

UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 U MODELIMA DOPAMINERGIČKE NEUROTOKSIČNOSTI UZROKOVANE METAMFETAMINOM

Šuran, Jelena

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:217875>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)





Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Jelena Šuran

**UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC
157 U MODELIMA DOPAMINERGIČKE
NEUROTOKSIČNOSTI UZROKOVANE
METAMFETAMINOM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

THE FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Jelena Šuran

**THE EFFECT OF PENTADECAPEPTIDE
BPC 157 ON METAMPHETAMINE -
INDUCED DOPAMINERGIC
NEUROTOXICITY MODELS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Jelena Šuran

**UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC
157 U MODELIMA DOPAMINERGIČKE
NEUROTOKSIČNOSTI UZROKOVANE
METAMFETAMINOM**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Predrag Sikirić, dr. med.

Prof. dr. sc. Frane Božić, dr. med. vet.

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

THE FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Jelena Šuran

**THE EFFECT OF PENTADECAPEPTIDE
BPC 157 ON METAMPHETAMINE -
INDUCED DOPAMINERGIC
NEUROTOXICITY MODELS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Prof. dr. sc. Predrag Sikirić, dr. med.

Prof. dr. sc. Frane Božić, dr. med. vet.

Zagreb, 2013

Disertacija je izrađena na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr.sc. Predraga Sikirića, te na Zavodu za farmakologiju i toksikologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Frane Božića. Disertacija sadržava 144 stranice, 16 tablica, 42 slike i 277 literaturnih navoda.

Ova disertacija predana je na ocjenu Fakultetskom vijeću Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u području Biomedicinskih znanosti, polje Veterinarska medicina.

Zahvaljujem se mentorima koji su mi omogućili izradu disertacije; profesoru Predragu Sikiriću koji mi je dao povjerenje i slobodu u izvođenju pokusa, a profesoru Frani Božiću na konstruktivnim savjetima o pisanju. Zahvaljujem se kolegici Danijeli Kolenc i profesoru Svenu Seiwerthu na velikoj pomoći i trudu uloženom u patohistološku analizu mozгова. Veliko hvala Ivanu Gržibovskom i mojim studentima na tehničkoj i moralnoj podršci prilikom izvođenja pokusa.

Sve pokuse i analize bi bilo teže organizirati da nije bilo razumjevanja i potpore kolegica i kolega sa Zavoda za farmakologiju i toksikologiju, posebno našeg predstojnika, profesora Darka Sakara koji je omogućio opremanje kromatografskog laboratorija Zavoda.

Dragom Aleksandru se zahvaljujem na strpljenju i ljubavi, a svojim roditeljima, Mireli i Ivanu, na radoznalosti koju su mi prenijeli i koja me prati od malih nogu.

**ŠURAN JELENA: UČINAK PENTADEKAPEPTIDA BPC 157 U MODELIMA
DOPAMINERGIČKE NEUROTOKSIČNOSTI UZROKOVANE
METAMFETAMINOM**

SAŽETAK

Istražen je učinak pentadekapeptida BPC 157 u modelima dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom; prvi je model uzrokovan jednom dozom metamfetamina (10, 20 ili 40 mg/kg), a drugi je model dopaminergičke preosjetljivosti u kojem se haloperidol daje tri dana prije metamfetamina. Ovakvi modeli korisni su istraživanju poremećaja razine dopamina u središnjem živčanom sustavu, posebno u nigrostrijatumu, koji rezultiraju smetnjama pri kretanju, kognitivnim procesima i ponašanju ljudi i životinja. Pokusi su provedeni na Wistar štakoricama kojima bi se prije metamfetamina ili haloperidola aplicirali BPC 157 ili fiziološka otopina. 24 h nakon aplikacije metamfetamina mjerila se lokomotorna aktivnost, bodovala poremećena motorika prednjih ekstremiteta i ataktični fenotip. Analizirala se razina malondialdehida (MDA) u mozgu 2 i 24 h nakon davanja metamfetamina, te broj neurona u strijatumu, supstanciji nigri i ventralnom tegmentalnom području 24 h nakon davanja metamfetamina. Štakorice koje su prije 10 mg/kg metamfetamine dobile BPC 157 bile su značajno aktivnije od kontrolnih štakorica 24 h nakon aplikacije metamfetamina. Štakorice koje su prije metamfetamina dobile BPC 157 imale su manje izražen ataktični fenotip i statistički značajno manje poremećenu funkciju prednjih ekstremiteta, veći broj zdravih, a manji broj patološki promijenjenih neurona u strijatumu, supstanciji nigri i ventralnom tegmentalnom području u odnosu na štakorice kontrolnih skupina. Dva sata nakon aplikacije metamfetamina razina MDA u strijatumu je bila značajno niža od fiziološke, dok je 24 h poslije bila viša. Kod štakorica tretiranih BPC-om 157 razina MDA u strijatumu bila je bliža fiziološkoj u svim slučajevima osim

24 h nakon aplikacije 40 mg/kg metamfetamina. U modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom štakorice prethodno tretirane BPC-om 157 imale su manje razine MDA u strijatumu, hipokampusu i diencefalonu u odnosu na kontrolnu skupinu, a veću i sličniju fiziološkoj razinu MDA u malom mozgu. BPC 157 ima određeno neuroprotektivno djelovanje i štiti strijatum od dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom i potencirane haloperidolom, što upućuje na učinkovitost BPC-a 157 u prevenciji poremećaja razine dopamina, a moguće i Parkinsonove bolesti.

Ključne riječi: pentadekapeptid BPC 157, metamfetamin, haloperidol, dopaminergička neurotoksičnost

THE EFFECT OF PENTADECAPEPTIDE BPC 157 IN METAMPHETAMINE - INDUCED DOPAMINERGIC NEUROTOXICITY MODELS

Extended abstract

JELENA ŠURAN

Introduction. The aim of the research was to investigate the effect of pentadecapeptide BPC 157 in two rat models of methamphetamine - induced dopaminergic neurotoxicity. These models are useful in dopamine disorders research, especially regarding nigrostriatal dopaminergic neuron damage which results in movement disorders, cognitive and behavioural impairment in people and animals, with limited current therapy options.

Materials and methods. The first model was a simple, single - dose methamphetamine model (10, 20 ili 40 mg/kg), while the second one, the dopaminergic supersensitivity model, was potentiated with haloperidol (5 mg/kg) administered three days before methamphetamine (10 mg/kg). 106 Wistar female rats were used in both dopaminergic neurotoxicity models. Immediately after methamphetamine administration, their body temperature was monitored and stereotypies were counted. 24 hours after methamphetamine administration locomotor activity was measured, proximal forelimb function and atactic phenotype were scored. Healthy and damaged neurons were counted on hematoxylin- eosin stained sections of striatum, ventral tegmental area and substantia nigra pars compacta. MDA levels were measured in

different brain regions; striatum, hippocampus, frontal cortex, cortex, diencephalon and cerebellum 2 and 24 hours after methamphetamine administration.

Results. In both models the average number of stereotypies was smaller in BPC 157 group in comparison to control group, but these differences were not statistically significant. BPC 157 did not decrease or prevent methamphetamine – induced hyperthermia. 24 hours after 10 mg/kg methamphetamine administration BPC 157 rats were significantly more active than control rats, while after higher methamphetamine doses these differences were present but not significant. In dopaminergic supersensitivity model BPC 157 rats were more active than control rats 24 and 48 h after haloperidol administration and all survived methamphetamine dose of 10 mg/kg given three days later, while two control rats died. In comparison with control group, BPC 157 rats had less pronounced atactic phenotype, significantly less impaired forelimb function, higher number of healthy and lower number of damaged neurons in striatum, ventral tegmental area and substantia nigra pars compacta. Two hours after methamphetamine administration MDA levels in striatum and other brain regions were lower than normal but increased above normal after 24 hours. BPC 157 rats had striatal MDA values closer to normal in every case except 24 hours after administration of 40 mg/kg methamphetamine. In latter hippocampal MDA values were higher in BPC 157 rats as well. In dopaminergic supersensitivity model BPC 157 rats had lower striatal, hippocampal and diencephalic MDA values and higher, but closer to normal, cerebellar MDA values.

