalno primijenjen urapidil značajno smanjuje inicijaciju pokreta u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 18).

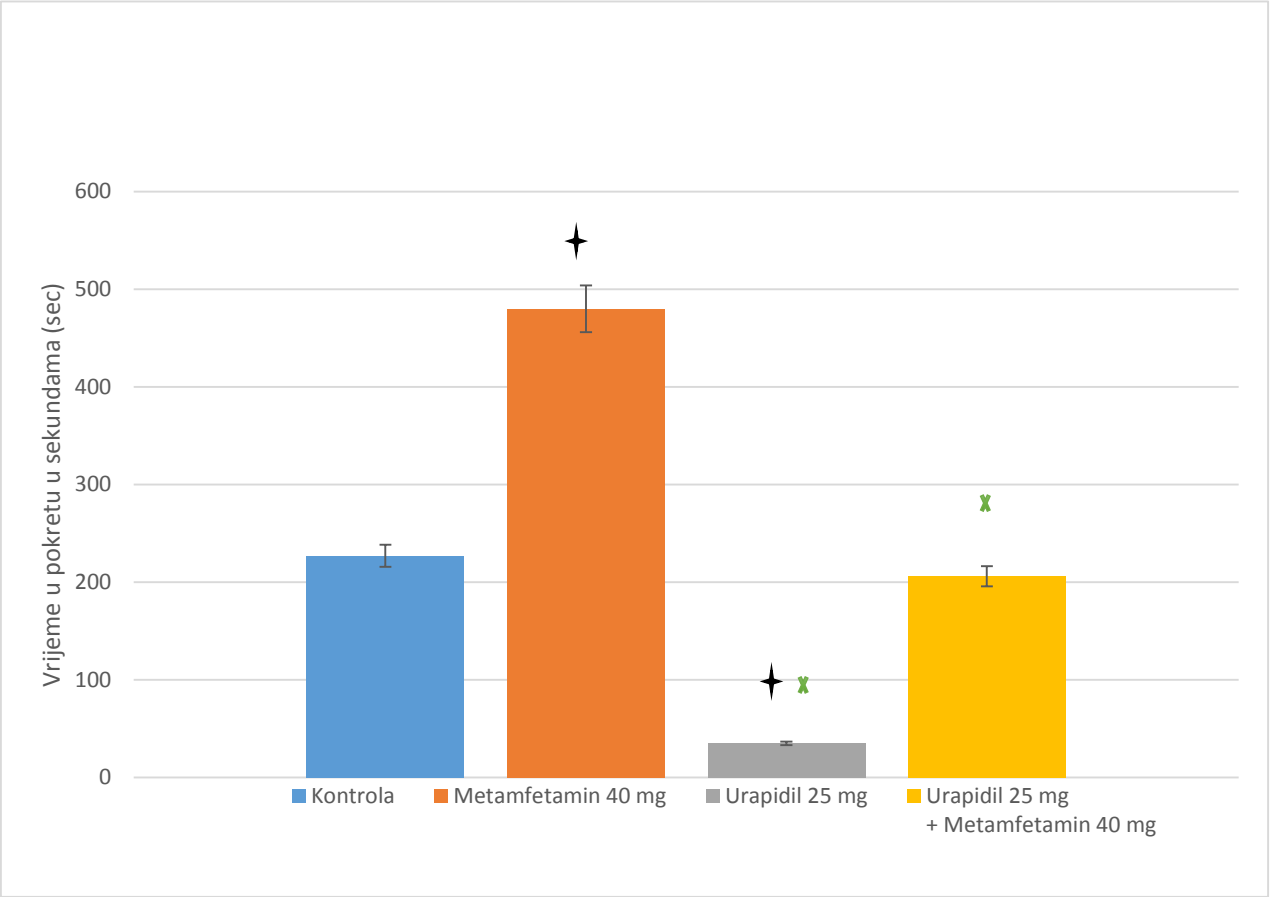


Slika 18. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD ukupnog broja (N) iniciranih pokreta po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 25 mg/životinji i.p. i predtretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. prije metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; x naspram metamfetamina; $P < 0.05$

c) <u>Vrijeme u pokretu</u>

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min prije (predtretman) aplikacije metamfetamina, na ukupno vrijeme provedeno u pokretu. Vidljivo je da je predtretman urapidilom zaustavio potencijalno djelovanje metamfetamina. Iskazani su i učinci samog metamfetamina koji očekivano povećava vrijeme u pokretu, dok, s druge strane, samostalno primijenjen urapidil značajno smanjuje vrijeme u pokretu u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 19).

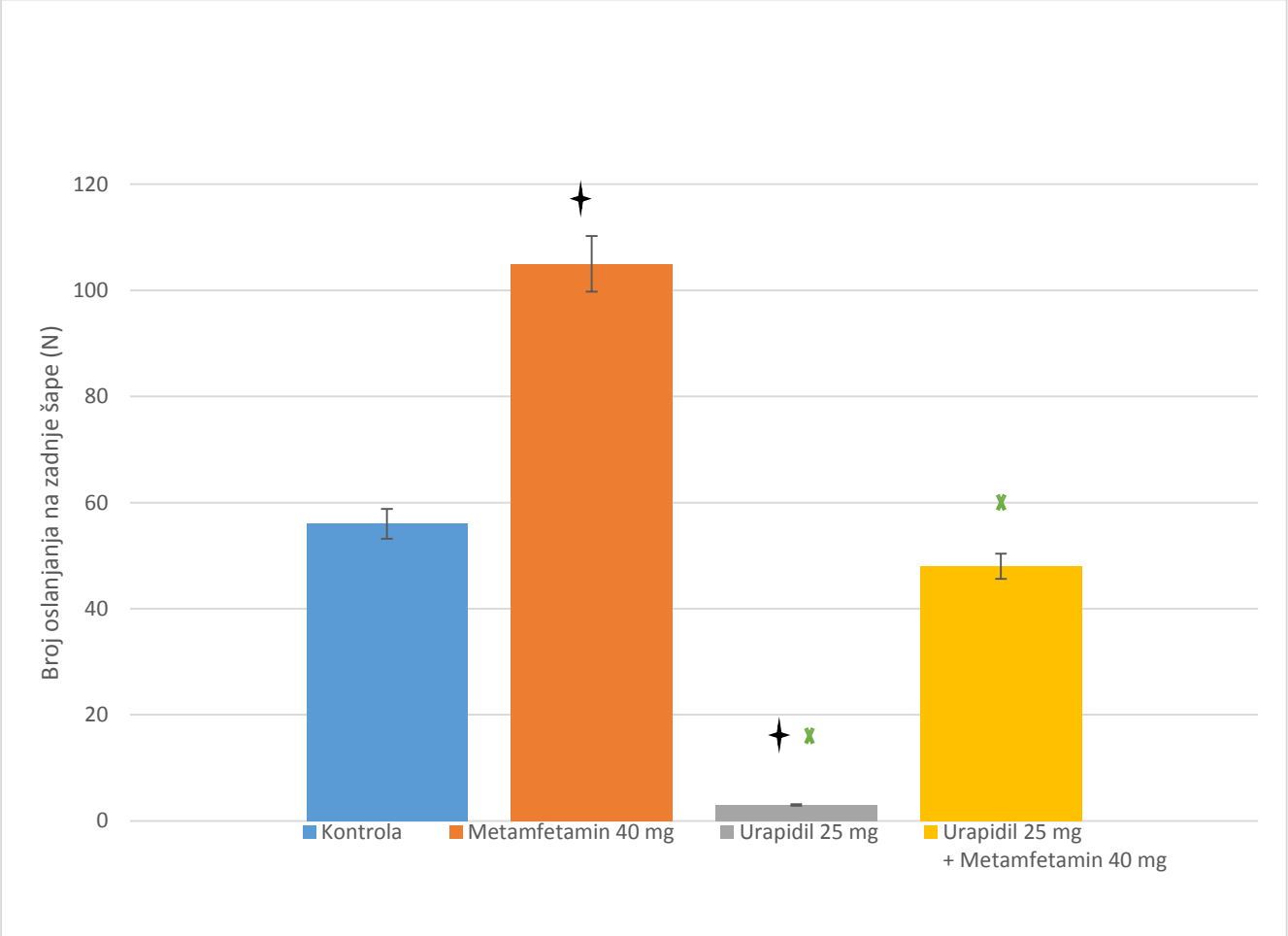


Slika 19. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD vremena u pokretu u sekundama (sec) po grupama, mjerena u razdoblju od 2 sata od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 25 mg/životinji i.p. i predtretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. prije metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; ✘ naspram metamfetamina; $P < 0.05$

d) <u>Oslanjanje na zadnje šape</u>

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min prije (predtretman) aplikacije metamfetamina. Vidljivo je da je predtretman urapidilom zaustavio potencijalno djelovanje metamfetamina. Iskazani su i učinci samog metamfetamina koji očekivano povećava broj oslanjanja na zadnje šape, dok, s druge strane, samostalno primijenjen urapidil značajno smanjuje broj oslanjanja na zadnje šape u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 20).



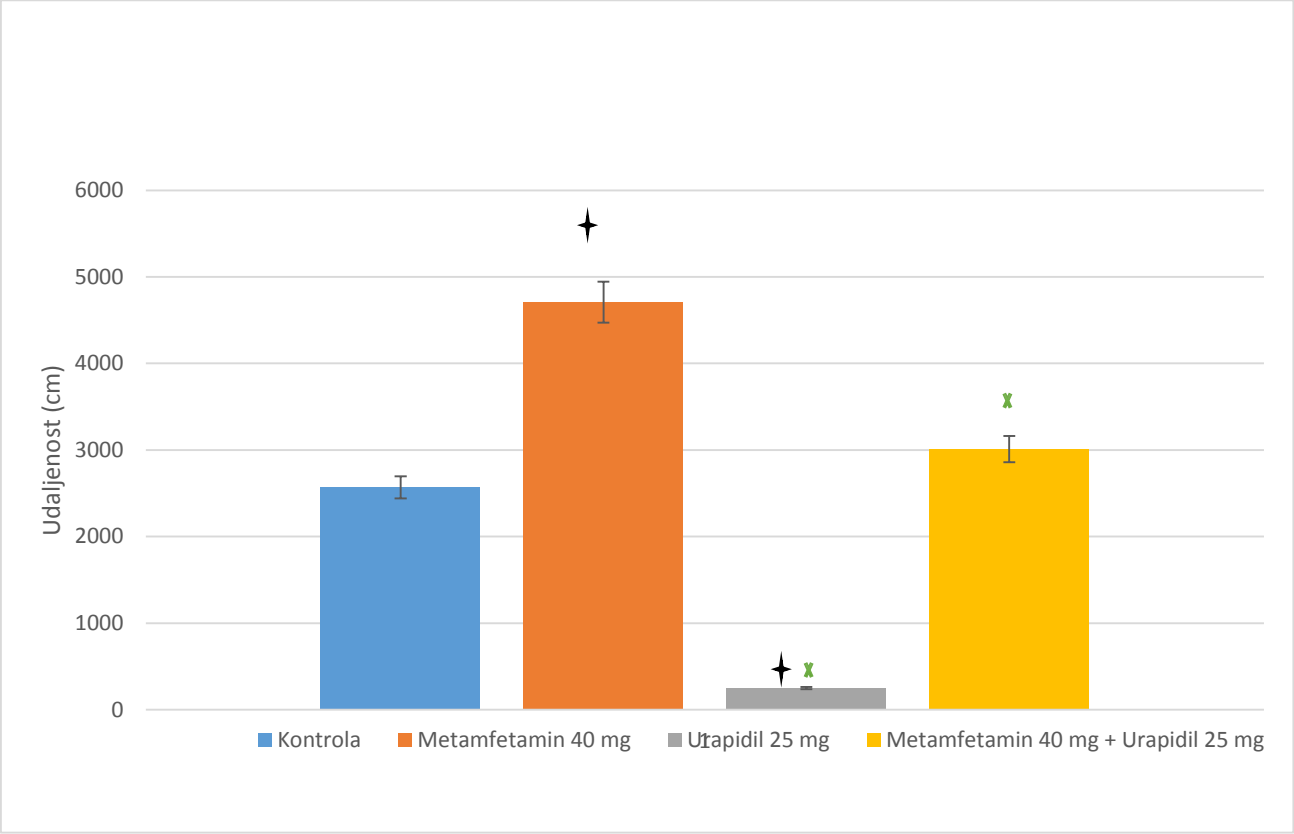
Slika 20. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD broja puta (N) oslanjanja na zadnje šape po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 25 mg/životinji i.p. i predtretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. prije metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; x naspram metamfetamina; $P < 0.05$

5.10. Učinak posttretmanom urapidila na lokomotornu aktivnost

a) <u>Horizontalna udaljenost</u>

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min nakon (posttretman) aplikacije metamfetamina. Vidljivo je da je posttretman urapidilom antagonizirao djelovanje metamfetamina. Iskazani su i učinci samog metamfetamina koji očekivano povećava horizontalnu udaljenost, dok, s druge strane, samostalno primijenjen urapidil značajno smanjuje horizontalnu udaljenost u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 21).

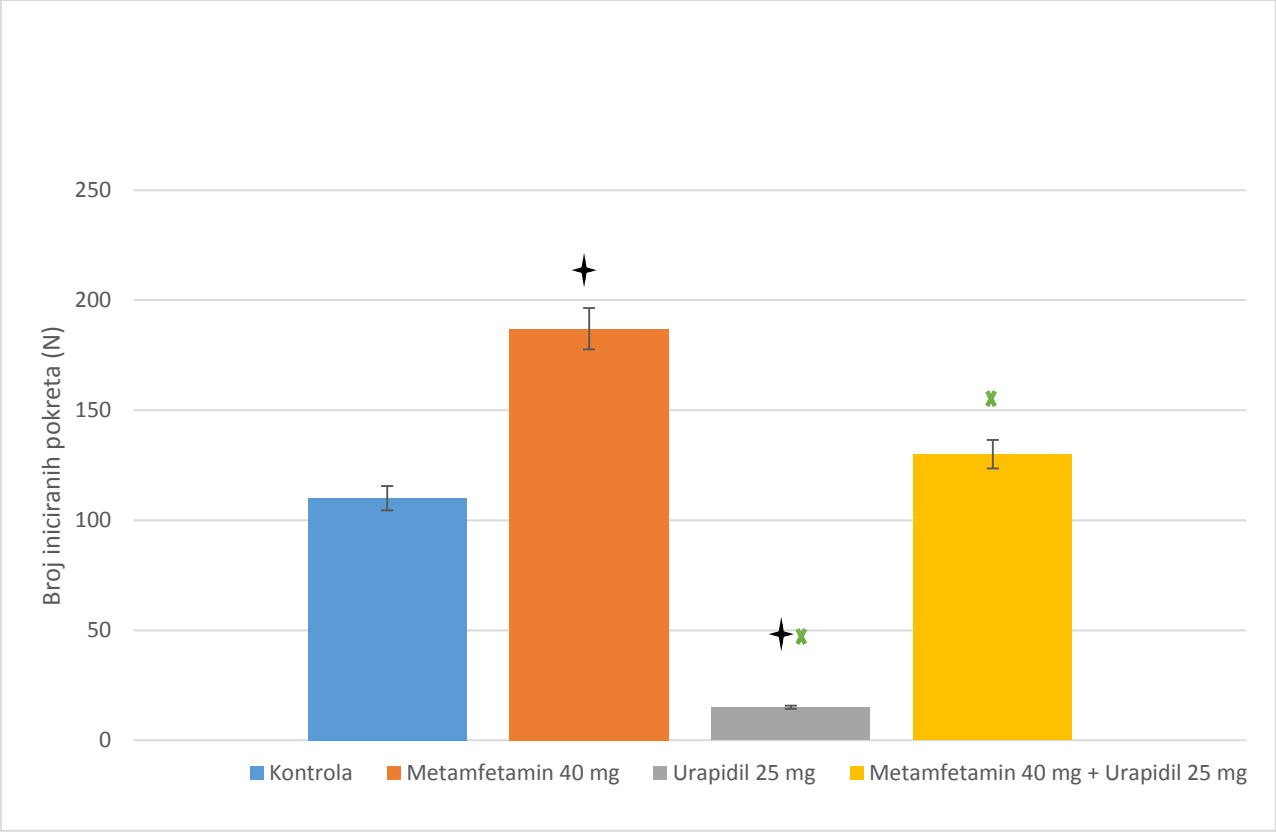


Slika 21. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD ukupne udaljenosti (cm) po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 25 mg/životinji i.p. i posttretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. prije metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; ✘ naspram metamfetamina; $P < 0.05$

b) <u>Inicijacija pokreta</u>

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min nakon (posttretman) aplikacije metamfetamina. Vidljivo je da je kasni tretman urapidilom antagonizirao djelovanje metamfetamina. Iskazani su i učinci samog metamfetamina koji očekivano povećava broj iniciranih pokreta, dok, s druge strane, urapidil značajno smanjuje broj iniciranih pokreta u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 22).

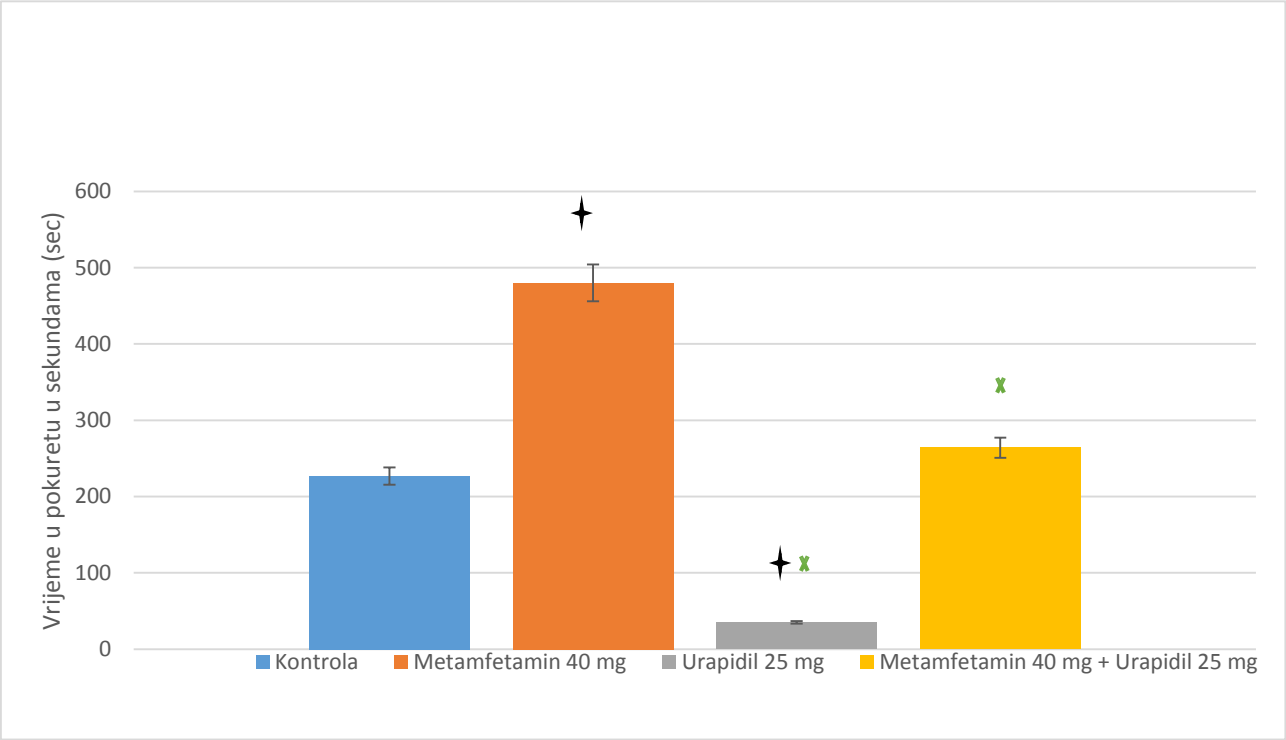


Slika 22. Lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD ukupnog broja (N) iniciranih pokreta po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 25 mg/životinji i.p. i posttretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. prije metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; ✘ naspram metamfetamina; $P < 0.05$

c) *Vrijeme u pokretu*

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min nakon (posttretman) aplikacije metamfetamina. Vidljivo je da je posttretman urapidilom antagonizirao djelovanje metamfetamina. Iskazani su i učinci samog metamfetamina koji očekivano povećava vrijeme u pokretu, dok, s druge strane, samostalno primijenjen urapidil značajno smanjuje vrijeme u pokretu u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 23).

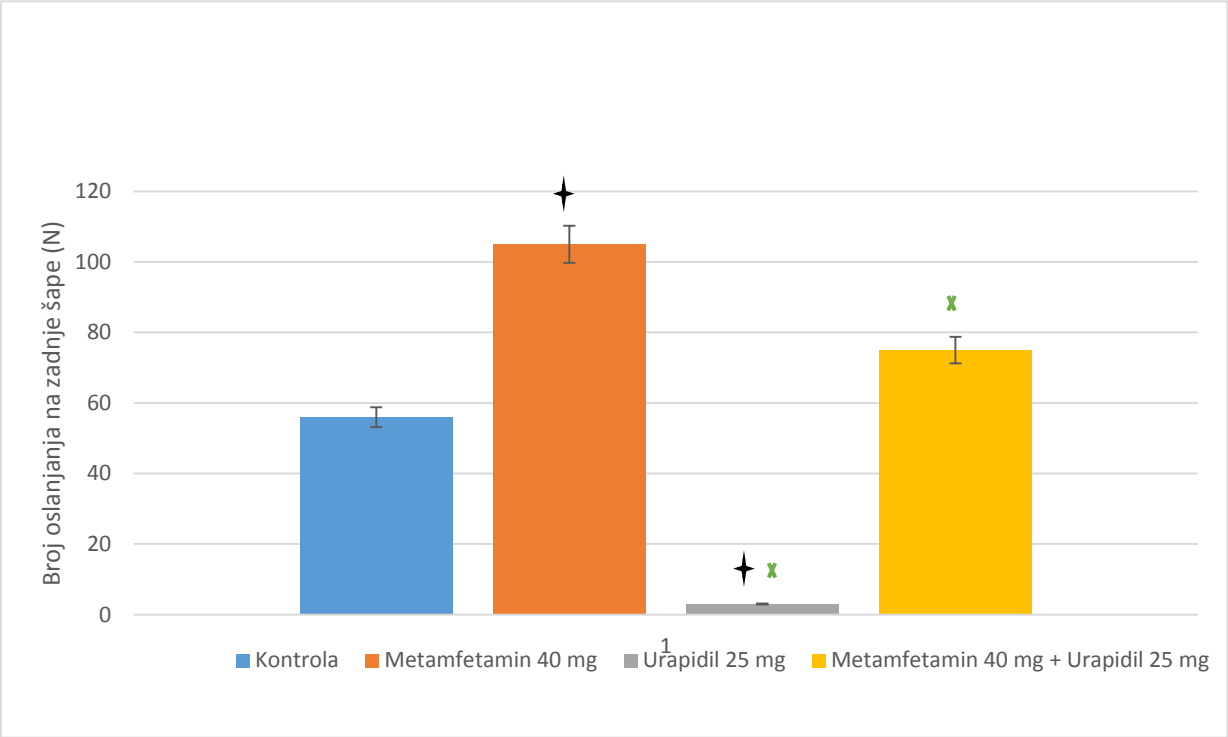


Slika 23. Horizontalna lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD vremena u pokretu u sekundama (sec) po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 25 mg/životinji i.p. i posttretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. nakon metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; x naspram metamfetamina; $P < 0.05$

d) *Oslanjanje na zadnje šape*

Određen je učinak najveće doze urapidila (25 mg), apliciranog 30 min nakon (posttretman) aplikacije metamfetamina. Vidljivo je da je posttretman urapidilom antagonizirao djelovanje metamfetamina. Metamfetamin očekivano povećava broj oslanjanja životinja na zadnje šape, dok, s druge strane, u primijenjenoj dozi urapidil značajno smanjuje broj oslanjanja na zadnje šape u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 24).

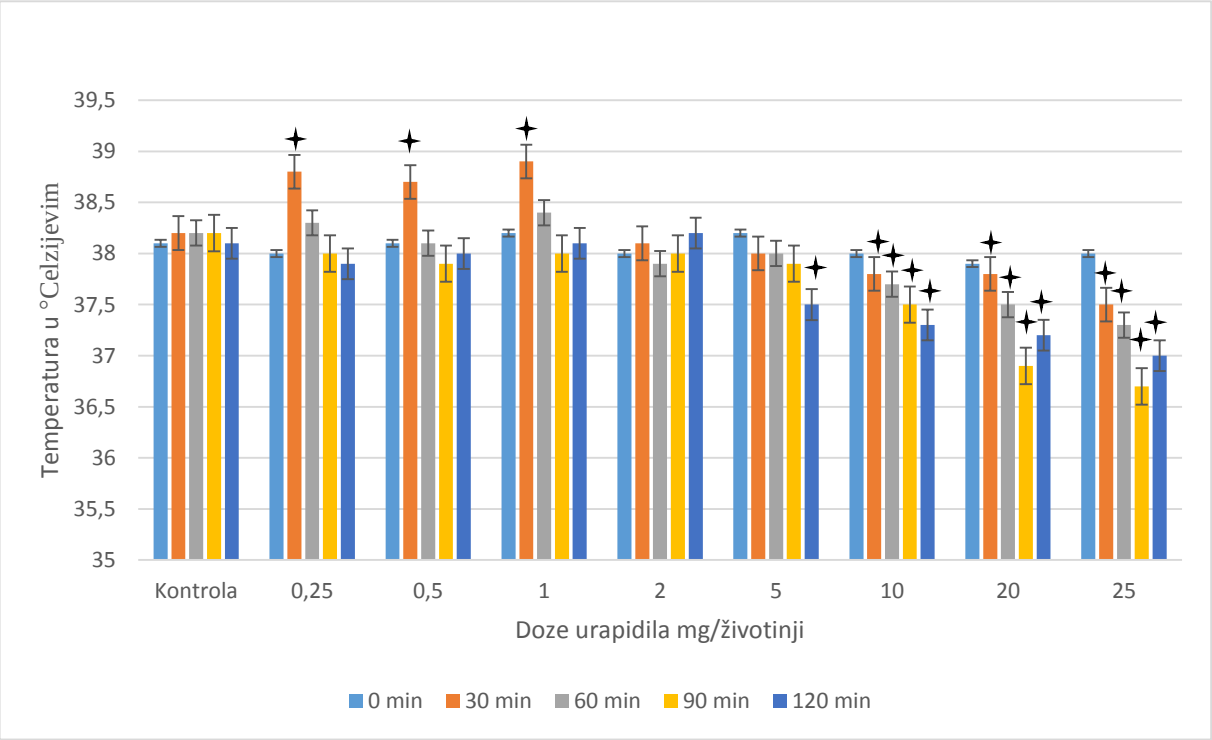


Slika 24. Vertikalna lokomotorna aktivnost izražena kao srednja vrijednost ± SD broja puta (N) oslanjanja na zadnje šape po grupama nakon 2 sata mjerena od trenutka aplikacije (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., urapidil 25 mg/životinji i.p. i posttretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. nakon metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; x naspram metamfetamina; $P < 0.05$

5.11. Učinak urapidila na tjelesnu temperaturu

Određen je učinak urapidila na tjelesnu temperaturu u vremenskim intervalima (0, 30, 60, 90 i 120 min) te je napravljena usporedba s kontrolnom skupinom. Vidljiva je sklonost urapidila da dovodi do pada tjelesne temperature, a ujedno je taj učinak izraženiji s većim dozama. Zanimljivo je da doze od 0.25, 0.5 i 1 mg urapidila unutar prvih 30 minuta dovode do značajnog povećanja temperature životinja u odnosu na kontrolnu skupinu, ali taj se učinak nakon 30 minuta gubi (Slika 25). Doze od 2 do 10 mg urapidila po životinji nemaju značajan učinak na tjelesnu temperaturu, dok doze od 15 do 25 mg značajno snižavaju temperaturu životinja, katkad čak i više od 1 °C.