Conclusion. BPC 157 had specific neuroprotective effect on striatum and prevented impairment of striatum-mediated motoric functions and striatal neuron loss, which implies efficacy of BPC 157 in parkinsonism prevention.

Keywords: pentadecapeptide BPC 157, methamphetamine, haloperidol, dopaminergic neurotoxicity

SADRŽAJ

1. Uvod

1.1.	Definicija problema	1
1.2.	Ciljevi istraživanja	3
1.3.	Opseg rada	3
1.4.	Očekivani rezultati	5

2. Pregled dosadašnjih spoznaja

2.1.	Poremećaji neurotransmisije monoamina i parkinsonizmi	7
2.2.	Životinjski modeli Parkinsonove bolesti	11
2.3.	Neurotoksičnost metamfetamina	14
2.3.1.	Metamfetamin i hipertermija	23
2.3.2.	Učinak neurotoksičnih doza metamfetamina na ponašanje i lokomotornu aktivnost štakora	24
2.3.3.	Metamfetamin i poremećaji držanja i ravnoteže	25
2.3.4.	Metamfetamin i poremećaji fine motorike	25
2.3.5.	Metamfetamin i lipidna peroksidacija u mozgu	27
2.3.6.	Metamfetamin i patomorfološke promjene u mozgu	28
2.4.	Terapeutski peptidi i pentadekapeptid BPC 157	29
2.4.1.	Peptidergička citoprotekcija/organoprotekcija i citoprotektivno/ organoprotektivno djelovanje pentadekapeptida BPC 157	32

2.4.2. Neuroprotektivni učinak pentadekapeptida BPC 157	33
---	----

3. Obrazloženje teme

3.1. Obrazloženje teme	38
------------------------	----

4. Materijal i metode

4.1. Pokusne životinje	40
4.2. Pentadekapeptid BPC 157	40
4.3. Lijekovi za životinje	41
4.4. Reagensi za kromatografiju	41
4.5. Priprema ostalog materijala za analizu mozgova	41
4.6. Pokusni protokol	42
4. 7. Mjerenje tjelesne temperature	42
4. 8. Bodovanje stereotipija	42
4. 9. Mjerenje spontane lokomotorne aktivnosti i vremena čišćenja	44
4. 10. Bodovanje pormećenog držanja i ravnoteže	45
4. 11. Bodovanje poremećene funkcije prednjih ekstremiteta	46
4.12. Usmrćivanje životinja	47
4. 13. Uzorkovanje mozgova za kromatografsku analizu	47
4. 14. Mjerenje koncentracije MDA	48
4.15. Patohistološka analiza mozgova	49
4.16. Statistička obrada podataka	49

5. Rezultati

5.1. Tjelesna temperatura	
5.1.1. Učinak BPC-a 157 na tjelesnu temperaturu štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom	51
5.1.2. Učinak BPC-a 157 na tjelesnu temperaturu štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom	53
5.2. Ponašanje i diskinezije	
5.2.1. Učinak BPC-a 157 na ponašanje štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom	53
5.2.2. Odnos doze metamfetamina i učinka na stereotipije	55
5.2.3. Učinak BPC-a 157 na ponašanje štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom	56
5.3. Spontana lokomotorna aktivnost	
5.3.1. Spontana lokomotorna aktivnost zdravih štakorica kojima je na 24 h uskraćena hrana	57
5.3.2. Učinak BPC-a 157 na spontanu lokomotornu aktivnost štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom	58
5.3.3. Učinak BPC-a 157 na spontanu lokomotornu aktivnost	

štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom	60
5.4. Ataktični fenotip	
5.4.1. Učinak BPC-a 157 na ataksiju u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom	62
5.4.2. Učinak BPC-a 157 na ataksiju u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom	63
5.5. Fina motorika	
5.5.1. Učinak BPC-a 157 na finu motoriku štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom	64
5.5.2. Učinak BPC-a 157 na finu motoriku štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom	67
5.6. Lipidna peroksidacija u mozgu	
5.6.1. Učinak BPC-a 157 na koncentraciju MDA u dijelovima mozgova štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom	69
5.6.1.1. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u strijatumu	70
5.6.1.2. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u hipokampusu	71

5.6.1.3. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u diencefalonu	73
5.6.1.4. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u frontalnoj kori velikog mozga	74
5.6.1.5. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u kori velikog mozga	76
5.6.1.6. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u malom mozgu	77
5.6.2. Učinak BPC-a 157 na koncentraciju MDA u dijelovima mozgovog štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom	79
5.6.3. Korelacije između lipidne peroksidacije u mozgu i oštećenja motorike i ravnoteže	80
5.7. Učinak na broj zdravih neurona u strijatumu	81
5.7.1. Učinak BPC-a 157 na broj i izgled neurona u strijatumima štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom	82
5.7.2. Korelacija broja neurona u strijatumu sa poremećajem fine motorike i ravnoteže	83
5.7.3. Korelacija broja neurona u strijatumu sa koncentracijom MDA u strijatumu	84
5.7.4. Učinak BPC-a 157 na broj i izgled neurona u ventralnom tegmentalnom području i SNc štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane sa metamfetaminom	85

5.7.5. Učinak BPC-a 157 na broj i izgled neurona u strijatuma štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom	87
6. Rasprava	
6.1. Učinak BPC-a 157 na stereotipije i diskinezije uzrokovane metamfetaminom	93
6.2. Učinak BPC-a 157 na hipertermiju uzrokovanu metamfetaminom	93
6.3. Učinak BPC-a 157 na smanjenu lokomotornu aktivnost 24 h nakon aplikacije metamfetamina	95
6.4. Učinak BPC-a 157 na ataksiju uzrokovanu metamfetaminom	98
6.5. Učinak BPC-a 157 na poremećaj funkcije prednjih ekstremiteta uzrokovan metamfetaminom	98
6.6. Učinak BPC-a 157, haloperidola i metamfetamina na lipidnu peroksidaciju u mozgu	99
6.7. Učinak BPC-a 157, haloperidola i metamfetamina na broj zdravih i promijenjenih neurona u strijatumu	102
6.8. Smjernice za daljnja istraživanja neuroprotektivnog učinka BPC-a 157 u modelima dopaminergičke neurotoksičnosti izazvane metamfetaminom	104
7. Zaključci	106
8. Popis literature	109
9. Životopis autorice s popisom objavljenih radova	142

POPIS KRATICA I SIMBOLA

6-OHDA – 6- hidroksidopamin

5-HT – serotonin

4-HNE – 4 hidorksiononenal

A - adenzin

ATP – adenzin trifosfat

BPC 157 – engl. *body protection compound* 157 (15.7. je bio datum ekstrakcije BPC-a)

Ca²⁺ - dvovalentni kalcij

CCl₄ - tetraklorugljik

cGMP – ciklički guanozin monofosfat

CO – ugljični monoksid

Cu - bakar

CPu – *nucleus caudatus* i *putamen* , strukture koje zajedno čine dorzalni strijatum