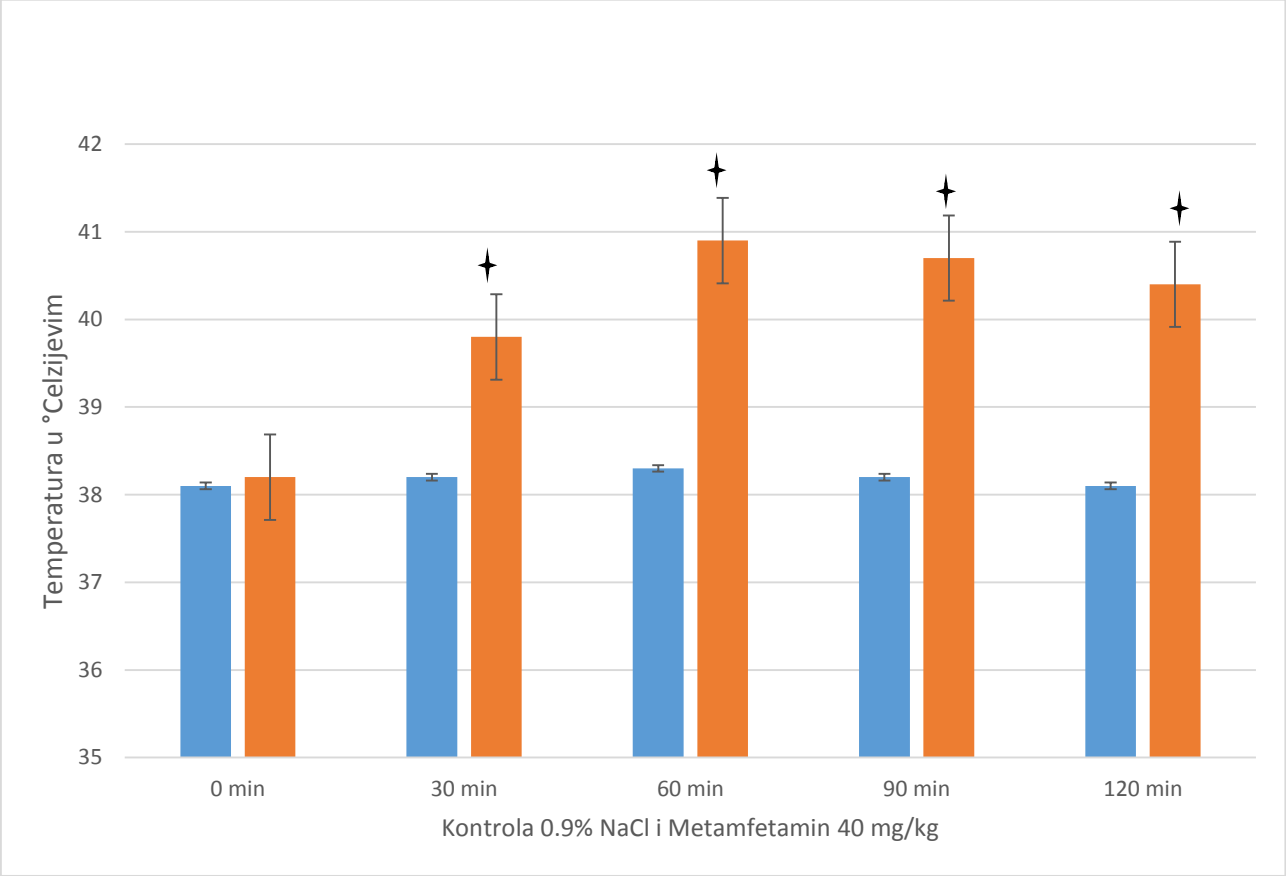


Slika 25. Učinak urapidila na tjelesnu temperaturu, izražen kao srednja vrijednost ± SD nakon aplikacije urapidila (0, 30, 60, 90 i 120 min) (kontrola – 0.9% NaCl i.p., urapidil 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 i 25 mg/životinji i.p.).

✦ naspram kontrole; $P < 0.05$

5.12. Učinak metamfetamina na tjelesnu temperaturu

Određen je učinak metamfetamina u vremenskim intervalima (0, 30, 60, 90 i 120 min) i napravljena je usporedba s kontrolnom grupom. Vidljivo je da metamfetamin odmah dovodi do povećanja i značajnog porasta tjelesne temperature koja katkad doseže i 41 °C (Slika 26).

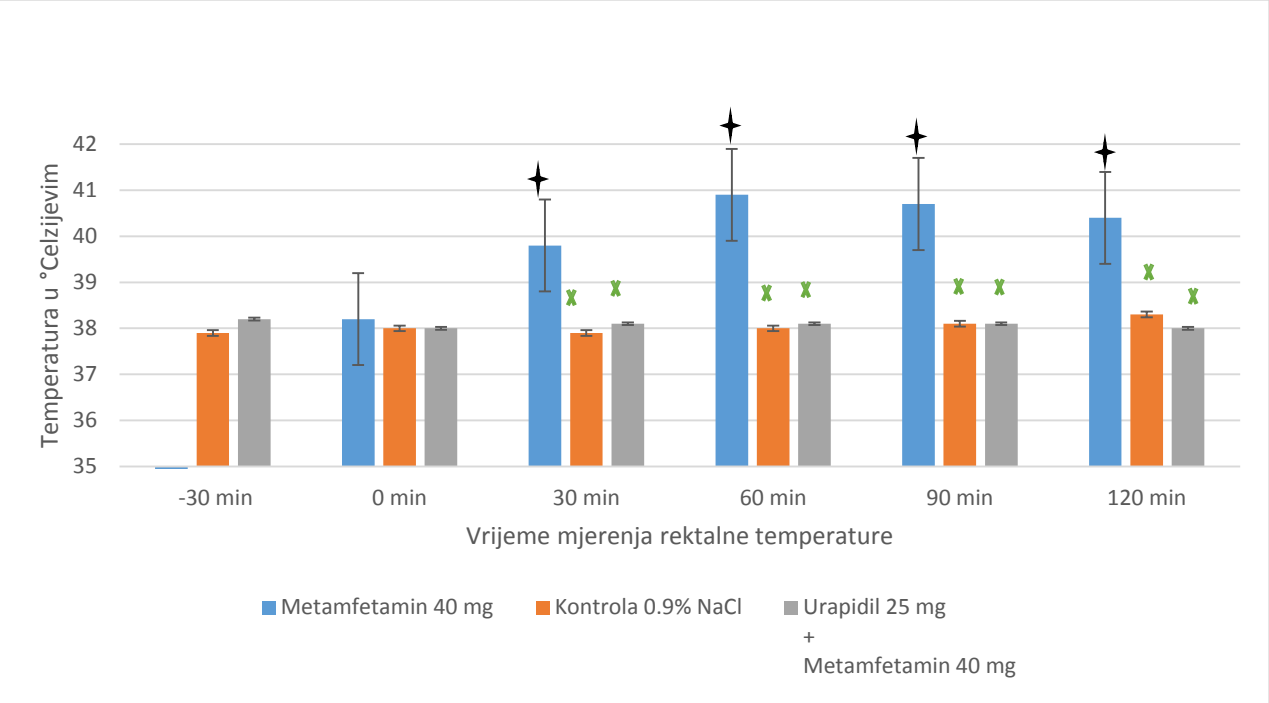


Slika 26. Učinak metamfetamina na tjelesnu temperaturu, izražen kao srednja vrijednost ± SD nakon aplikacije metamfetamina (0, 30, 60, 90 i 120 min) (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; $P < 0.05$

5.13. Učinak urapidila kao predtretmana metamfetaminu na tjelesnu temperaturu

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog »–30 min« prije (predtretman) aplikacije metamfetamina (0 min). Vidljivo je da je predtretman urapidilom spriječio djelovanje metamfetamina na temperaturu te ju je zadržao na razini kontrolne skupine. Učinak je kontinuiran i traje cijelo vrijeme ispitivanja (Slika 27).

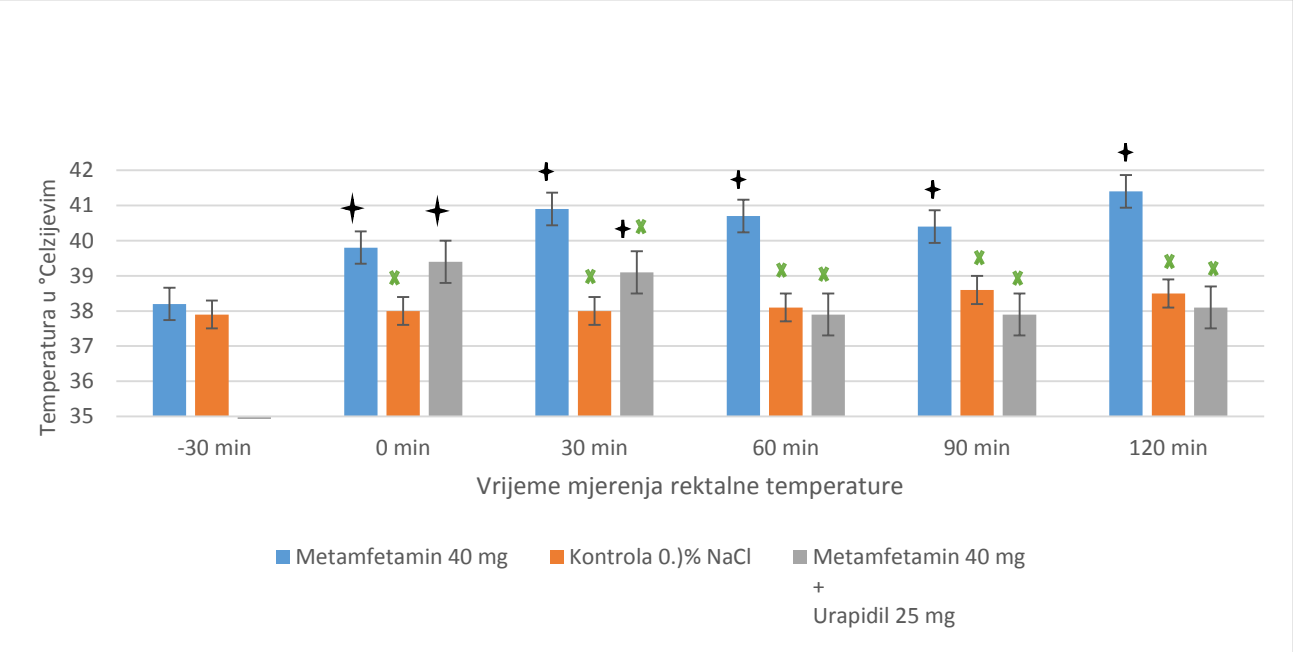


Slika 27. Učinak urapidila kao predtretmana metamfetaminu na tjelesnu temperaturu, izražen kao srednja vrijednost ± SD neposredno nakon aplikacije urapidila »– 30 min« (25 mg/životinji) te neposredno nakon aplikacije metamfetamina (0, 30, 60, 90 i 120 min) (kontrola – 0.9% NaCl i.p., metamfetamin 40 mg s.c., predtretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. prije metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; ✘ naspram metamfetamina; $P < 0.05$

5.14. Učinak urapidila kao posttretmana metamfetaminu na tjelesnu temperaturu

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min nakon (posttretman na »0 min«) aplikacije metamfetamina (– 30 min). Vidljivo je da je posttretman urapidilom dokinuo djelovanje metamfetamina na temperaturu te ju je za 1 sat vratio na razinu kontrolne skupine. Očito je da urapidil primijenjen kao posttretman može zaustaviti hipertermiju, ali je potrebno više vremena za nastanak učinka nego u predtretmanu (Slika 28).



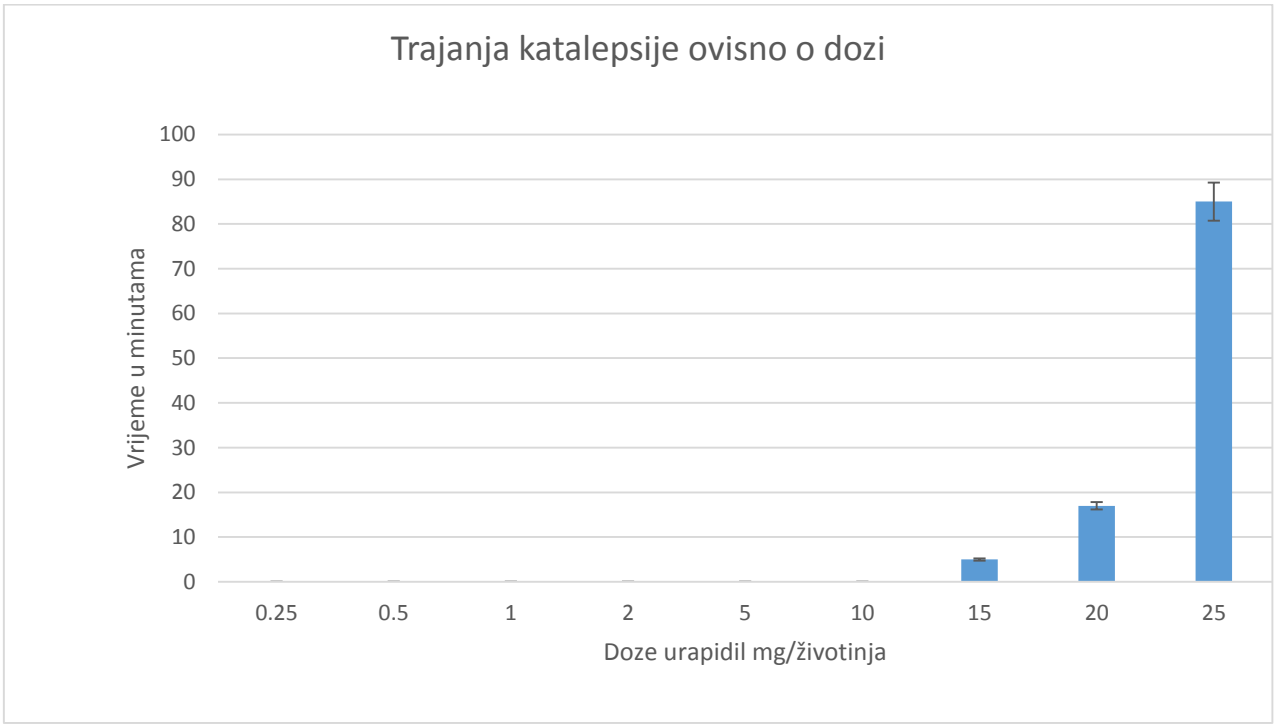
Slika 28. Učinak metamfetamina na tjelesnu temperaturu nakon posttretmana urapidilom, izražen kao srednja vrijednost ± SD neposredno nakon aplikacije urapidila »0 min« (25 mg/životinji) te neposredno nakon aplikacije metamfetamina (– 30, 0, 30, 60, 90 i 120 min) (kontrola – 0.9% NaCl i.p. na »– 30 min«, metamfetamin 40 mg s.c., posttretman 30 min s urapidil 25 mg/životinji i.p. nakon metamfetamina 40 mg s.c.).

✦ naspram kontrole; x naspram metamfetamina; $P < 0.05$

5.15. Učinak urapidila na izazivanje katalepsije ovisno o dozi

a) <u>Ukupno trajanje katalepsije</u>

Određen je učinak urapidila na trajanje katalepsije u trajanju od 2 sata u ovisnosti o primijenjenoj dozi. Vidljivo je da urapidil izaziva katalepsiju ovisno o dozi, odnosno njezino trajanje je dulje s povećanjem doze (Slika 29).



Slika 29. Učinak različitih doza urapidila na ukupno trajanje katalepsije izražen kao srednja vrijednost ± SD grupe nakon 2 sata od aplikacije (urapidil 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 i 25 mg/životinji i.p.).

b) <u>Bodovanje intenziteta katalepsije u vremenskim intervalima</u>

Određen je učinak urapidila ovisno o dozi na katalepsiju i napravljena je usporedba s kontrolnom skupinom (0, 30, 60, 90 i 120 min).Vidljivo je da doze od 15, 20 i 25 izazivaju katalepsiju koja je izraženija s povećanjem doze. Katalepsiju ne nalazimo kod zdravih životinja u fiziološkim uvjetima te je očekivano značajna razlika svih skupina u kojima se pojavila katalepsija u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 4).

Tablica 4. Intenzitet katalepsije (bodovanje 0–5 prema Costallu i sur., 1974.) ovisno o dozi urapidila i usporedba s kontrolom, izražen kao minimum / medijan / maksimum neposredno nakon aplikacije urapidila »0 min« (urapidil 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15 i 25 mg/životinji i.p., kontrola 0.9% NaCl i.p.), te mjeren unutar 2 sata na vremenskim točkama (0, 30, 60, 90 i 120 min).

	Vrijeme (točke mjerenja)				
Grupe	**0 min**	**30 min**	**60 min**	**90 min**	**120 min**
Kontrola	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
0.25 mg	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
0.5 mg	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
1 mg	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
2 mg	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
5 mg	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
10 mg	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
15 mg	0/0/0	**0/1/1**	**1/1/1***	**0/1/1***	**0/1/1***
20 mg	0/0/0	**0/1/2***	**1/1/3***	**1/1/2***	**0/0/1***
25 mg	0/0/0	**2/3/3***	**2/4/5***	**2/3/4***	**2/2/3***

*naspram kontrole; $P < 0.05$

0 = 0 min, 1 = 0.1–2.5 min, 2 = 2.6–5.0 min, 3 = 5.1–10.0 min, 4 = 10.1–20.0, 5 = >20.1

5.16. Učinak predtretmana urapidilom na stereotipije izazvane metamfetaminom

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min prije aplikacije metamfetamina. Vidljivo je da predtretman urapidilom značajno smanjuje potencijalno djelovanje metamfetamina na izazivanje stereotipija. Iskazani su i učinci samog metamfetamina koji očekivano izaziva značajne stereotipije (Tablica 5).

Tablica 5. Usporedba učinka urapidila (25 mg/životinji i.p.) na stereotipije, primijenjenog u predtretmanu (– 30 min) metamfetamina (40 mg/kg s.c.) s metamfetaminom (40 mg/kg s.c.) i kontrolom (0.9% NaCl i.p.) izraženom kao minimum / medijan / maksimum (bodovanje 0–4 prema Costallu i sur., 1973.) u ukupnom trajanju od 2 sata (mjerenje u vremenskim točkama (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min)) nakon aplikacije metamfetamina.

Vrijeme aplikacije	**Grupe**	**0 min**	**15 min**	**30 min**	**45 min**	**60 min**	**90 min**	**120 min**
0 min	Kontrola 0.9% NaCl i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
0 min	Metamfetamin 40 mg s.c.	0/0/0	0/1/2*	3/3/4*	3/4/4*	4/4/4*	4/4/4*	4/4/4*
Metamfetamin 0 min Urapidil – 30 min	Urapidil 25 mg i.p. (– 30 min) + Metamfetamin 40 mg s.c.	0/0/0	0/1/1*	1/1/1*¥	1/2/3*¥	2/2/2*¥	1/2/2*¥	0/1/1*¥

*naspram kontrole; ¥ naspram metamfetamina; $P < 0.05$

0 = ponašanje jednako normalnoj životinji, 1 = povremeno njuškanje, konstantno istraživanje okoline, 2 = kontinuirano njuškanje, povremeno istraživanje okoline, 3 = kontinuirano njuškanje, povremeno grizenje, glodanje ili lizanje (umivanje); vrlo kratki periodi lokomotorne aktivnosti, 4 = kontinuirano grizenje, glodanje ili lizanje (umivanje); bez lokomotorne aktivnosti

5.17. Učinak posttretmana urapidilom na stereotipije izazvane metamfetaminom

Određen je učinak najveće doze urapidila, apliciranog 30 min nakon aplikacije metamfetamina. Vidljivo je da posttretman urapidilom antagonizira djelovanje metamfetamina na izazivanje stereotipija, značajno ih smanjujući već 15 minuta nakon aplikacije. Iskazani su i učinci samog metamfetamina koji očekivano izaziva značajne stereotipije (Tablica 6).

Tablica 6. Usporedba učinka urapidila (25 mg/životinji i.p. aplicirano na 0 min) na stereotipije izazvane metamfetaminom (40 mg/kg s.c.) izraženom kao minimum/ medijan/ maksimum (bodovanje 0–4 prema Costallu i sur., 1973.) u ukupnom trajanju od 2 sata (mjerenje u vremenskim točkama: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min) nakon aplikacije urapidila.

Vrijeme aplikacije	**Grupe**	**0 min**	**15 min**	**30 min**	**45 min**	**60 min**	**90 min**	**120 min**
– 30 min	Kontrola 0.9% NaCl i.p.	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
– 30 min	Metamfetamin 40 mg s.c.	3/3/4*	3/4/4*	3/3/4*¥	3/4/4*¥	4/4/4*¥	4/4/4*¥	4/4/4*¥
Metamfetamin – 30 min Urapidil 0 min	Metamfetamin 40 mg + Urapidil 25 mg (+ 30 min)	3/3/4*	1/2/3*¥	1/2/3*¥	1/2/2*¥	1/2/2*¥	1/2/2*¥	1/1/1*¥

*naspram kontrole; ¥ naspram metamfetamina; $P < 0.05$

0 = ponašanje jednako normalnoj životinji, 1 = povremeno njuškanje, konstantno istraživanje okoline, 2 = kontinuirano njuškanje, povremeno istraživanje okoline, 3 = kontinuirano njuškanje, povremeno grizenje, glodanje ili lizanje (umivanje); vrlo kratki periodi lokomotorne aktivnosti, 4 = kontinuirano grizenje, glodanje ili lizanje (umivanje); bez lokomotorne aktivnosti

6. RASPRAVA

6.1. *IN VITRO* UČINCI

Jedan od ciljeva bio je istražiti potencijalno neuroprotektivno djelovanje urapidila na dopaminergičkim stanicama PC12. Stanice PC12 mogu proizvoditi i otpuštati dopamin, te se često koriste u proučavanju metamfetaminom izazvane neurotoksičnosti (Hom i sur., 1997., Uemura i sur,. 2003., Lazzari i sur., 2006., Wu i sur., 2015., Li i sur., 2016.). Prema literaturnim navodima, nediferencirane stanice PC12 eksprimiraju D2 i D4 receptore za dopamin (Pothos i sur., 1998.). Primjenom MTT testa kojim se preživljenje određuje na temelju aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza, nije utvrđeno da urapidil može zaštititi stanice PC12 od metamfetaminom izazvane stanične smrti. Isti rezultat dobiven je i na stanicama SH-SY5Y, također dopaminergičkoj staničnoj liniji koja eksprimira receptore D2 i D3 (Presgraves i sur., 2004.).

Očekivano, u ovisnosti o koncentraciji, metamfetamin primijenjen tijekom 24 sata smanjio je preživljenje stanica PC12. U pojedinačnim eksperimentima, ovisno o brzini i fazi rasta, kao i o drugim nedefiniranim eksperimentalnim uvjetima, 0.6 mM metamfetamin je uobičajeno smanjio preživljenje stanica PC12 na 30–50% kontrolne vrijednosti. Treba istaknuti da se koncentracije pri kojima je postignuto značajno neurotoksično djelovanje metamfetamina razlikuju u pojedinim istraživanjima, što se vjerojatno može pripisati različitom stupnju ekspresije tirozin hidroksilaze i endogene razine dopamina, broju pasaža, kao i razlikama u uvjetima uzgoja stanica u kulturi (ponajprije vrsti medija i kombinaciji korištenih seruma). Tako su Lazzari i sur. (2006.) utvrdili da metamfetamin primijenjen u 100 μM koncentraciji u potpunosti dokida preživljenje stanica PC12. U istraživanjima koja su proveli Wu i sur. (2015.) te Lv i sur. (2013.), metamfetamin je u 2 mM koncentraciji smanjio preživljenje stanica PC12 na 50% u usporedbi s kontrolom, dok je u istraživanju Uemure i sur. (2003.) nakon 24 sata tretmana 3 mM metamfetaminom još uvijek preživjelo 63% stanica. Smanjenje preživljenja za 40% Li i sur. (2012.) postigli su sa 1.5 mM metamfetaminom primijenjenim tijekom 24 sata.

Smanjenje vijabilnosti, u tim uvjetima, bilo je popraćeno promjenama morfologije stanica PC12. To se primarno odnosi na skraćivanje neuronalnih izdanaka i zaokruživanje tijela neurona. Značajno smanjenje duljine neurita, odnosno gotovo sferičan oblik stanica PC12 nakon tretmana metamfetaminom opisali su i drugi autori (Li i sur., 2012., Wu i sur., 2015.).

Značajan dio toksičnog djelovanja metamfetamina pripisuje se povećanom stvaranju RKV-a (Hom i sur., 1997.). U skladu s tim, i sada je izlaganje metamfetaminu dovelo do porasta RKV-a od 180%. Izražen intenzitet porasta RKV-a pri koncentraciji koja dovodi do jednakog smanjenja preživljenja pokazali su i Wu i sur. (2015.). U njihovu istraživanju 2 mM

koncentracija smanjila je preživljenje na 45% uz porast RKV-a od približno 100%. U drugom istraživanju, stanice PC12 tretirane su 0.1 mM metamfetaminom tijekom 4 dana (u prisutnosti 0.5 mM kinurenata), što je smanjilo preživljenje za 34% i udvostručilo količinu unutarstaničnih RKV-a (Hom i sur., 1997.). Na dopaminergičkim SH-SY5Y stanicama neuroblastoma pokazano je da vitamin E, vrlo učinkovit antioksidans, može smanjiti metamfetaminom izazvan porast nakupljanja RKV-a i apoptozu (Wu i sur., 2007.). Također, predtretman s vitaminom C smanjio je pojačanu proizvodnju RKV-a i neurotoksični učinak metamfetamina u miješanoj kulturi neurona i glija stanica (Huang i sur., 2012.). Protektivno djelovanje antioksidansa poput selena i melatonina pokazano je i na animalnim modelima, i bilo je povezano sa smanjenim stvaranjem reaktivnih dušikovih vrsta i nitrozilacijom proteina (Imam i sur., 2001.). Kod tog je istraživanja kvercetin, vrlo potentni antioksidans i hvatač slobodnih radikala polifenolne strukture, doveo do značajnog smanjenja nakupljanja RKV-a, što je za posljedicu imalo smanjenje citotoksičnog učinka metamfetamina, potvrđujući tako štetni učinak oksidacijskog stresa na preživljenje dopaminergičkih stanica izloženih metamfetaminu.

Uz povećano nakupljanje RKV-a, jedno od obilježja stanične smrti izazvane metamfetaminom jest aktivacija kaspaza. U skladu s tim, tretman metamfetaminom izazvao je velik porast u aktivnosti kaspaza. Druga su istraživanja također pokazala da je metamfetaminom izazvana apoptoza na stanicama PC12 povezana s aktivacijom kaspaze-3. Tako su npr. Li i sur. (2016.) Western blot metodom pokazali porast u ekspresiji aktivirane kaspaze-3 od 3.79 puta, dok je u istraživanju Huanga i sur. (2015.) nakon 24 sata tretmana sa 3 mM metamfetaminom istom metodom utvrđen porast ekspresije cijepanih kaspaza-3 više od 6 puta (Huang i sur., 2015.). Slični intenzitet promjena isti su autori pokazali i na stanicama SH-SY5Y tretiranima metamfetaminom. Mjerenjem aktivnosti kaspaze-3, Lv i sur. (2013.) nakon tretmana metamfetaminom utvrdili su pad preživljenja na 50% i porast aktivnosti kaspaza od približno 130%. Na stanicama SH-SY5Y tretman 2 mM metamfetaminom smanjio je preživljenje na 83%, uz istovremeni porast ekspresije cijepane kaspaze-3 za 41% (Wisessmith i sur., 2009.). Chen i sur. (2016.) pokazali su i karakteristične apoptotske promjene na stanicama SH-SY5Y, što uključuje aktivaciju mitohondrijalnog puta oslobađanjem citokroma c u citoplazmu, porast aktiviranog oblika kaspaze-3, te povišenu ekspresiju proapoptotskog proteina Bax i PARP-a.

Ipak, treba istaknuti da u nekim istraživanjima stanična smrt izazvana metamfetaminom nije imala karakteristična obilježja apoptoze (Uemura i sur., 2003., Nara i sur., 2010.). U jednom od istraživanja, stanice PC12 tretirane metamfetaminom nisu pokazivale ni morfološka

ni biokemijska obilježja apoptoze, iako je smrt stanica spriječena u prisutnosti inhibitora kaspaza (Uemura i sur., 2003.). Kasnije je pokazano da tretman metamfetaminom može istovremeno izazvati i apoptozu i autofagiju na staničnim modelima neurotoksičnosti izazvane metamfetaminom, uključujući i stanice PC12 (Castino i sur., 2008., Li i sur., 2012., Li i sur., 2016.). Bojenjem s aneksinom V i propidij jodidom, Li i sur. (2012.) pokazali su da pri smanjenju preživljenja od 40% ima približno 55% apoptotičkih stanica, dok su Zhang i sur. (2013.) primjenom iste metode utvrdili 22% apoptotičnih stanica PC12 pri smanjenju preživljenja od približno 50%. U prisutnosti 3 mM metamfetamina Huang i sur. (2015.) detektirali su tek 14% stanica u apoptozi, a Chen i sur. (2016.) njih 17.5%, uz dvostruki porast ekspresije aktiviranog oblika kaspaze-3 prema Western analizi. Premda u ovom istraživanju nismo odredili udio apoptotičnih stanica, posebno je zanimljiv rezultat da je urapidil primijenjen istovremeno s metamfetaminom izrazito smanjio aktivnost kaspaza-3/7 bez učinka na preživljenje. Sposobnost urapidila da inhibira aktivnost kaspaza s jedne strane predstavlja velik potencijal za daljnja istraživanja, dok s druge strane upućuje na zaključak da porast aktivacije kaspaza-3/7 nije presudan za odumiranje stanica PC12, jer vraćanje aktivnosti kaspaza na vrijednosti jednake onima u kontrolnoj skupini nije imalo protektivno djelovanje. To bi moglo značiti da u ovim eksperimentalnim uvjetima procesi povezani s aktivacijom autofagije imaju ključnu ulogu u odumiranju stanica PC12. Također, budući da pri istim uvjetima urapidil nije smanjio nakupljanje RKV-a, iako je u potpunosti blokirao aktivaciju kaspaza-3/7, to dodatno navodi na zaključak da RKV-e nisu isključivo odgovorne za aktivaciju kaspaza 3 i 7, nego da u tome veliku ulogu imaju unutarstanični signalni putevi koji nisu direktno vezani uz promjenu redoks potencijala u stanicama.