D, DA – dopamin

DAT – transporter za dopamin

DJ1 – ili PARK7, Parkinson protein 7

DOPAK - 3,4 – dihidroksfeniloctena kiselina

egr-1- (engl. *early growth response*) čimbenik ranog odgovora rasta tpa 1

F.o. – fiziološka otopina

GABA – gama-aminomaslačna kiselina

GDNF - glijalni neurotrofni glijalni čimbenik

GP – *globus pallidus*

GPi/SNr - kompleks unutrašnjeg segmenta *globusa pallidusa* i retikularne substancije nigre

h-EGF – ljudski čimbenik rasta epidermisa

h-TGF – ljudski transformirajući čimbenik rasta

HE – hematoksilin-eozin

HPLC – metoda visokodjelotvorne tekućinske kromatografije

HVA - homovanilična kiselina

IBB – ljestvica bodovanja funkcije prednjih ekstremiteta prema Irvine, Beatties i Bresnahanu (Irvine i sur., 2010)

KCl – kalijev klorid

KOMT - katehol-o-metiltransferaza

L-NAME - N-omega-nitro-L-arginin metil ester

M - muskarin

MA – metamfetamin

MAO – monoamin oksidaza

MAO-B - monoamin oksidaza-B

MDA – malondialdehid

Mn - mangan

MPP - 1-metil-4-fenilpiridin

MPPP- 1-metil-4-fenil-4- propionoksipiperidin

MPTP- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 – tetrahidropiridinom

NA – noradrenalin

NaCl – natrijev klorid

NaH₂PO₄ – natrijev dihidrogen fosfat

Na₂HPO₄ – natrijev hidrogen fosfat

NMDA – N-metil-D-aspartat

NO – dušikov monoksid

NOS – sintaza dušikovog monoksida

eNOS – endotelna sintaza dušikovog monoksida

nNOS – neuronska sintaza dušikovog monoksida

NSPUL – nesteroidni protuupalni lijekovi

PINK1 – PTEN1 (homolog fosfataze i tenzina) -inducirana kinaza 1 serin/treonin -
protein kinaza

PL-10, PLD-116, PL 14736 - šifra za BPC 157 u Plivi

PBN - alfa-fenil –N-terc-butyl nitron

PBS – puferirana baza soli za ispiranje tkiva

RNA – ribonukleinska kiselina

gRNK– glasnička ribonukleinska kiselina

SCH 23390 – 7-kloro-3-metil-1-fenil-1,2,4,5 – tetrahidro-3-benzazepin

SERT – transporter serotonina

SN - supstancija nigra (crna tvar)

SNc - kompaktni dio supstancije nigre

SNr – retikularni dio supstancije nigre

STN – subtalamička jezgra

TBARS - reaktivni spojevi tiobarbiturne kiseline

TH – tirozin hidroksilaza

TPH – triptofan hidroksilaza

TUNEL – bojanje terminalne deoksinukleotidil transferaze na 3- OH krajevima DNK

UCHL1 - ubikvitin karboksil-terminalna hidrolaza tipa 1

VMAT2 – vezikularni transporter monoamina tipa 2

VTA – ventralno tegmentalno područje

Zn - cink

σ – sigma receptori

1. Uvod

1.1. Definicija problema

Primjerena terapija Parkinsonove bolesti koja bi bila učinkovita i bez štetnih nuzućinaka još uvijek nije poznata. Zbog toga će se istražiti neuroprotektivan učinak pentadekapeptida BPC 157 na moždane strukture u štakorskom modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom. Riječ je o istim strukturama koje su oštećene u oboljelih od Parkinsonove, no i od drugih bolesti koje uključuju promjene u motorici i ponašanju, pa će se ovim pretkliničkim istraživanjem ustanoviti potencijal BPC-a 157 u profilaksi i terapiji spomenutih bolesti.

Pentadekapeptid BPC 157 je aktivni dio želučanog peptida BPC (engl. *body protection compound*) dokazanog neuroprotektivnog učinka (TUDOR i sur., 2010.; GJURAŠIN i sur., 2010.). Budući da regulira dopaminski sustav (SIKIRIĆ i sur., 2011.), smatra se da bi mogao biti indiciran kod brojnih poremećaja razine dopamina u središnjem živčanom sustavu, posebno u nigrostrijatalnom dopaminskom putu. Ovakvi poremećaji rezultiraju smetnjama pri kretanju, kognitivnim procesima i ponašanju ljudi i životinja. Da bi se ova pretpostavka potvrdila, učinkovitost BPC-a 157 je ispitana u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane neurotoksinom MPTP-om (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) koji uništava dopaminergička vlakna u supstanciji nigri (SN) (SIKIRIĆ i sur., 1999.b), te u raznim modelima dopaminergičke preosjetljivosti i amfetaminske senzitivizacije (SIKIRIĆ i sur., 2002.; JELOVAC i sur., 1998.) U takvim je modelima potvrđen učinak BPC-a 157 na ponašanje i somatosenzorne reflekse pokusnih životinja. Osim navedenih modela, u istraživanjima poremećaja ravnoteže monoamina se koristi model dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom. Metamfetamin izaziva dugotrajnu depleciju dopamina i serotonina te oštećenje dopaminergičkih i serotonergičkih živčanih završetaka u striatumu. Smatra se da je za oštećenje živaca odgovoran oksidacijski stres koji započinje oksidacijom dopamina u 6- hidroksidopamin (KITA i sur., 2003.). Jedan od uobičajenih biljega oksidacijskog stresa je malondialdehid (MDA). Oksidacijom dopamina nastaju reaktivni dopaminski kinoni i kisikovi radikali u završecima dopaminergičkih živaca, koji napadaju nezasićene masne kiseline u membrani živaca, što dovodi do stvaranja MDA (KRASNOVA i CADET, 2009.). Malondialdehid nije samo rezultat oksidacijskog stresa i oštećenja membrane, nego ta molekula sama po sebi može djelovati toksično (LONG i sur., 2009.), dok neka istraživanja upućuju na to da je riječ o signalnoj molekuli (CAI i sur., 2009.)

Osim oksidacijskog stresa, smatra se da oštećenju dopaminergičkih živaca doprinosi i oslablađanje dušikova monoksida posredovano glutamatom (KITA i sur, 2003.; ITZHAK i ALI, 2006.). Oksidacijski stres i narušena ravnoteža sustava dušikova monoksida dovode se u vezu s razvojem bolesti vezanih za dopaminski sustav i neurodegeneraciju, što modele dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom čini vjerodostojnijima.

Djelovanje metamfetamina rezultirati će akutnim promjenama u ponašanju koje uključuju vrlo izražene stereotipije (lizanje, grizenje, čišćenje krzna, pojačano njuškanje), automutilacije te izražene poremećaje motorike; diskinezije i gubitak ravnoteže.

Modeli dopaminergičke neurotoksičnosti se mogu izazvati davanjem više uzastopnih doza metamfetamina ili jednokratnim davanjem visoke doze metamfetamina pokusnim životinjama. Ukoliko se pri tome želi provjeriti zaštitni ili ljekoviti učinak neke tvari, potonji je model jednostavniji za dizajn pokusa. Jednokratne doze od 10, 20 ili 40 mg/kg uzrokuju o dozi ovisnu hipertermiju, smanjenu razinu dopamina, serotoninina i tirozin hidrosilaze, a povišenu razinu glijalnog fibrilarnog proteina (FUKUMURA i sur., 1998.). Praćenje hipertermije kod pokusnih životinja i snižavanje iste hladnom vodom u trenutku kada naraste iznad 41,2°C smanjuje mortalitet, a ne mijenja bitno ostale parametre, pa su podaci prikupljeni od tih životinja pouzdaniji.

Neurotoksični učinak visoke doza metamfetamina može se pojačati prethodnim izazivanjem dopaminergičke preosjetljivosti haloperidolom. JELOVAC i sur. (1998.) su izazvali dopaminergičku preosjetljivost tako što su miševima dali 5 mg/kg haloperidola i.p., te su nakon 3 dana aplicirali amfetamin u dozi 20 mg/kg. Reakcija tih miševa na amfetamin je bila burnija nego kod onih koji su prije amfetamina dobili BPC 157, ali se kod njih bodovalo samo ponašanje. S obzirom na to, u ovakav se model može uključiti i provjera motorike, ravnoteže, lokomotorne aktivnosti i oksidacijskog stresa u mozgu, kako bi se dobio detaljniji uvid u učinak BPC-a 157 na očuvanje funkcija povezanih sa dopaminergičkim sustavom.

1.2. Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja je provjeriti da li BPC 157 može zaštititi nigrostrijatalni sustav i s njim povezane funkcije od neurotoksične doze metamfetamina te procijeniti na koji su način povezane patološke promjene u mozgu s poremećenom motorikom i ponašanjem pokusnih životinja;

1. Istražiti neuroprotektivni učinak BPC-a 157 u modelima dopaminergičke preosjetljivosti i neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom.
2. Utvrditi povezanost oštećenja dopaminergičkih živaca u nigrostrijatumu s oksidacijskim stresom u mozgu i promjenama u fenotipu pokusnih životinja.

1.3. Opseg rada

Istraživanje će se provesti kroz dva metamfetaminska modela: jednostavni model dopaminergičke neurotoksičnosti i model dopaminergičke preosjetljivosti. Model dopaminergičke neurotoksičnosti će se uspostaviti jednokratnom primjenom metamfetamina u dozi 10, 20 ili 40 mg/kg t.m. (FUKUMURA i sur., 1998.). Model dopaminergičke preosjetljivosti uspostaviti će se davanjem haloperidola intraperitonealno (i.p.) u dozi 5 mg/kg t.m. te potkožnom (s.c.) aplikacijom metamfetamina u dozi 10 mg/kg t.m. nakon tri dana (JELOVAC i sur., 1998.). U oba modela će se raditi sljedeće:

1. Odmah nakon davanja metamfetamina mjeriti će se tjelesna temperatura štakorica ne bi li se provjerilo da li BPC 157 može spriječiti razvoj hipertermije koja se javlja kao rezultat neurotoksičnog djelovanja metamfetamina
2. Tijekom dva sata nakon davanja metamfetamina snimati će se i bodovati ponašanje životinja (stereotipije i diskinezije) kako bi se provjerilo da li BPC 157 sprječava ili ublažava promjene ponašanja uzrokovane metamfetaminom te može li haloperidol u modelu dopaminergičke preosjetljivosti potencirati te promjene.
3. 24 h nakon davanja metamfetamina će se analizirati lokomotorna aktivnost i stereotipno ponašanje štakorica kako bi se provjerilo da li BPC 157 sprječava

pad aktivnosti i stereotipnog ponašanja do kojeg inače dolazi zbog deplecije dopamina koja nastupa 24 h nakon metamfetamina.

4. Uspoređivanjem stupnja cerebelarne ataksije među grupama će se provjeriti može li BPC 157 spriječiti razvoj ataksije koja nastaje kao posljedica neurotoksičnog djelovanja metamfetamina, kao i to je li ataksija izraženija u navedenom modelu dopaminergičke preosjetljivosti.
5. Provjerom fine motorike modificiranom metodom prema IRVINE i sur. (2010.) provjeriti će se da li neurotoksične doze metamfetamina kod štakora uzrokuju poremećaj u korištenju prednjih ekstremiteta pri hranjenju, je li taj poremećaj izraženiji u modelu dopaminergičke preosjetljivosti, tj. potenciran sa haloperidolom te može li se spriječiti ili ublažiti davanjem BPC-a 157.
6. Mjeriti će se koncentracija završnog produkta lipidne peroksidacije, malondialdehida, u kori mozga, hipokampusu, striatumu, diencefalonu i malom mozgu kako bi se potvrdio oksidacijski stres uzrokovan metamfetaminom i kako bi se provjerilo da li je on veći u modelu dopaminergičke preosjetljivosti te može li ga BPC 157 spriječiti.
7. Patohistološkom pretragom mozga provjeriti će se spriječava li BPC 157 oštećenja dopaminergičkih živaca uzrokovana davanjem neurotoksične doze metamfetamina, kao i to i jesu li ta oštećenja veća u modelu dopaminergičke preosjetljivosti sa haloperidolom.
8. Izračunati će se korelacije između histomorfoloških oštećenja i oksidacijskog stresa u pojedinim područjima mozga sa poremećajima motorike i držanja.

1.4. Očekivani rezultati

Očekuje se da će metamfetamin uzrokovati pojačanu lipidnu peroksidaciju i oštećenje dopaminergičkih živaca u strijatumu, a da će haloperidol dovesti do razvoja dopaminergičke preosjetljivosti tri dana nakon aplikacije i potencirati djelovanje metamfetamina. Navedeno će rezultirati značajnim promjenama u ponašanju, motorici i morfologiji neurona kontrolnih životinja, što bi BPC 157 trebao spriječiti ili ublažiti.

Osim toga, istraživanje će pridonijeti razumijevanju poremećaja središnjeg dopaminskog sustava i povezanosti promjena u motorici i ponašanju sa oksidacijskim stresom u mozgu. Rezultati istraživanja će pokazati da li BPC 157 štiti nigrostrijum od neurotoksičnih lezija, da li može spriječiti promjene u stvaranju produkta lipidne peroksidacije u mozgu i da li, čak i u slučaju pojave lezija i oksidacijskog stresa, kod pokusnih životinja može očuvati funkcije regulirane strijatumom.

2. Pregled dosadašnjih spoznaja

2.1. Poremećaji neurotransmisije monoamina i parkinsonizmi

Heterogenu i brojnu skupinu poremećaja neurotransmisije monoamina čine neurološki sindromi uzrokovani primarnim i sekundarnim promjenama u biosintezi, razgradnji i transportu dopamina, serotonina, noradrenalina i adrenalina. Riječ je o bolestima koje se mogu pojaviti od najranije dobi a kliničkom slikom dominiraju neurološki znaci; encefalopatija, epilepsija, piramidalni ili ekstrapiramidalni poremećaji (KURIAN i sur., 2011.).

Dok primarne poremećaje čine promjene u sintezi; nedostatak kofaktora i enzima potrebnih za stvaranje monoamina, sekundarni poremećaji su karakterizirani deplecijom dopamina i serotonina, te značajnim smanjenjem razine homovalinilične kiseline (HVA). U te poremećaje ubrajamo: perinatalnu asfiksiju, poremećaje u metabolizmu folata, fenilketonuriju, Lesch – Nyhanovu bolest, mitohondrijske poremećaje, epilepsiju, pontocerebelarnu hipoplaziju, sindrom opsoklonusa- mioklonusa, leukodistrofije, Rettov sindrom i neke neuropsihijatrijske poremećaje (KURIAN i sur., 2011.).

Parkinsonizmi (Tablica 1.) obuhvaćaju sve neurološke poremećaje karakterizira mišićna rigidnost, tremor i poremećena motorika.

Tablica 1. Parkinsonizmi (DAUER i PRZEDBORSKI, 2003.)