Većina antipsihotika su antagonisti dopamina. Antagonisti dopaminskih receptora *in vivo* mogu smanjiti neurotoksično djelovanje metamfetamina, smanjivanjem otpuštanja dopamina i sprječavanjem njegovoga povratnog unosa (Ares-Santos i sur., 2013.). Tako je kvetiapin, lijek iz skupine atipičnih antipsihotika, smanjio metamfetaminom izazvana oštećenja dopaminergičkih živčanih završetaka (He i sur., 2006.). Također, treba istaknuti da i agonisti dopamina mogu imati protektivno djelovanje. Na primjer, pokazano je da amorfin, lijek koji se koristi u liječenju Parkinsonove bolesti, *in vivo* može smanjiti toksični učinak dopamina, iako je najvjerojatnije taj učinak bio povezan s antioksidacijskim mehanizmom i sposobnošću hvatanja slobodnih radikala, a ne s agonističkim djelovanjem vezanim uz dopaminergički sustav, jer protektivni učinak nije bio dokinut s dopaminskim antagonistom haloperidolom (Fornai i sur., 2001.). Isti su autori pokazali da predtretman haloperidolom smanjuje metamfetaminom izazvan gubitak dopamina u strijatumu. U ovom istraživanju, haloperidol

primijenjen u visokoj koncentraciji (100 μM) izazvao je značajno smanjenje preživljenja stanica PC12, iako toksični učinak nije bio vidljiv u prisutnosti metamfetamina. Uzevši u obzir neuroprotektivni trend primijećen pri 10 puta manjoj koncentraciji, moguće je da takav rezultat zapravo odražava djelomično protektivno djelovanje haloperidola i u ovim uvjetima.

6.2. *IN VIVO* UČINCI

6.2.1. Testovi hipertermije

Hipertermija uzrokovana metamfetaminom važan je pokazatelj neurotoksičnosti (Bowyer i sur., 1992., Bowyer, 1994.). Uvjeti i spojevi koji inhibiraju ili potiču hipertermiju uzrokovanu metamfetaminom jednako tako utječu na smanjenje razine dopamina i tirozin hidroksilaze u dorzalnom strijatumu (*nucleus caudatus*, *putamen*) (Bowyer i sur., 1992., Bowyer, 1994.). Kada kod štakora tjelesna temperatura prijeđe 41.5 °C, drži se da dolazi do nepovratnog oštećenja monoaminergičkih živčanih završetaka te da se tada više ne može utjecati na neurotoksičnost (Bowyer i sur., 1995.). Iako neurotoksičnost i hipertermija uzrokovane metamfetaminom direktno koreliraju, preduvjet neuroprotektivnog djelovanja ispitivanih tvari nije snižavanje tjelesne temperature (Cappon i sur., 1996.). Hipertermija uzrokovana metamfetaminom posredovana je σ receptorima koji se nalaze u hipotalamusu i moduliraju tjelesnu temperaturu (Gundlach i sur., 1986., Rawls i sur., 2002.). Ipak, kod primjene urapidila, najznačajniji učinak na temperaturu ostvaruje se preko serotonergičkog sustava agonizacijom 5-HT1a receptora, jer njihovom aktivacijom dolazi do pada krvnog tlaka i rasipanja energije preko kože (Ootsuka i sur., 2006., Rusyniak i sur., 2006.). U skladu s time da urapidil ima učinak ovisan o dozi na 5-HT1a receptore (Sanders i sur., 1988.), razumljiv je trend u kojem urapidil u dozama od 2 do 25 mg gradacijski značajno snižava tjelesnu temperaturu. Zanimljivo je da u dozama od 0.25 do 1 mg po životinji urapidil dovodi do povećanja tjelesne temperature, ali samo unutar 30 min. Taj kratkotrajni učinak vrlo je vjerojatno posljedica djelovanja na dopaminergički sustav jer urapidil i povećava dopaminergičku neurotransmisiju (Pugsley i sur., 1986., Jackisch i sur., 1987., Singer i sur., 1989.). S druge strane, očito nije došla do izražaja značajna blokada dopaminskih receptora u tim dozama koja bi bila dovoljna da zaustavi djelovanje izlučenog dopamina jer, prema radovima, urapidil posjeduje umjeren afinitet za D2 receptore (Kellar i sur., 1984., Pugsley i sur. 1986.). Dodatno, vjerojatno u tom vremenskom okviru nije došlo do dovoljno potentne agonizacije 5-HT1a receptora, koja bi dovela do spuštanja tjelesne temperature. To je u skladu s opažanjima Schoetensacka i suradnika (1977.) da urapidil nema učinak na kardiovaskularni sustav štakora kada se primijeni peroralno do 80 mg/kg, ali da od

10 mg/kg značajno snižava tjelesnu temperaturu. Važno je naglasiti da u kombinaciji s metamfetaminom urapidil, primijenjen u dozi od 25 mg, kao predtretman ima sposobnost sprječavanja porasta temperature, a kao posttretman vraća povišenu tjelesnu temperaturu na normalnu razinu. S jedne strane, logično je pretpostaviti da u toj dozi urapidil dovodi do značajne blokade dopaminskih receptora i tako zaustavlja djelovanje otpuštenog dopamina. S druge strane, sprječavanju porasta pridonosi i snažna agonizacija 5-HT1a receptora u toj dozi.

Povezanost učinka urapidila na *in vitro* preživljenje stanica nakon primjene metamfetamina i *in vivo* sniženje temperature vjerojatno ne postoji. Urapidil snižava tjelesnu temperaturu, antagonizira učinke metamfetamina, ali ne pridonosi preživljenju PC12 i SH-SY5Y stanica tretiranih metamfetaminom. Iako hipertermija i smrt stanica izazvana metamfetaminom koreliraju, kod urapidila to očito nije slučaj. Takav rezultat je u skladu s prethodnim spoznajama da tvar koja dovodi do snižavanja tjelesne temperature, ne mora imati neuroprotektivni učinak nakon tretmana metamfetaminom (Cappon i sur., 1996.). Može se pretpostaviti da bi u kliničkoj praksi urapidil djelovao na hipertermiju izazvanu metamfetaminom i time vjerojatno umanjio štetne posljedice same hipertermije, ali ne bi značajno umanjio neurotoksičan učinak metamfetamina.

6.2.2. Testovi lokomotorne aktivnosti

Sustavi koji značajno povećavaju lokomotornu aktivnost kod životinja su dopaminergički i glutaminergički. Aktivacija dopaminergičkog sustava i pojačana lokomotorna aktivnost mogu se potaknuti primjenom direktnih (apomorfin) i indirektnih agonista (amfetamin, metamfetamin) stvaranja dopamina, a i blokatora ponovnog unosa dopamina u stanicu (kokaina). Glutamatergički sustav može se aktivirati antagonistima NMDA receptora (MK801).

Obrazac koji pokazuje urapidil je da gradacijsko povećanje doze dovodi do gradacijskog smanjenja lokomotorne aktivnosti i, na kraju, do njezinog prestanka. Interesantno je da niske doze urapidila, od 0.25 do 1 mg, povećavaju lokomotornu aktivnost gotovo u svim ispitivanim parametrima. Da bi se razjasnio taj učinak, potrebno je naglasiti da hiperlokomocija sama po sebi nije abnormalno ponašanje, ako je riječ o hodu prema naprijed. Suprotno tome, hod unatrag, na sva četiri ekstremiteta i kruženje oko stražnjih šapa u bilo kojem smjeru pripadaju abnormalnom ponašanju (Taylor i sur., 1974.). Prema karakteristikama, hiperlokomocija kod urapidila ne svrstava se u abnormalno ponašanje jer nema hoda unatrag. Takav se oblik lokomotorne aktivnosti i ponašanja viđa kod primjene metamfetamina, ali uvijek uz stereotipije,

i ovisan je o primijenjenoj dozi (Curzon i sur., 1979.). Urapidil ni u jednoj ispitivanoj dozi nije izazvao stereotipije. Moguće je da je povećanje lokomocije kod primjene niskih doza urapidila posljedica povećane dopaminergičke neurotransmisije (Pugsley i sur., 1986., Jackisch i sur., 1987., Singer i sur., 1989.). Ipak, s obzirom na to da je urapidil agonist 5-HT1a receptora, moguće je da je aktivacija serotonergičkog sustava pridonijela povećanju lokomocije. U prilog tome ide i podatak da agonizacija 5-HT1a receptora može biti uključena u povećanje lokomocije (Kalkman i sur., 1990.), putem intrinzičkoga aktivacijskog učinka (Evenden i sur., 2012.). Ono što dovodi u pitanje takvu pretpostavku jest ovisnost o dozi opisanog učinka, što nije slučaj kod urapidila, jer učinak urapidila na lokomotornu aktivnost raste do primijenjene doze od 1 mg, a zatim značajno opada. Dodatno, urapidil pripada u potentne agoniste 5-HT1a receptora te je logično pretpostaviti da bi se povećavanjem doze povećala lokomotorna aktivnost, jer dolazi do povećanog vezanja za 5-HT1a receptore. Agonizacija 5-HT1a receptora urapidilom najvjerojatnije samostalno nema bitan učinak na cijeli obrazac lokomocije jer pri većim dozama dolazi do značajne hipolokomocije u odnosu na kontrolnu skupinu.

Uzimajući u obzir sva opisana djelovanja urapidila, najvjerojatnija pretpostavka je da u niskim dozama dolazi do povećane dopaminergičke i serotonergičke transmisije, što sinergistički dovodi do povećanja lokomocije.

Potrebno je razjasniti mogućnost urapidila da na lokomociju utječe aktivacijom adrenergičkog sustava. Općenito, urapidil djeluje kao antagonist; selektivno i značajno na postsinaptičke alfa 1 adrenoreceptore, vrlo slabo na postsinaptičke alfa 2 receptore, i umjereno, ali selektivno na beta 1 adrenoreceptore (van Zwieten i sur., 1985.). Studije pokazuju da selektivno blokiranje alfa receptora (ali samo u povećanim dozama ispitivanih blokatora prazosina i idazoksana) dovodi do hipolokomocije (Stuchlik i sur., 2004.). U kombinaciji s amfetaminom i apomorfinom, predtretman s prazosinom (selektivni blokator alfa 1 receptora) doveo je do smanjenja lokomocije, dok je predtretman s idazoksanom (selektivni blokator alfa 2 receptora) čak malo i povećao lokomotornu aktivnost (Dickinson i sur., 1989.). Beta 1 receptori samostalno vjerojatno nemaju nikakvu značajnu ulogu u lokomociji, ali mogu imati sinergistički učinak uz dominantno djelovanje na serotonergički sustav, čije se djelovanje ostvaruje agonizacijom 5-HT1a receptora (Kalkman, 1990.) S druge strane, zajednička primjena alfa 1 blokatora prazosina i D2 blokatora sulpirida dovodi do značajnog poremećaja lokomocije, koji nije viđen kada se primijene samostalno (Stuchlik i sur., 2008.). Zaključno se može reći da hiperlokomocija i hipolokomocija viđene kod primjene urapidila najvjerojatnije nisu posredovane adrenergičkim sustavom.

Ukupan učinak ovisan o dozi na sva 4 parametra lokomocije pokazuje da urapidil izaziva promjene svojstvene prvoj (tipični), drugoj (atipični) i trećoj (parcijalni agonisti dopamina) generaciji neuroleptika. Svi neuroleptici značajno inhibiraju spontanu lokomotornu aktivnost putem dopaminergičkog sustava, većinom blokiranjem D2 receptora (Schaefer i sur., 1984., Kolackowski i sur., 2014.). S druge strane, metamfetamin očekivano značajno povećava lokomotornu aktivnost dovodeći do hiperlokomocije životinja (Wallace i sur., 1999., Riviere i sur., 1999., Hall i sur., 2008.). Učinak je posljedica pojačanog oslobađanja dopamina iz vezikula. Ključnu ulogu za lokomotorni i bihevioralni učinak kod akutne primjene metamfetamina imaju DAT i VMAT2 koji gube svoju funkciju zbog direktno toksičnog djelovanja metamfetamina i produljene aktivacije dopaminergičkog sustava (Riddle i sur., 2006.). Kod učinka na lokomociju potvrđena je aktivnost D2 receptora jer se kod *knock-out* životinja za D2 receptor učinak gubi (Bay-Richter i sur., 2013.).

Kombinacija metamfetamina i urapidila (predtretman i posttretman) pokazuje da urapidil u dozi od 25 mg kao predtretman sprječava djelovanje metamfetamina, dok kao posttretman antagonizira učinak metamfetamina u svim ispitivanim parametrima lokomocije. Vrlo značajno je da doza od 25 mg urapidila kao predtretman i posttretman održava ili vraća lokomociju na razinu kontrolne grupe. Doza metamfetamina od 40 mg/kg s.c. kod životinja se svrstava u jako visoku i toksičnu dozu te svoj učinak iskazuje vrlo brzo (Cappon i sur., 2000.). Vrijeme promatranja od 2 sata dovoljno je da metamfetamin iskaže sve svoje učinke i pokrene hiperlokomociju, a da ne dovede do značajnoga neurotoksičnog oštećenja u kojem bi životinje izgubile sposobnost kretanja. Antagonizacija hiperlokomocije izazvana direktnim i indirektnim agonistima dopamina čini klasičan farmakološki model ispitivanja neuroleptičkih svojstava spoja jer ima dobru prediktivnu valjanost (Moreira i sur., 2005., Leite i sur., 2008., Castagne i sur., 2009, Gobira i sur., 2013.).

Kvalitetna karakteristika urapidila da u predtretmanu i posttretmanu antagonizira djelovanje metamfetamina u sva 4 ispitivana parametra nakon jednokratne primjene je jako interesantna, jer neurolepticima katkad trebaju tjedni i višekratna primjena da bi iskazali takav antagonizacijski učinak na hiperlokomociju (npr. risperidon (Marchese i sur., 2009.)). Ovaj *in vivo* učinak urapidila koji zaustavlja hiperlokomociju izazvanu metamfetaminom najvjerojatnije je posredovan blokadom dopaminskih receptora, što je u skladu s prethodnim *ex vivo* spoznajama da se urapidil veže za D2 receptore (Kellar i sur., 1984., Pugsley i sur. 1986.).