Primarni parkinsonizam
Parkinsonova bolest (sporadična, nasljedna)
Sekundarni parkinsonizmi
Uzrokovani lijekovima: antagonistima i depletorima dopamina
Hemiatrofija-hemiparkinsonizam
Hidrocefalus
Hipoksija
Zarazni: postencefalitični sindrom
Metabolički: disfunkcija paraštitne žlijezde
Uzrokovani toksinima: Mn, CO, MPTP, cijanidi
Trauma
Tumor
Vaskularni uzroci: multiinfarkti
Parkinson – plus sindromi

Degeneracija kortikalno-bazalnih ganglija
Sindromi demencije: Alzheimerova bolest, bolest difuznih Lewyevih tjelešaca, frontotemporalna demencija
Lytico – Bodig
Sindromi multiple atrofije: strijatonigralna degeneracija, sindrom Shy-Drager, sporadična olivopontocerebelarna degeneracija, bolest motoričkih neurona
Progresivna palidalna atrofija
Progresivna supranuklearna paraliza
Nasljedne neurodegenerativne bolesti
Hallervorden – Spatzova bolest
Huntigtonova bolest
Lubag (recesivna X- vezana distonija - parkinsonizam)
Mitohondrijske citopatije sa nekrozom strijatuma
Neuroakantocitoze
Wilsonova bolest

Ovi su poremećaji posljedica deplecije dopamina u bazalnim ganglijima, pa se u liječenju Parkinsonove bolesti koriste zamjene za dopamin, npr. levodopa. Riječ je o simptomatskoj terapiji (MARDSEN, 1990.) koja, nakon nekoliko godina kod mnogih pacijenata uzrokuje nevoljne pokrete, tzv. diskinezije. Diljem svijeta istražuju se neuroprotektivne tvari koje bi mogle usporiti ili možda zaustaviti razvoj bolesti. Najveća prepreka u razvoju novih neuroprotektivnih lijekova je nepoznavanje molekularnih mehanizama koji dovode do neurodegeneracije. Etiologija bolesti nije poznata, iako se pretpostavlja da ulogu u njenom razvoju imaju genetički i toksični čimbenici, bilo da se radi o zagađivačima iz okoliša ili endogenim toksinima. Ovi potonji mogu biti rezultat metabolizma dopamina koji generira reaktivne kisikove radikale (COHEN, 1984.). Smatra se da kisikovi radikali i poremećena oksidativna fosforilacija imaju važnu ulogu u patogenezi Parkinsonove bolesti, baš kao i odlaganje nakupina pogrešno savijenih proteina (npr. amiloid mutiranog α sinukleina) u mozgu (DAUER i PRZEDBORSKI, 2003.). Razlog nakupljanju amiloida α sinukleina je nedostatna ubikvitinacija koja može biti posljedica mutacije gena za parkin, E3 – ubikvitin ligazu koja olakšava razgradnju pogrešno savijenih proteina (SHIMURA i sur., 2000.). Mutacije gena za parkin, α -sinuklein, UCHL1 (ubikvitin karboksil-terminalnu hidrolazu), DJ1 (s parkinom povezan protein uključen u oksidacijski stres) i PINK1 (serin treonin kinazu)

povezuju se sa mladenačkim oblicima Parkinsonove bolesti (KITADA i sur., 1998.; LUCKING i sur., 2000.; ERIKSEN i sur., 2005.). Točkaste mutacije α sinukleina dovode do pretjeranog unutarstaničnog nakupljanja i formacije protofibrila.

Osnovno patomorfološko obilježje Parkinsonove bolesti je gubitak nigrostrijatalnih dopaminergičkih neurona i pojava citoplazmatskih inkluzija, tzv. Lewyevih tjelešaca u neuronima (MARDSEN, 1990.). Tijela nigrostrijatalnih neurona nalaze se u kompaktnom dijelu supstancije nigre (SNc) i projiciraju se u putamen. Ovi neuroni sadržavaju neuromelanin i imunorektivni su na tirozin hidroksilazu (TH), enzim karakterističan za biosintezu katekolamina (JELLINGER, 1991.), pa njihov gubitak dovodi do gubitka pigmentacije SNc.

Oštećene su i jezgre *locus ceruleus*, dorzalne jezgre vagusa (JELLINGER, 1991.), središnja jezgra amigdale (*nucleus centralis amygdalae*), jezgre koje se projiciraju u koru velikog mozga i jezgre koje reguliraju endokrinu i autonomnu funkciju (BRAAK i sur., 1995.), pa i u dijelovima mozga bez neuromelanina i katekolaminergičkih neurona (JELLINGER, 1991.). Još jedna karakteristična patološka promjena je pojava Lewyevih tjelešaca, eozinofilnih citoplazmatskih inkluzija u neuronima SNc. Lewyeva tjelešca mogu se sastojati od α sinukleina vezanog za ubikvitin, neurofilamentni protein i alfa B kristalin, a tu se mogu nalaziti i tau proteini (ISHIZAWA i sur., 2003.).

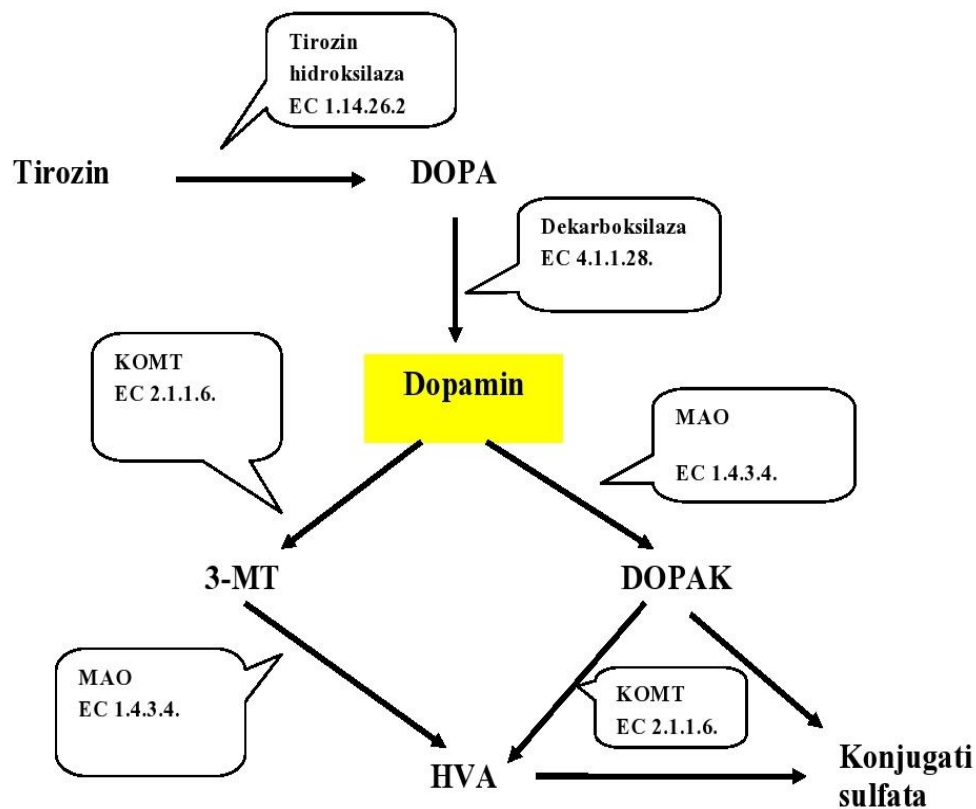
Gubitak neurona u SNc javlja se paralelno sa smanjenom ekspresijom glasnike RNK (gRNK) za dopaminski transporter (DAT) (UHL i sur., 1994.), te deplecijom dopamina koja je najizraženija u dorzolateralnom putamenu. Uz navedeno, karakterističan je gubitak vezikularnog monoaminskog prijenosnika tipa 2 (VMAT2) u putamenu, *nucleusu caudatusu* i *nucleusu accumbensu*, a budući da se dopamin jedino putem ovog presinaptičkog prijenosnika prenosi iz citoplazme u sinaptičke mjehuriće, gubitak VMAT2 dodatno doprinosi depleciji dopamina. Logično, osim deplecije dopamina značajno su smanjene razine njegovih metabolita 3,4 – dihidroksfeniloctene kiseline (DOPAK) i homovanilične kiseline (HVA) i aktivnost tirozin hidroksilaze (TH) i DOPA karboksilaze, dok aktivnost katehol-o-metiltransferaze (KOMT) i monoamin oksidaze-B (MAO-B) nije smanjena (GERLACH i RIEDER, 1996.).

Osim u bazalnim ganglijima i mezokortikalnim (*gyrus cinguli*, hipokampus, frontalna i entorhinalna kora) i mezolimbickim projekcijama (hipotalamus, *nucleus accumbens*, *corpus amygdaloideum*, *area olfactoria*) ventralnog tegmentalnog područja (VTA) (GERLACH i RIEDERER, 1993.), razina dopamina i aktivnost TH smanjene su i u nadbubrežnoj žlijezdi (CARMICHAEL i sur., 1988.) i mrežnici (HARNOIS i DIAPOLO, 1990.) pacijenata

oboljelih od Parkinsonove bolesti. Pomjene u razini dopamina popraćene su i smanjenjem razine noradrenalina i serotonina.

Klinički bolest karakterizira trijada simptoma: akinezija, ukočenost i tremor, no sva tri simptoma ne moraju biti jednako izražena. Za procjenu težine bolesti nekada se koristila ocjenska ljestvica po Hoehnu i Yahru (HOEHN i YAHR, 1967.), dok se danas najviše koristi unificirana ocjenska ljestvica za Parkinsonovu bolest (RAMAKER i sur., 2002.). Uz prethodno navedene simptome javljaju se i vegetativni simptomi; slinjenje, začep, seboreja, posturalne anomalije, naleti vrućine, znojenje. U početku su simptomi ograničeni na kretanje dok se kasnije javljaju kognitivni problemi i problemi sa ponašanjem, demencija i depresija (GERLACH i RIEDERER, 1996.). U većini slučajeva bolest se javlja u ljudi starijih od 50 godina. Kako je navedeno, ne postoji lijek za Parkinsonovu bolest. U simptomatskom liječenju se koriste levodopa u kombinaciji sa inhibitorom dopa karboksilaze ili inhibitorom KOMT, agonisti dopamina i inhibitori MAO-B (NACIONALNI CENTAR ZA KRONIČNE BOLESTI, 2006.). Levodopa se primjenjuje već posljednjih 30 godina u ranom simptomatskom liječenju Parkinsonove bolesti. Levodopa se uz prisustvo dopa dekarboksilaze pretvara u dopamin (dopamin ne može prijeći krvno-moždanu barijeru barijeru, levodopa može). Da bi se reducirao periferni metabolizam levodope, ona se kombinira sa perifernim inhibitorom dopa dekarboksilaze (npr. karbidopom ili benserazidom), što povećava količinu levodope koja prelazi krvno-moždanu barijeru. Iako liječenje levodopom u početku daje dobre rezultate, kasnije se razviju motoričke smetnje; nevoljni pokreti, diskinezije poput atetoze i distonije, kao i oscilacije učinka levodope. U ranim stadijima bolesti mogu se koristiti agonisti dopamina, pogotovo agonisti koji nisu derivati ergotina jer imaju manje kardiovaskularnih nuspojava; pramipeksol i ropinirol. Mogu se koristiti i MAO-B inhibitori (selegilin, lazabemid, rasagilin). U liječenju ljudi sa posturalnim tremorom mogu se koristiti i beta blokatori (propranolol i oksprenolol), ali se ne preporučuju kao prvi lijekovi izbora. Kao prvi izbor se ne preporučuju ni antivirusni lijek amantadin niti antikolinergici (NACIONALNI CENTAR ZA KRONIČNE BOLESTI, 2006.), koji se mogu koristiti u ranom stadiju bolesti. Antikolinergici su se u liječenju Parkinsonove bolesti koristili od 19. stoljeća, a danas se mogu (najčešće triheksifenidil i orfenandrin) koristiti u ranom stadiju kod mladih ljudi sa ozbiljnim tremorom. Osnovni nedostaci navedenih lijekova su ograničena učinkovitosti i mogućnost izazivanja neuropsihijatrijskih nuspojava. Zanimljiv rezultati kod pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti postigli su se aplikacijom malenog proteina, neurotrofnog glijalnog čimbenika, GDNF direktno u putamen (GILL i sur., 2000.), no u 2. fazi kliničkih ispitivanja kod pacijenata nije bilo poboljšanja

nakon 6 mjeseci (LANG, 2006.). Slični neuspjeh dogodio se i u kliničkim pokusima sa implantacijom kultiviranih stanica mrežnice (GROSS i sur., 2011.), transferom gena za neurturin (MARKS i sur., 2010.) i gena za dekarboksilazu glutaminske kiseline (LEWITT i sur., 2011.). Zanimljive rezultate daje duboka stimulacija mozga, posebno subtalamične jezgre i globusa palidusa (VITEK, 2002.). Ovaj kirurški postupak ublažava neke simptome Parkinsonove bolesti, no ne bez nuspojava i uz to ne zaustavlja progresiju bolesti (VITEK, 2002.).



Slika 1. Metabolizam dopamina

2.2. Životinjski modeli Parkinsonove bolesti

U istraživanju patogeneze Parkinsonove bolesti i potencijalnih lijekova koriste se brojni životinjski modeli koji mogu biti inducirani izazivanjem genetskih mutacija ili raznim lijekovima i neurotoksinima: rezerpinom, haloperidolom, MPTP-om, parakvatom, rotenonom, 6 – hidroksidopaminom (6-OHDA) i metamfetaminom.

Rezerpinski i haloperidolski model ubrajaju se u farmakološki inducirane poremećaje dopaminske neurotransmisije, dok ostale navedene tvari uzrokuju oštećenja dopaminskog nigrostrijatalnog sustava.

CARLSSON i suradnici (1957.) su ustanovili da se sustavnim davanjem rezerpina može kod štakora izazvati akinezija koja se može oslabiti sa levodopom. Rezerpin smanjuje motoričku aktivnost u štakora, izaziva akineziju, hipokineziju i katepsiju te tremor. Rezerpin ireverzibilno blokira VMAT (HENRY i SCHERMAN, 1989.), što dovodi do deplecije monoaminskih neurotransmitora u živčanom sustavu. Rezerpinski model akinezije na NMRI miševima koji su koristili CARLSSON i CARLSSON (1989.) uključuje i.p. aplikaciju 10 mg/kg rezerpina 18 h i 500 mg/kg α -metil-p-tirozina, inhibitora sinteze dopamina, 2 h prije procjene motoričke aktivnosti. Motorička aktivnost se mjeri s elektroničkim uređajem kao prosječna aktivnost životinje u određenom vremenu (CARLSSON i CARLSSON, 1989.).

Neuroleptik haloperidol je derivat butirofenona i blokator dopaminskih receptora tipa 1 i 2 (D1/D2), inverzni agonist D2-D4 receptora (LEYSEN i sur., 1992.; LEYSEN i sur., 1994.; MALMBERG i sur., 1998.), a danas se zna da djeluje i na čitav niz drugih skupina receptora; sigma (COLAFUBO i sur., 2004.; COBOS i sur., 2007.), serotoninске, histaminske, muskarinske i α adrenergične receptore (KROEZE i sur., 2003.). Haloperidol izaziva katepsiju, definiranu kao odgođeno ili odsutno ispravljanje abnormalnog položaja ekstremiteta (FOG, 1972.), i relativno jednostavnu za promatranje u pokusima na štakorima (GERLACH i RIEDERER, 1996.). Haloperidol ostvaruje antipsihotični učinak blokadom D2 receptora u mezolimbičkom putu, dok je katepsija kao nuspojava uzrokovana blokadom istih receptora u nigrostrijatalnom putu, a karakteriziraju je akinezija, rigor i tremor ekstremiteta. Dio živčanog sustava koji upravlja voljnim pokretima funkcionalno je inaktivan dok je dio koji upravlja nevoljnim pokretima, kao što su refleksno ispravljanje držanja i održavanja ravnoteže ipak aktivan. Lijekovi koji se koriste u simptomatskom liječenju Parkinsonove bolesti učinkoviti su i u slučaju katepsije uzrokovane haloperidolom, odnosno imaju antikateptični učinak; antikolinergici, dopaminski agonisti, lijekovi koji potiču otpuštanje dopamina i levodopa (HAEFELY, 1978.; GERLACH i RIEDERER, 1996.). Katepsiju uzrokovanu haloperidolom (0,5 mg/kg i.p.) mogu antagonizirati antagonisti NMDA receptora, amantadin i MK-801, i taj je učinak ovisan o dozi (DANYSZ i sur., 1994.). Osim katepsije, haloperidol u nižim dozama (0,15 ili 0,3 mg/kg i.p.) može izazvati akineziju i bradikineziju nalik onima koje se javljaju kod oboljelih od Parkinsonove bolesti (SCHMIDT i sur., 1992.). Antagonisti dopaminskih receptora, kao što su haloperidol, metoklopramid, SCH 23390, se mogu koristiti u modelima preosjetljivosti na dopaminske agoniste jer