6.2.3. Testovi katalepsije

Rezultati pokazuju da povećavajući dozu urapidila, u štakora dolazi do pojave katalepsije (Slika 29). Katalepsija dugog trajanja, u pojedinim slučajevima i dulje od 20 min, javlja se u dozi od 25 mg urapidila. S obzirom na to da je test katalepsije visoke prediktivne valjanosti, koristi se i danas (Jantschak i sur., 2013.) kao tipičan i uspješan indikator potencijalnih neuroleptičkih karakteristika novih lijekova (Greenblat i sur., 1980.). Najčešći razlog korištenja testa je procjena sposobnosti neke tvari za poticanje ekstrapiramidalnih nuspojava (Hoffman i sur., 1995.). Općenito, doze koje su potrebne da izazovu katalepsiju su one kod kojih je zauzeto oko 80% D2 receptora u strijatumu, što je više nego za neuroleptički učinak, koji uglavnom zahtijeva oko 65–70% zauzetosti receptora (Wadenberg i sur., 2010.). Ovisno o spojevima, razlika u dozi potrebna da bi se izazvala katalepsija i neuroleptički učinak varira u rasponu od vrlo male, kao što je slučaj za haloperidol, do vrlo visoke, kao za klozapin (Gerlach i sur., 1991., Moreira i sur., 2005.). S druge strane, doze neuroleptika potrebne za izazivanje katalepsije kod životinja dobro koreliraju s dozama koje izazivaju ekstrapiramidalne nuspojave kod ljudi (Gerlach i sur., 1991.). Važno je napomenuti da u našem istraživanju ni jedna životinja kojoj je apliciran urapidil nakon 24 sata nije imala vidljive znakove djelovanja tog lijeka. To je u skladu s LD50 koji iznosi između 720 i 960 mg/kg, nakon osmosatne primjene (Schoetensack i sur., 1983.). Iz prikazanih rezultata (Slika 29), može se zaključiti da urapidil ima kataleptička svojstva ovisna o dozi, koja su svojstvena neurolepticima (npr. haloperidol, klozapin, olanzapin (Ananth i sur., 2001., Bricker i sur., 2014.)), te da učinke ostvaruje najvjerojatnije blokirajući dopaminske (D2) receptore u strijatumu (Wadenberg i sur., 2010.).

6.2.4. Testovi stereotipije

Stereotipija sa svim karakterističnim znakovima izazvana je primjenom metamfetamina 40 mg/kg s.c. te je napravljena usporedba s urapidilom u dozi od 25 mg, primijenjenim kao predtretman i posttretman metamfetaminu. U oba slučaja urapidil je značajno smanjio, a katkad i potpuno ukinuo sve znakove stereotipnog ponašanja. Poznato je da stereotipije uzrokovane metamfetaminom mogu biti posredovane serotonergičkim ili dopaminergičkim sustavom. Dignut rep, adukcija stražnjih šapa, tapkanje prednjim nogama te mahanje glavom simptomi su

ovisni o oslobađanju serotonina, a dizanje na stražnje noge, grizenje, lizanje i hodanje unaprijed ponašanja su ovisna o oslobađanju dopamina. Hodanje unatrag, kruženje i okretanje oko stražnjih šapa vrlo su karakteristični za stereotipiju, ali nisu isključivo ovisni o utjecaju na serotonergički, odnosno dopaminergički sustav (Curzon i sur., 1979.). S obzirom na to da je poznato da urapidil djeluje aktivirajući 5-HT1a receptore, nije za pretpostaviti da taj učinak pridonosi smanjenju metamfetaminskog djelovanja jer bi se očekivao sinergistički učinak na stereotipije. S druge strane, najznačajnija promjena vidljiva je u ponašanju koje je ovisno o dopaminergičkom sustavu, kao što su glodanje i lizanje (umivanje) te hod prema unatrag i kruženje oko stražnjih šapa. To dodatno potvrđuje učinak urapidila putem dopaminergičkog sustava. Ono što je zanimljivo i opaženo jest da su promjene ovisne o dopaminu (hod naprijed, grizenje, glodanje, lizanje (umivanje)) pojačane kod niskih doza urapidila (0.25, 0.5 i 1 mg), ali one se gube gradacijski prema većim dozama. Naime, spojevi koji posjeduju balansirani učinak agonizacije 5-HT1a receptora i antagonizacije D2 receptora učinkoviti su neuroleptici koji imaju malu sklonost izazivanja ekstrapiramidnih nuspojava i metaboličke disfunkcije u ljudi. Takvi spojevi u literaturi se nazivaju »selektivno neselektivnim lijekovima« koji ostvaruju svoj učinak vežući se za receptore odgovorne za neuroleptički učinak, ali ne i na mjestima odgovornima za nuspojave. Neuroleptici (npr. klozapin, ziprasidon, aripiprazol, brekspiprazol) za učinak trebaju aktivirati 5-HT1a receptore da bi došlo do otpuštanja dopamina u korteksu. Važno je napomenuti da je taj učinak selektivan i vidljiv samo u frontalnoj kortikalnoj regiji mozga, a ne i u strijatumu i *nucleusu accumbensu* (Newman i sur., 2011.).

6.2.5. *In vitro* i *in vivo*

Nakon provedenih *in vitro* testiranja, pokazano je da urapidil ne može zaštititi PC12 stanice (eksprimiraju D2 i D4 autoreceptore iz D2-slične porodice receptora, tirozin hidroksilazu, prijenosnik za dopamin i VMAT-2), ni SH-SY5Y stanice (posjeduju i plazmatski i vezikularni prijenosnik za dopamin, eksprimiraju enzime za sintezu i metabolizam dopamina, te D2 i D3 receptore), nakon neurotoksičnog tretmana metamfetaminom. Raščlanjujući, testovi nakupljanja unutarstaničnih RKV-a pokazuju da urapidil ne djeluje antioksidacijski (kao što je, na primjer, pokazano za kvercetin) kako bi zaustavio pojačanu depleciju dopamina i stvaranje RKV-a koji su posljedica tretmana metamfetaminom. Pretpostavljena hipoteza da urapidil svoja svojstva iskazuje blokadom D2 nije isključena ovim testiranjima jer se zaustavljanje stanične smrti ne ostvaruje isključivo blokadom D2 receptora. Dapače, vidljivo je da haloperidol primijenjen u koncentraciji od 100 μM izaziva značajno smanjenje preživljenja stanica PC12.

Ipak, treba napomenuti da haloperidol ima tendenciju neuroprotekcije jer u dozi od 10 μM zaustavlja propadanje stanica izazvano metamfetaminom, premda učinak nije značajan. Treba također napomenuti da različita tendencija djelovanja haloperidola i urapidila na metamfetaminom izazvanu toksičnost u *in vitro* sustavu svoj uzrok ima u činjenici da haloperidol ima vrlo jak afinitet za D2 receptore, a urapidil slab do umjeren (Kellar i sur., 1984.). Najzanimljiviji rezultat jest da urapidil primijenjen istovremeno s metamfetaminom izrazito smanjuje aktivnost kaspaza-3/7 (glavne efektorske kaspaze mitohondrijskog puta), ali ni to nije dovoljno da u testiranim koncentracijama zaustavi propadanje stanica. Iz *in vitro* rezultata vidljivo je da urapidil ne može zaustaviti neurotoksičnost izazvanu metamfetaminom, premda *in vivo* antagonizira metamfetaminom izazvana karakteristična ponašanja kod životinja. Očito je da je riječ o različitim mjestima i signalnim putevima kojima urapidil i metamfetamin ostvaruju svoj učinak. Sposobnost urapidila da smanji aktivnost kaspaza-3/7, i time propadanje stanica, možda je dovoljna kada se događa u kompleksnijim *in vivo* reakcijama. Jedan prilog tome mogao bi biti učinak urapidila na sniženje hipertermije izazvane metamfetaminom jer je hipertermija *in vivo* pokazatelj neurotoksičnosti metamfetamina.

7. ZAKLJUČAK

ZAKLJUČAK:

- urapidil ne utječe na neurotoksičnost izazvanu metamfetaminom na stanicama PC 12 i SH-SY5Y
- urapidil spušta tjelesnu temperaturu ovisno o dozi i antagonizira djelovanje metamfetamina na istu
- urapidil utječe na lokomotornu aktivnost ovisno o dozi i ima sposobnost antagonizacije hiperlokomocije i stereotipija izazvanih metamfetaminom
- urapidil izaziva katalepsiju ovisno o primijenjenoj dozi.

Urapidil ima neuroleptička svojstva, vrlo vjerojatno posredovana putem dopaminergičkog sustava, odnosno izazvana blokiranjem dopaminskih D2 receptora.

8. LITERATURA

Adams W, Kusljic S, van den Buuse M (2008) Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyperactivity, prepulse inhibition and learning and memory. Neuropharmacology 55:1048-55.

Annanth J, Burgoyne KS, Gadasalli R, Aquino S (2001) How do the atypical antipsychotics work? J Psychiatry Neurosci 26(5):385-394.

Ares-Santos S, Granado N, Moratalla R (2013) The role of dopamine receptors in the neurotoxicity of methamphetamine. J Intern. Med. 273:437-453.

Bay-Richter C, O'Callaghan MJ, Mathur N, O'Tuathaigh CM, Heery DM, Fone KC, Waddington JL, Moran PM (2013) D-amphetamine and antipsychotic drug effects on latent inhibition in mice lacking dopamine D2 receptors. Neuropsychopharmacology; 38(8):1512-20.

Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol 271(5 Pt 1):C1424-37.

Bondi C, Matthews M, Moghaddam B (2012) Glutamatergic animal models of schizophrenia. Curr Pharm Des 18:1593-604.

Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. Eur J Pharmacol 585(2-3):325-37.

Bovet D, Bovet-Nitti F (1948) Medicaments du systeme nerveux vegetatif: adrenaline, acetylcholine, histamine et leurs antagonistes p. 247. S. Karger, Basel-New York.

Bowyer JF, Holson RR (1995) Methamphetamine and amphetamine neurotoxicity Handbook of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York, pp. 1995845–870.

Bowyer JF, Ali S (2006) High doses of methamphetamine that cause disruption of the blood-brain barrier in limbic regions produce extensive neuronal degeneration in mouse hippocampus. Synapse 1;60(7):521-32.

Bowyer JF, Davies DL, Schmued L, Broening HW, Newport GD, Slikker W Jr, Holson RR (1994) Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. J Pharmacol. Exp. Ther 268, 1571-1580.

Bowyer JF, Tank AW, Newport GD, Slikker W Jr, Ali SF, Holson RR (1992) The influence of environmental temperature on the transient effects of methamphetamine on dopamine levels and dopamine release in rat striatum. J Pharmacol Exp Ther 260(2):817-24.

Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P (2006): Cell death in the nervous system. Nature 444: 796-802.

Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC, Pickar D (1997) Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. Proc Natl Acad Sci U S A 94:2569-74.

Bricker B, Sampson D, Ablordeppey S (2014) Evaluation of the potential of antipsychotic agents to induce catalepsy in rats: Assessment of a new, commercially available, semi-automated instrument Pharmacol Biochem Behav 120:109-116.

Brown JM, Quinton MS, Yamamoto BK (2005) Methamphetamine-induced inhibition of mitochondrial complex II: roles of glutamate and peroxynitrite. J Neurochem 95(2):429-36.

Brunelin J, d'Amato T, van Os J, Costes N, Suaud Chagny MF, Saoud M (2010) Increased left striatal dopamine transmission in unaffected siblings of schizophrenia patients in response to acute metabolic stress. Psychiatry Res 181:130-5.

Buch J (2010) Urapidil, a dual-acting antihypertensive agent: Current usage considerations. Adv Ther 27(7):426-43.

Burger ME, Fachinetto R, Zeni G, Rocha JB (2005) Ebselen attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat brain. Pharmacol Biochem Behav 81:608-15.

Cadet JL, Brannock C (1998) Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. Neurochem Int 32(2):117-31.

Cadet JL, Jayanthi S, Deng X (2003) Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. FASEB J.17(13):1775-88.

Cadet JL, McCoy MT, Ladenheim B (2002) Distinct gene expression signatures in the striata of wild-type and heterozygous c-fos knockout mice following methamphetamine administration: evidence from cDNA array analyses. Synapse 44(4):211-26.

Cappon GD, Pu C, Vorhees CV (2000): Time-course of methamphetamine-induced neurotoxicity in rat caudate-putamen after single-dose treatment. Brain Res. 863, 106-111.

Cappon GD, Broening HW, Pu C, Morford L, Vorhees CV (1996) alpha-Phenyl-N-tert-butyl nitrone attenuates methamphetamine-induced depletion of striatal dopamine without altering hyperthermia. Synapse 24(2):173-81.

Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML (2001) Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41:237-60.

Casey DE (2000) Tardive dyskinesia: pathophysiology and animal models. J Clin Psychiatry 61 Suppl 4:5-9.

Castagne V, Moser PC, Porsolt RD (2009) Preclinical behavioral models for predicting antipsychotic activity. Adv Pharmacol 57:381-418.

Castino R, Lazzeri G, Lenzi P, Bellio N, Follo C, Ferrucci M, Fornai F, Isidoro C (2008) Suppression of autophagy precipitates neuronal cell death following low doses of methamphetamine. J Neurochem 106(3):1426-39.

Chen C, Qincao L, Xu J, Du S, Huang E, Liu C, Lin Z, Xie WB, Wang H (2016) Role of PUMA in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. Toxicol Lett 240(1):149-60.

Costall B, Naylor RJ (1974) Mesolimbic involvement with behavioural effects indicating antipsychotic activity. Eur J Pharmacol 27(1):46-58.

Coyle JT, Basu A, Benneyworth M, Balu D, Konopaske G (2012) Glutamatergic synaptic dysregulation in schizophrenia: therapeutic implications. Handb Exp Pharmacol 267-95.

Creese I, Iversen SD (1974) A role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behaviour in the rat. Psychopharmacology 39, 345-357.

Crowley JJ, Adkins DE, Pratt AL, Quackenbush CR, van den Oord EJ, Moy SS, Wilhelmsen KC, Cooper TB, Bogue MA, McLeod HL, Sullivan PF (2012) Antipsychotic-induced vacuous chewing movements and extrapyramidal side effects are highly heritable in mice. Pharmacogenomics J 12:147-55.

de Leon J (2007) The effect of atypical versus typical antipsychotics on tardive dyskinesia: a naturalistic study. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 257:169-72.

De Vito MJ, Wagner GC (1989) Methamphetamine-induced neuronal damage: a possible role for free radicals. Neuropharmacology 28(10):1145-50.

Deng X, Cadet JL (2000) Methamphetamine-induced apoptosis is attenuated in the striata of copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice. Brain Res Mol Brain Res 83(1-2):121-4.

Dickinson SL, Gadie B, Tulloch IF (1988) Alpha 1- and alpha 2-adrenoreceptor antagonists differentially influence locomotor and stereotyped behaviour induced by d-amphetamine and apomorphine in the rat. Psychopharmacology (Berl) 96(4):521-7.

Egan MF, Hurd Y, Ferguson J, Bachus SE, Hamid EH, Hyde TM (1996) Pharmacological and neurochemical differences between acute and tardive vacuous chewing movements induced by haloperidol. Psychopharmacology (Berl) 127:337-45.

Ellenbroek BA (1993) Treatment of schizophrenia: a clinical and preclinical evaluation of neuroleptic drugs. Pharmacol Ther 57:1-78.

Ellenbroek BA (2012) Psychopharmacological treatment of schizophrenia: what do we have, and what could we get? Neuropharmacology 62:1371-80.

Ellenbroek BA, Peeters BW, Honig WM, Cools AR (1987) The paw test: a behavioural paradigm for differentiating between classical and atypical neuroleptic drugs. Psychopharmacology (Berl) 93:343-348.

Ellison G, See RE (1989) Rats administered chronic neuroleptics develop oral movements which are similar in form to those in humans with tardive dyskinesia. Psychopharmacology (Berl) 98:564-6.

Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B (2012) The mitochondrial pathways of apoptosis. Adv Exp Med Biol. 942:157-83.

Evenden JL (1994) The effect of 5-HT1a receptor agonists on locomotor activity in the guinea-pig. Br J Pharmacol 112(3):861-6.

Ford CP (2014) The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. Neuroscience 282:13-22.

Fornai F, Battaglia G, Gesi M, Orzi F, Nicoletti F, Ruggieri S (2001) Dose-dependent protective effects of apomorphine against methamphetamine-induced nigrostriatal damage. Brain Res 898(1):27-35.

Fornai F, Lenzi P, Capobianco L, Iacovelli L, Scarselli P, Lazzeri G, De Blasi A (2008) Involvement of dopamine receptors and beta-arrestin in metamphetamine-induced inclusions formation in PC12 cells. J Neurochem 105(5):1939-47.

Fornai F, Lenzi P, Gesi M, Soldani P, Ferrucci M, Lazzeri G, Capobianco L, Battaglia G, De Blasi A, Nicoletti F, Paparelli A (2004) Methamphetamine produces neuronal inclusions in the nigrostriatal system and in PC12 cells. J Neurochem 2004 88(1):114-23.

Fukumura M, Cappon GD, Pu C, Broening HW, Vorhees CV (1988) A single dose model of methamphetamine-induced neurotoxicity in rats: effects on neostriatal monoamines and glial fibrillary acidic protein. Brain Res 806, 1-7.

Fumagalli F, Gainetdinov RR, Valenzano KJ, Caron MG (1998) Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. J Neurosci 18(13):4861-9.

Gardner DM, Baldessarini RJ, Waraich P (2005) Modern antipsychotic drugs: a critical overview. CMAJ 172:1703-11.

Gerlach J (1991) New antipsychotics: classification, efficacy, and adverse effects. Schizophr Bull 17:289-309.

Geyer MA, Ellenbroek B (2003) Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27:1071-9.

Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. Psychopharmacology (Berl) 156:117-54.

Geyer MA, McIlwain KL, Paylor R (2002) Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review. Mol Psychiatry 7:1039-53.

Gobira PH, Ropke J, Aguiar DC, Crippa JA, Moreira FA (2013) Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs. Rev Bras Psiquiatr 13;35 Suppl 2:S132-9.

Goodwin JS, Larson GA, Swant J, Sen N, Javitch JA, Zahniser NR, De Felice LJ, Khoshbouei H (2009) Amphetamine and methamphetamine differentially affect dopamine transporters in vitro and in vivo. J Biol Chem 284(5):2978-89.

Greenblatt EN, Coupet J, Rauh E, Szucs-Myers VA (1980) Is dopamine antagonism a requisite of neuroleptic activity? Arch Int Pharmacodyn Ther 248(1):105-19.

Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 73(7):2424-8.

Gunasekar PG, Kanthasamy AG, Borowitz JL, Isom GE (1995) NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. J Neurochem 65(5):2016-21.

Gundlach AL, Largent BL, Snyder SH (1986) Autoradiographic localization of sigma receptor binding sites in guinea pig and rat central nervous system with (+)3H-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine. J Neurosci 6(6):1757-70.

Hadlock GC, Chu PW, Walters ET, Hanson GR, Fleckenstein AE (2010) Methamphetamine-induced dopamine transporter complex formation and dopaminergic deficits: the role of D2 receptor activation. J Pharmacol Exp Ther 335(1):207-12.

Hall DA, Stanis JJ, Marquez Avila H, Gulley JM (2008) A comparison of amphetamine- and methamphetamine induced locomotor activity in rats: evidence forqualitative differences in behavior. Psychopharmacology (Berl) 195(4):469-78.

Halliwell B (2006): Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J. Neurochem 97: 1634–1658.

He J, Yang Y, Yu Y, Li X, Li XM (2006) The effects of chronic administration of quetiapine on the methamphetamine-induced recognition memory impairment and dopaminergic terminal deficit in rats. Behav Brain Res 172(1):39-45.

Hoffman DC, Donovan H (1995) Catalepsy as a rodent model for detecting antipsychotic drugs with extrapyramidal side effect liability. Psychopharmacology (Berl) 120:128-33.

Hom DG, Jiang D, Hong EJ, Mo JQ, Andersen JK (1997) Elevated expression of glutathione peroxidase in PC12 cells results in protection against methamphetamine but not MPTP toxicity. Brain Res Mol Brain Res 46(1-2):154-60.

Howes OD, Kapur S (2009) The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. Schizophr Bull 35:549-62.

Huang W, Xie WB, Qiao D, Qiu P, Huang E, Li B, Chen C, Liu C, Wang Q, Lin Z, Wang H (2015) Caspase-11 plays an essential role in methamphetamine-induced dopaminergic neuron apoptosis. Toxicol Sci 145(1):68-79.

Huang YN, Wang JY, Lee CT, Lin CH, Lai CC, Wang JY (2012) L-ascorbate attenuates methamphetamine neurotoxicity through enhancing the induction of endogenous heme oxygenase-1. Toxicol Appl Pharmacol 265(2):241-52.

Ibrahim HM, Tamminga CA (2011) Schizophrenia: treatment targets beyond monoamine systems. Annu Rev Pharmacol Toxicol 51:189-209.

Imam SZ, el-Yazal J, Newport GD, Itzhak Y, Cadet JL, Slikker W Jr, Ali SF (2001) Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. Ann N Y Acad Sci 939:366-80.

Iversen SD (1987). Is it possible to model psychotic states in animals? J Psychopharmacol 1:154-76.

Iwashita A, Mihara K, Yamazaki S, Matsuura S, Ishida J, Yamamoto H, Hattori K, Matsuoka N, Mutoh S (2004) A new poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, FR261529 [2-(4-chlorophenyl)-5-quinoxalinecarboxamide], ameliorates methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. J Pharmacol Exp Ther 310(3):1114-24.

Jackisch R, Kasakov L, Feuerstein TJ, Hertting G (1987) Effects of urapidil on neurotransmitter release in CNS tissue in vitro. Arch Int Pharmacodyn Ther 285(1):5-24.

Jantschak F, Brosda J, Franke RT, Fink H, Möller D, Hübner H, Gmeiner P, Pertz HH (2013) Pharmacological profile of 2-bromoterguride at human dopamine D2, porcine serotonin 5-hydroxytryptamine 2A, and α2C-adrenergic receptors, and its antipsychotic-like effects in rats. J Pharmacol Exp Ther 347(1):57-68.

Jayanthi S, Deng X, Bordelon M, McCoy MT, Cadet JL (2001) Methamphetamine causes differential regulation of pro-death and anti-death Bcl-2 genes in the mouse neocortex. FASEB J 15(10):1745-52.

Jayanthi S, Deng X, Ladenheim B, McCoy MT, Cluster A, Cai NS, Cadet JL (2005) Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 102(3):868-73.

Johnson Z, Venters J, Guarraci FA, Zewail-Foote M (2015) Methamphetamine induces DNA damage in specific regions of the female rat brain. Clin Exp Pharmacol Physiol 42(6):570-5.

Kalkman HO, Soar J (1990) Determination of the 5-HT receptor subtype involved in 8-OH-DPAT-induced hyperlocomotion: potential difficulties arising from inadequate pharmacological tools. Eur J Pharmacol 4;191(3):383-90.

Kapur S, Mamo D (2003) Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27:1081-90.

Kapur S, Mizrahi R, Li M (2005) From dopamine to salience to psychosis--linking biology, pharmacology and phenomenology of psychosis. Schizophr Res 79:59-68.

Kellar KJ, Quest JA, Spera AC, Buller A, Conforti A, Dias Souza J, Gillis RA (1984) Comparative effects of urapidil, prazosin, and clonidine on ligand binding to central nervous system receptors, arterial pressure, and heart rate in experimental animals. Am J Med 77(4A):87-95.

Kelley TA, Myers S (1986) Effect of urapidil on rat brain catecholamine synthesis. J Pharm Pharmacol 38(9):689-91.

Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt GA, Grandy DK, Low MJ (1998) Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. J Neurosci 18(9):3470-9.

Kelly PH, Seviour PW, Iversen SD (1975) Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. Brain Res 94(3):507-22.

Kelly PH, Iversen SD (1976) Selective 6OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: abolition of psychostimulant-induced locomotor activity in rats. Eur J Pharmacol 40(1):45-56.

Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt GA, Grandy DK, Low MJ (1998) Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. J Neurosci 1;18(9):3470-9.

Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmuller B (1980) Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. Neurosci Lett 20:379-82.

Kish SJ (2008) Pharmacologic mechanisms of crystal meth. CMAJ 178(13):1679-82.

Klawans HL, Jr., Rubovits R (1972) An experimental model of tardive dyskinesia. J Neural Transm 33:235-46.

Klemm K, Prüsse W, Krüger U (1977) Synthesis and physico-chemical properties of the antihypertensive agent urapidil. Arzneimittelforschung 27(10):1895-7.

Klemm, K (1981) Struktur-Wirkungs-Beziehungen N1-substituierter N4-Arylpiperazine und physikalisch-chemische Eigenschaften von Urapidil. Proceedings of the 1st Symposium on Urapidil, November 20 and 21, 1981, Bad Kreuznach, Germany, pp. 26-33. Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton.

Kołaczkowski M, Mierzejewski P, Bienkowski P, Wesołowska A, Newman-Tancredi A (2014) Antipsychotic, antidepressant, and cognitive-impairment properties of antipsychotics: rat profile and implications for behavioral and psychological symptoms of dementia. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 387(6):545-57.

Krasnova IN, Cadet JL (2009) Methamphetamine toxicity and messengers of death. Brain Res Rev 60(2):379-407.

Kristiansen LV, Huerta I, Beneyto M, Meador-Woodruff JH (2007) NMDA receptors and schizophrenia. Curr Opin Pharmacol 7:48-55.

Kuczenski R, Segal DS (1999) Sensitization of amphetamine-induced stereotyped behaviors during the acute response. J Pharmacol Exp Ther 288(2):699-709.

Kuhn DM, Francescutti-Verbeem DM, Thomas DM (2008) Dopamine disposition in the presynaptic process regulates the severity of methamphetamine-induced neurotoxicity. Ann N Y Acad Sci 1139:118-26.

Large CH (2007) Do NMDA receptor antagonist models of schizophrenia predict the clinical efficacy of antipsychotic drugs? J Psychopharmacol 21:283-301.

Larsen KE, Fon EA, Hastings TG, Edwards RH, Sulzer D (2002) Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. J Neurosci 22(20):8951-60.

Lazzeri G, Lenzi P, Busceti CL, Ferrucci M, Falleni A, Bruno V, Paparelli A, Fornai F (2007) Mechanisms involved in the formation of dopamine-induced intracellular bodies within striatal neurons. J Neurochem 101(5):1414-27.

Leite JV, Guimaraes FS, Moreira FA (2008) Aripiprazole, an atypical antipsychotic, prevents the motor hyperactivity induced by psychotomimetics and psychostimulants in mice. Eur J Pharmacol 578:222-7.

Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM (2009) Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. Lancet 373:31-41.

Li B, Chen R, Chen L, Qiu P, Ai X, Huang E, Huang W, Chen C, Liu C, Lin Z, Xie WB, Wang H (2016) Effects of DDIT4 in Methamphetamine-Induced Autophagy and Apoptosis in Dopaminergic Neurons. Mol Neurobiol u tisku.

Li L, Du Y, Li N, Wu X, Wu Y (2009) Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. Neurosci Biobehav Rev 33:1157-67.

Li Y, Hu Z, Chen B, Bu Q, Lu W, Deng Y, Zhu R, Shao X, Hou J, Zhao J, Li H, Zhang B, Huang Y, Lv L, Zhao Y, Cen X (2012) Taurine attenuates methamphetamine-induced autophagy and tosis in PC12 cells through mTOR signaling pathway. Toxicol Lett 215(1):1-7.

Lieberman JA (2004) Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotic. CNS Drugs 18(4):251-67.

Lieberman JA, Bymaster FP, Meltzer HY, Deutch AY, Duncan GE, Marx CE, Aprille JR, Dwyer DS, Li XM, Mahadik SP, Duman RS, Porter JH, Modica-Napolitano JS, Newton SS, Csernansky JG. Antipsychotic drugs: comparison in animal models of efficacy, neurotransmitter regulation, and neuroprotection. Pharmacol Rev Sep; 60(3):358-403. Erratum in: Pharmacol Rev 60(4):582.

Lin M, Chandramani-Shivalingappa P, Jin H, Ghosh A, Anantharam V, Ali S, Kanthasamy AG, Kanthasamy A (2012) Methamphetamine-induced neurotoxicity linked to ubiquitin-proteasome system dysfunction and autophagy-related changes that can be modulated by protein kinase C delta in dopaminergic neuronal cells. Neuroscience 210:308-32.

Lipska BK, Weinberger DR (2000) To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. Neuropsychopharmacology 23:223-39.

Lucot JB, Wagner GC, Schuster CR, Seiden LS (1980) The effects of dopaminergic agents on the locomotor activity of rats after high doses of methylamphetamine. Pharmacol Biochem Behav 13(3):409-13.

Lv T, Li Y, Jia J, Shi Z, Bai J (2013) Protective effect of geranylgeranylacetone against methamphetamine-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma cells. Pharmacology 92(3-4):131-7.

Mantegazza P, Müller EE, Naimzada MK, Riva M (1970) Studies on the lack of correlation between hyperthermia, hyperactivity and anorexia induced by amphetamine. In: Amphetamine and Related Compounds, Proceedings of the Mario Negri Institute for Pharmacological Research, Milan, Italy, pp. 559-575. Raven Press, New York.

Marchese G, Bartholini F, Casu MA, Ruiu S, Casti P, Congeddu E, Tambaro S, Pani L (2004) Haloperidol versus risperidone on rat »early onset« vacuous chewing. Behav Brain Res 149:9-16.

Marshall JF, O'Dell SJ (2012) Methamphetamine influences on brain and behavior: unsafe at any speed? Trends Neurosci 35(9):536-45.