nekoliko dana nakon blokade dopaminskih receptora, receptori se „umnažaju“ (po broju ili osjetljivosti), pa se na taj način potencira djelovanje agonista. Iako su se u većini modela dopaminske preosjetljivosti antagonisti dopaminskih receptora primjenjivali kronično, npr. 21 dan (PARASHOS i sur., 1989.; MARIN i sur., 1993.; BRAUN i sur., 1997.), u pokusima na miševima (JELOVAC, 1998.) to je potenciranje postignuto 4 dana nakon primjene samo jedne doze haloperidola (5 mg/kg, i.p.). Isti bi protokol i na štakorima mogao izazvati preosjetljivost na metamfetamin, pa time i pojačanje njegovog neurotoksičnog djelovanja.

MPTP je 90-ih bio najviše korišten model Parkinsonove bolesti. Početkom 80-ih godina u Kaliforniji je prilikom „kućne proizvodnje“ „sintetičkog heroina“, desmetilprodina (1-metil-4-fenil-4-propionoksipiperidin, MPPP), došlo do kontaminacije sa MPTP-om, pa je parkinsonogeni učinak MPTP- a prvi put opisan u heroinskih ovisnika (DAVIS i sur., 1979.). Za neurotoksični učinak zapravo je odgovoran metabolit MPTP-a, 1-metil-4-fenilpiridin (MPP⁺), koji nastaje u reakciji kojoj posreduje MAO-B. MPP⁺ ometa oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijima, uzrokuje depleciju ATP-a i smrt stanice. Na djelovanje MPTP-a su osjetljivi ljudi i miševi, za razliku od štakora i zamorčića, pa se tako za ovaj model koriste miševi ili primati (rezus majmuni i marmozeti). Neurotoksično djelovanje varira s obzirom na vrstu i dob životinje te s obzirom na eksperimentalni dizajn (put aplikacije), a prisutne su i intraindividualne razlike (GERLACH i RIEDERER, 1996.). MPTP u majmuna uzrokuje poremećaje motorike nalik onima kod ljudi od kojih su najizraženiji akinezija i ukočenost. U miševa se prvih 15-30 minuta nakon aplikacije MPTP-a javljaju znakovi otrovanja: midrijaza, piloerekcija, hipersalivacija i klonični napadaji. Motoričke smetnje nisu jako izražene, ali je smanjena lokomotorna aktivnost. No, kada se nakon MPTP-a mišu da i haloperidol (0,2 mg/kg) javljaju se katalepsija, akinezija i somatosenzorna dezorijentacija. Motoričke smetnje mogu biti prisutne i do 5 mjeseci nakon aplikacije MPTP-a (WEIHEMULLER i sur., 1989.).

6 – OHDA ne može prijeći krvno-moždanu barijeru ukoliko se aplicira sustavno, pa se zato stereotaksijski unilateralno ili bilateralno injicira u strijatum. Nakon bilateralne injekcije 6 – OHDA u strijatum štakora dolazi do odumiranja velikog broja dopaminergičkih stanica u SN, kao i do izrazite deplecije dopamina u strijatumu, posljedice čega su akinezija, afagija i adipsija i visoka smrtnost. Zbog potonjeg se češće primjenjuju unilateralne injekcije 6 – OHDA, kada se oštećuju dopaminergičke stanice samo na jednoj strani mozga. Kod štakora se javljaju asimetrične motoričke promjene, a nakon davanja levodope ili agonista dopamina karakteristično je kretanje u krug. Levodopa i agonisti dopaminskih receptora (npr. bromkriptin) uzrokuju kontralateralno kruženje – životinja se okreće u smjeru neoštećene strane mozga. Lijekovi koji potiču otpuštanje dopamina (npr. amfetamin i amantidin)

uzrokuju ipsilateralno kruženje, odnosno, životinja se okreće u smjeru oštećene strane mozga (GERLACH i RIEDERER, 1996.). Mehanizam neurotoksičnog djelovanja sličan je onom kod MPP⁺-a, a temelji se na oksidacijskom stresu. Inače, smatra se da endogeni 6-OHDA nastaje oksidacijom dopamina na sinapsama. Tako neurotoksične doze metamfetamina dovode do pretjeranog otpuštanja dopamina i njegovog zadržavanja na sinapsama zbog čega isti spontano oksidira u 6-OHDA koji dalje dovodi do oštećenja (peroksidacije) lipidnih membrana neurona (KITA i sur., 2000.).

Zbog neurokemijskih promjena uzrokovanih neurotoksičnim dozama metamfetamina, kao što su dugotrajna deplecija dopamina i oštećenje dopaminergičkih i serotonergičkih živčanih završetaka, davanjem visokih doza metamfetamina pokusnim životinjama mogu se izazvati modeli poremećaja neurotransmisije monoamina nalik autizmu, sindromu automutilacije, Lesch-Nyhan sindromu i Parkinsonovoj bolesti (KITA i sur., 2000.). Za razliku od MPTP-a, metamfetamin dovodi do neurodegeneracije djelujući selektivno na neurite (aksone ili dendrite) i ne oštećujući direktno tijela dopaminergičnih neurona (RICAURTE i sur., 1982.). Iako nisu idealni, tj. ne oponašaju navedene sindrome i bolesti u potpunosti, ovakvi životinjski modeli značajno pomažu u razumijevanju mehanizama uključenih u razvoj patoloških promjena koje po karakteristikama odgovaraju patološkim promjenama kod ljudi, te pomažu u pronalaženju odgovarajuće farmakoterapije za navedene poremećaje. Visokim dozama metamfetamina se također može izazvati dugotrajna deplecija dopamina i oštećenje dopaminergičkih završetaka u strijatumu. Kako se smatra da je za oštećenja živaca odgovoran 6-OHDA koji nastaje autooksidacijom dopamina, isti se spoj, koristi u izazivanju za sada standardnog modela Parkinsonove bolesti tako što se stereotaksijski injicira unilateralno u strijatum štakora. No, uz to i zbog navedenog neurotoksičnog djelovanja metamfetamin je također koristan u izazivanju modela Parkinsonove bolesti (GERLACH i RIEDERER, 1996.).

2.3. Neurotoksičnost metamfetamina

Mnogi neurotoksični učinci metamfetamina opisani su u ljudi koji uzimaju ili su uzimali ovaj psihostimulans. Prema UREDU UJEDINJENIH NARODA ZA DROGE I KRIMINAL (2007.) metamfetamin je po broju korisnika odmah iza kanabisa; procjenjuje se da ga uzima između 15 i 16 milijuna ljudi diljem svijeta, što nadmašuje broj korisnika heroina i kokaina vjerojatno zbog niskih troškova proizvodnje i dugotrajnosti učinka.