McCann UD, Kuwabara H, Kumar A, Palermo M, Abbey R, Brasic J, Ye W, Alexander M, Dannals RF, Wong DF, Ricaurte GA (2008) Persistent cognitive and dopamine transporter deficits in abstinent methamphetamine users. Synapse 62(2):91-100.

Meltzer HY (1999) The role of serotonin in antipsychotic drug action. Neuropsychopharmacology 21:106S-15S.

Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J (2003) Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27:1159-72.

Meltzer HY, Massey BW (2011) The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. Curr Opin Pharmacol 11:59-67.

Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA (2005) Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. Mol Psychiatry 10:79-104.

Miyamoto Y, Iida A, Sato K, Muramatsu S, Nitta A (2015) Knockdown of dopamine D_2 receptors in the nucleus accumbens core suppresses methamphetamine-induced behaviors and signal transduction in mice. Int. J. Neuropsychopharmacol 18(4):pyu038.

Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales FJ, Fukuda M, Kitaichi K, Miyoshi K, Ogawa N (2006) Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity is regulated by quinone-formation-related molecules. FASEB J 20(3):571-3.

Moghaddam B, Jackson ME (2003) Glutamatergic animal models of schizophrenia. Ann N Y Acad Sci 1003:131-7.

Moreira FA, Guimaraes FS (2005) Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. Eur J Pharmacol 512:199-205.

Morrens M, Hulstijn W, Lewi PJ, De Hert M, Sabbe BG (2006) Stereotypy in schizophrenia. Schizophr Res 84:397-404.

Mouri A, Nagai T, Ibi D, Yamada K (2013) Animal models of schizophrenia for molecular and pharmacological intervention and potential candidate molecules. Neurobiol Dis 53:61-74.

Nara A, Aki T, Funakoshi T, Uemura K (2010) Methamphetamine induces macropinocytosis in differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Brain Res 1352:1-10.

Newman-Tancredi A, Kleven MS (2011) Comparative pharmacology of antipsychotics possessing combined dopamine D2 and serotonin 5-HT1a receptor properties Psychopharmacology (Berl) 216(4):451-73.

Ootsuka Y, Blessing WW (2006) Activation of 5-HT1a receptors in rostral medullary raphé inhibits cutaneous vasoconstriction elicited by cold exposure in rabbits. Brain Res 1073-1074:252–61.

Panenka WJ, Procyshyn RM, Lecomte T, MacEwan GW, Flynn SW, Honer WG, Barr AM (2013) Methamphetamine use: a comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. Drug Alcohol Depend 129(3):167-79.

Peleg-Raibstein D, Feldon J, Meyer U (2012) Behavioral animal models of antipsychotic drug actions. Handb Exp Pharmacol 361-406.

Petersen R, Finsen B, Andreassen OA, Zimmer J, Jorgensen HA (2000) No changes in dopamine D(1) receptor mRNA expressing neurons in the dorsal striatum of rats with oral movements induced by long-term haloperidol administration. Brain Res 859:394-7.

Porras G, Di Matteo V, Fracasso C, Lucas G, De Deurwaerdere P, Caccia S, Esposito E, Spampinato U (2002) 5-HT2a and 5-HT2c/2b receptor subtypes modulate dopamine release induced in vivo by amphetamine and morphine in both the rat nucleus accumbens and striatum. Neuropsychopharmacology 26:311-24.

Porsolt RD, Moser PC, Castagné V (2010) Behavioral indices in antipsychotic drug discovery. J Pharmacol Exp Ther 333(3):632-8.

Potashkin JA, Meredith GE (2006) The role of oxidative stress in the dysregulation of gene expression and protein metabolism in neurodegenerative disease. Antioxid Redox Signal 8(1-2):144-51.

Pothos EN, Przedborski S, Davila V, Schmitz Y, Sulzer D (1998) D2-Like dopamine autoreceptor activation reduces quantal size in PC12 cells. J Neurosci 18:5575–5585.

Pratt J, Winchester C, Dawson N, Morris B (2012) Advancing schizophrenia drug discovery: optimizing rodent models to bridge the translational gap. Nat Rev Drug Discov 11:560-79.

Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN (2004) Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. Neurotox Res 5(8):579-98.

Pubill D, Chipana C, Camins A, Pallàs M, Camarasa J, Escubedo E (2005) Free radical production induced by methamphetamine in rat striatal synaptosomes. Toxicol Appl Pharmacol 204(1):57-68.

Rawls SM, Baron DA, Geller EB, Adler MW (2002) Sigma sites mediate DTG-evoked hypothermia in rats. Pharmacol Biochem Behav 73(4):779-86.

Riddle EL[1], Fleckenstein AE, Hanson GR (2006) Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. AAPS J 8(2):E413-8.

Rivière GJ, Byrnes KA, Gentry WB, Owens SM (1999) Spontaneous locomotor activity and pharmacokinetics of intravenous methamphetamine and its metabolite amphetamine in the rat. J Pharmacol Exp Ther 291(3):1220-6.

Rusyniak DE, Zaretskaia MV, Zaretsky DV, DiMicco JA (2007) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine- and 8-hydroxy-2-di-n-propylamino-tetralin-induced hypothermia: role and location of 5-hydroxytryptamine 1A receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 323 (2): 477–87.

Sanberg PR, Bunsey MD, Giordano M, Norman AB (1988) The catalepsy test: its ups and downs. Behav Neurosci 102:748-59.

Sanders KH, Beller KD, Bischler P, Kolassa N (1988) Interaction of urapidil with brain serotonin-1A receptors increases the blood pressure reduction due to peripheral alpha-adrenoceptor inhibition. J Hypertens Suppl. 6(2):S65-8.

Sandoval V, Riddle EL, Ugarte YV, Hanson GR, Fleckenstein AE (2001) Methamphetamine-induced rapid and reversible changes in dopamine transporter function: an in vitro model. J Neurosci 21(4):1413-9.

Schaefer GJ, Michael RP (1984) Drug interactions on spontaneous locomotor activity in rats. Neuroleptics and amphetamine-induced hyperactivity. Neuropharmacology 23(8):909-14.

Schoetensack W, Bruckschen EG, Zech K (1983) Urapidil. New Drugs Annual: Cardiovascular Drugs. pp 19-48, Raven Press, New York.

Schoetensack W, Eltze M, Gönne S, Kley KP, Menge HG, Müller H (1977) Studies on the effect of urapidil on the central nervous system and various organ functions in animal experiments. Arzneimittelforschung 27(10):1898-907.

Sekine Y, Minabe Y, Ouchi Y, Takei N, Iyo M, Nakamura K, Suzuki K, Tsukada H, Okada H, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Mori N (2003) Association of dopamine transporter loss in the orbitofrontal and dorsolateral prefrontal cortices with methamphetamine-related psychiatric symptoms. Am. J. Psychiatry 160:1699-1701.

Sekine Y, Ouchi Y, Takei N, Yoshikawa E, Nakamura K, Futatsubashi M, Okada H, Minabe Y, Suzuki K, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Tsukada H, Iyo M, Mori N (2006) Brain serotonin transporter density and aggression in abstinent methamphetamine abusers. Arch. Gen. Psychiatry 63:90-100.

Sheng P, Cerruti C, Ali S, Cadet JL (1996) Nitric oxide is a mediator of methamphetamine (METH)-induced neurotoxicity. In vitro evidence from primary cultures of mesencephalic cells. Ann N Y Acad Sci 801:174-86.

Singer EA, Cichini G, Valenta B, Kraupp O (1989) Effects of urapidil on catecholamine turnover and release in the central nervous system of the rat. J Pharm Pharmacol 41(3):173-8.

Stoessl AJ, Dourish CT, Iversen SD (1989) Chronic neuroleptic-induced mouth movements in the rat: suppression by CCK and selective dopamine D1 and D2 receptor antagonists. Psychopharmacology (Berl) 98:372-9.

Stuchlik A, Petrasek T, Vales K (2008) Dopamine D2 receptors and alpha1-adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task. Behav Brain Res 189(1):139-44.

Stuchlik A, Vales K (2008) Role of alpha1- and alpha2-adrenoceptors in the regulation of locomotion and spatial behavior in the active place avoidance task: a dose-response study. Neurosci Lett 433(3):235-40.

Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. Prog Neurobiol 75(6):406-33.

Suwanjang W, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P, Chetsawang B (2012) Calpastatin reduces calpain and caspase activation in methamphetamine-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells. Neurosci Lett 526(1):49-53.

Swerdlow NR, Geyer MA (1998) Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. Schizophr Bull 24:285-301.

Tarsy D, Baldessarini RJ (1977) The pathophysiologic basis of tardive dyskinesia. Biol Psychiatry 12:431-50.

Thomas A Bann (2007) Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. Neuropsychiatr Dis Treat 3(4):495-500.

Tokunaga I, Ishigami A, Kubo S, Gotohda T, Kitamura O (2008) The peroxidative DNA damage and apoptosis in methamphetamine-treated rat brain. J Med Invest 55(3-4):241-5.

Tomiyama K, McNamara FN, Clifford JJ, Kinsella A, Koshikawa N, Waddington JL (2001) Topographical assessment and pharmacological characterization of orofacial movements in mice: dopamine D(1)-like vs. D(2)-like receptor regulation. Eur J Pharmacol 418:47-54.

Turrone P, Remington G, Kapur S, Nobrega JN (2003) The relationship between dopamine D2 receptor occupancy and the vacuous chewing movement syndrome in rats. Psychopharmacology (Berl) 165:166-71.

Uemura K, Aki T, Yamaguchi K, Yoshida Ki (2003) Protein kinase C-epsilon protects PC12 cells against methamphetamine-induced death: possible involvement of suppression of glutamate receptor. Life Sci 72(14):1595-607.

Usalli, A, Baik JH, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. Nature 408:199-203.

van Os J, Kapur S (2009) Schizophrenia. Lancet 374:635-45.

van Zwieten PA, Blauw GJ, van Brummelen P (1990) Pharmacological profile of antihypertensive drugs with serotonin receptor and alpha-adrenoceptor activity. Drugs 40 Suppl 4:1-8; discussion 28-30.

van Zwieten PA, de Jonge A, Wilffert B, Timmermans PB, Beckeringh JJ, Thoolen MJ (1985) Cardiovascular effects and interaction with adrenoceptors of urapidil. Arch Int Pharmacodyn Ther 276(2):180-201.

Vollenweider FX, Kometer M (2010) The neurobiology of psychedelic drugs: implications for the treatment of mood disorders. Nat Rev Neurosci 11:642-51.

Wadenberg ML (2010) Conditioned avoidance response in the development of new antipsychotics. Curr Pharm Des 16:358-70.

Wadenberg MG, Sills TL, Fletcher PJ, Kapur S (2000) Antipsychoticlike effects of amoxapine, without catalepsy, using the prepulse inhibition of the acoustic startle reflex test in rats. Biol Psychiatry 47(7):670-6.

Wadenberg ML, Kapur S, Soliman A, Jones C, Vaccarino F (2000) Dopamine D2 receptor occupancy predicts catalepsy and the suppression of conditioned avoidance response behavior in rats. Psychopharmacology (Berl) 150(4):422-9.

Wadenberg ML. Conditioned avoidance response in the development of new antipsychotics. Curr Pharm Des 16(3):358-70.

Wallace TL, Gudelsky GA, Vorhees CV (1999) Methamphetamine-induced neurotoxicity alters locomotor activity, stereotypic behavior, and stimulated dopamine release in the rat. J Neurosci 19(20):9141-8.

Wallace TL, Gudelsky GA, Vorhees CV (1999) Methamphetamine-induced neurotoxicity alters locomotor activity, stereotypic behavior, and stimulateddopamine release in the rat. J Neurosci 19(20):9141-8.

Wang SF, Yen JC, Yin PH, Chi CW, Lee HC (2008) Involvement of oxidative stress-activated JNK signaling in the methamphetamine-induced cell death of human SH-SY5Y cells. Toxicology 246(2-3):234-41.

Wang X, Michaelis EK (2010) Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. Front. Aging Neurosci 2:1-13.

Weatherspoon JK, Werling LL (1999) Modulation of amphetamine-stimulated [^{3}H]dopamine release from rat pheochromocytoma (PC12) cells by sigma type 2 receptors. J Pharmacol Exp Ther 289(1):278-84.

Wisessmith W, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P, Chetsawang B (2009) Melatonin reduces induction of Bax, caspase and cell death in methamphetamine-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells. J Pineal Res 46(4):433-40.

Woods SW, Morgenstern H, Saksa JR, Walsh BC, Sullivan MC, Money R, Hawkins KA, Gueorguieva RV, Glazer WM (2010) Incidence of tardive dyskinesia with atypical versus conventional antipsychotic medications: a prospective cohort study. J Clin Psychiatry 71:463-74.

Wu CW, Ping YH, Yen JC, Chang CY, Wang SF, Yeh CL, Chi CW, Lee HC (2007) Enhanced oxidative stress and aberrant mitochondrial biogenesis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells during methamphetamine induced apoptosis. Toxicol Appl Pharmacol 220(3):243-51.

Wu J, Zhu D, Zhang J, Li G, Liu Z, Sun J (2015) Lithium protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in PC12 cells via Akt/GSK3β/mTOR pathway. Biochem Biophys Res Commun 465(3):368-73.

Xu W, Zhu JP, Angulo JA (2005) Induction of striatal pre- and postsynaptic damage by methamphetamine requires the dopamine receptors. Synapse 58(2):110-21.

Yu S, Zhu L, Shen Q, Bai X, Di X (2015) Recent advances in methamphetamine neurotoxicity mechanisms and its molecular pathophysiology. Behav Neurol 2015:103969.
Zhang F, Chen L, Liu C, Qiu P, Wang A, Li L, Wang H (2013) Up-regulation of protein tyrosine nitration in methamphetamine-induced neurotoxicity through DDAH/ADMA/NOS pathway. Neurochem. Int 62(8):1055-64.

ŽIVOTOPIS

Božo Radić rođen je 18. listopada 1981. u Splitu, gdje je završio osnovnu školu i maturirao u Prirodoslovno-matematičkoj gimnaziji. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2000. godine, na kojem je diplomirao 2006. godine. Godine 2004. dobiva Rektorovu nagradu za rad »Učinak BPC 157 na tupu ozljedu mišića u štakora«. Pripravnički staž iz medicine završava 2008. godine i do 2010. godine radi u timu za hitnu pomoć pri Domu zdravlja Koprivničko-križevačke županije. Od 2011. godine je na specijalizaciji iz gastroenterologije u Kliničkoj bolnici Dubrava. Sudjeluje kao stručni suradnik tvrtke Hedera d. o. o. iz Splita na raznim istraživačko-razvojnim projektima. Od 2003. godine surađuje u timu prof. dr. sc. Predraga Sikirića na projektu »Pentadekapeptid BPC 157 – daljnja istraživanja«. Autor je više od 30 znanstvenih radova u časopisima indeksiranima u *Current Contentsu*.