Metamfetamin izaziva euforiju, hiperseksualnost, povećava produktivnost te smanjuje tjeskobu (MEREDITH i sur., 2005.; HOMER i sur., 2008.). Ovi učinci traju nekoliko sati, budući da je poluvijek eliminacije metamfetamina 10 do 12 sati (SCHEPERS i sur., 2003.). No, zloupotreba metamfetamina može imati negativne posljedice, oštećenje središnjeg živčanog sustava, promjene u ponašanju i kognitivne smetnje (MURRAY, 1998.; ALBERTSON i sur., 1999.; BARR i sur., 2006.; SCOTT i sur., 2007.). Kao promjene u ponašanju opisane su razdražljivost, agresivnost, a od organskih smetnji tahikardija, hipertenzija i hipertermija (LYNCH i HOUSE, 1992.; MURRAY, 1998.; ALBERTSON i sur., 1999.; MEREDITH i sur., 2005.). Kod akutnih otrovanja visokim dozama opisani su za život opasna hipertermija ($t > 41\text{ }^{\circ}\text{C}$), zatajenje bubrega i jetre, aritmije, srčani udari, cerebrovaskularna krvarenja, moždani udari i napadaji (ALBERTSON i sur., 1999.; PEREZ i sur., 1999.; DARKE i sur., 2008.) Kod kroničnog uzimanja metamfetamina javljaju se tjeskoba, depresija, agrasivnost, izolacija, psihoze, promjene raspoloženja i psihomotorni poremećaji (SCOTT i sur., 2007.; DARKE i sur., 2008.; HOMER i sur., 2008.)

Postmortalne analize kod kroničnih korisnika metamfetamine pokazale su smanjenu razinu dopamina, tirozin hidroksilaze (TH) i transportera dopamina (DAT) u dorzalnom strijatumu; *nucleusu caudatus* i *putamenu* (CPu) i *nucleusu accumbensu* (WILSON i sur., 1996.; MOSZCZYNSKA i sur., 2004.; KITAMURA i sur., 2007.) te smanjenje serotonina (5-HT) u orbitofrontalnoj i okcipitalnoj kori (KISH i sur., 2008.). U *nucleusu caudatusu* i frontalnoj kori izmjerene su povišene razine produkata lipidne peroksidacije, kao što su 4-hidroksinonenal (4-HNE) i malondialdehid (MDA) (FITZMAURICE i sur., 2006.), dok su razine antioksidansa; Cu/Zn superoksid dismutaze, glutationa i mokraćne kiseline bile povišene u *nucleusu caudatusu* (MIRECKI i sur., 2004.).

Metamfetamin uzrokuje dugotrajnu depleciju serotonina i strijatalnog dopamina u CPu i SNc te oštećenje dopaminergičkih i serotoninergičkih živčanih završetaka. To se očituje kao deplecija dopamina i 5-HT i njihovih prijenosnika DAT (dopamina), SERT (serotonina) u mozgu (KRASNOVA i CADET, 2009.). Važnu ulogu u neurotoksičnom djelovanju metamfetamina imaju sigma (σ) receptori koji se nalaze u mozgu, plućima i srcu (MATSUMOTO i sur., 2003.). U mozgu se nalaze na dopaminergičkim neuronima a njihova aktivacija potiče sintezu i oslobađanje dopamina (BOOTH i BALDESSARINI, 1991.; BASTIANETTO i sur., 1995.; WEISER i sur., 1995.). Pretpostavlja se da je neurotoksičan učinak metamfetamina posredovan σ -2 receptorima, odnosno da u neurotoksičnim dozama

metamfetamin djeluje kao agonist σ -2 receptora i antagonist σ -1 receptora, dok u nižim, stimulativnim dozama, djeluje kao agonist σ -1 receptora (KAUSHAL i MATSUMOTO, 2011.).

Metamfetamin uzrokuje pretjerano oslobađanje dopamina djelovanjem na DAT ali i na VMAT2 (vezikularni transporter monoamina tipa 2). To pretjerano oslobađanje dopamina u citoplazmu i sinapsu smatra se početkom kaskade neurotoksičnih procesa (STEPHANS i YAMAMOTO, 1994.; RIDDLE i sur., 2006.). Vezikularni transporteri monoamina (VMAT) su odgovorni za spremanje neurotransmitera; dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina u sinaptičke vezikule (mjehuriće). Iako je primarna funkcija VMAT-a otpuštanje neurotransmitera putem mjehurića, oni mogu izbacivati toksine sa mjesta djelovanja u citoplazmi. U slučaju dopamina, VMAT2 sudjeluje u neurotransmisiji i neuroprotekciji jer dopamin koji zaostaje u citoplazmi oksidira i uzrokuje oksidacijski stres. Tako štetni učinci egzogenih toksikanata na dopaminske neurone, kao što je MPTP, mogu biti ublaženi sa pojačanjem aktivnosti VMAT2. Uz to, vezikularni transporter tipa 2 (VMAT2) je definiran kao potencijalna ciljna molekula u liječenju ovisnosti o metamfetaminu.

Prema GONÇALVES i suradnicima (2010.) citotoksičnost metamfetamina proizlazi iz nekoliko mehanizama: ekscitotoksičnosti posredovane glutatomom, disfunkcije mitohondrija (stres endoplazmatskog retikuluma) i oksidacijskog stresa. Metamfetamin uzrokuje i hipertermiju koja pojačava neurotoksične promjene (BOWYER i sur., 1994.). U metamfetaminom oštećenim dijelovima mozga dokazane su aktivirane mikroglia stanice (THOMAS i sur., 2004.; SEKINE i sur., 2008.), no uloga mikroglia stanica u neurotoksičnim mehanizmima još nije razjašnjena.

Predložena su dva osnovna mehanizma putem kojih metamfetamin djeluje toksično na strijatum; prvi se odnosi na pojačano oslobađanje dopamina koji zaostaje na sinapsama i autooksidira u 6 - hidroksidopamin koji potiče kaskadnu reakciju oksidacije i lipidne peroksidacije, te oštećenja lipidnih membrana (SEIDEN i VOSMER, 1984.), a drugi se odnosi na pojačano sekundarno otpuštanje glutamata u strijatumu putem kortiko-strijatotalamo-kortikalne negativne sprege (CARLSSON i CARLSSON, 1990.). Ovaj potonji mehanizam aktivacije NMDA receptora povezan je sa stimulacijom nNOS, stvaranjem NO i nakupljanjem cGMP-a u živčanim stanicama (GARTHWAITE, 1991.; SNYDER, 1992.). Prvi uvedeni modeli neurotoksičnosti metamfetamina na glodavcima uključivali su davanje vrlo visokih doza metamfetamina (50 ili 100 mg/kg) dva puta na dan tijekom četiri ili više dana (WAGNER i sur., 1979.; RICAURTE i sur., 1980.; WAGNER i sur., 1980.; BITTNER i

sur., 1981.; RICAURTE i sur., 1982.). Koristile su se i umjerene doze od 15 mg/kg koje bi se davale svakih 6 sati tijekom 24 sata (HOTCHKISS i GIBB; 1979.; HOTCHKISS i sur., 1979.). Ove su doze bile učinkovite u snižavanju dopamina u strijatumu za 30-40%, ali je mortalitet štakora bio čak između 40-50% (WAGNER i sur., 1979.; RICAURTE i sur., 1980.; WAGNER i sur., 1980.; BITTNER i sur., 1981.; RICAURTE i sur., 1982.). Kasnije se počeo koristiti model u kojem bi se miševima aplicirale četiri doze od 10 mg/kg s razmakom od 2 h (SONSALLA i HEIKKILA, 1988.). Ovo je također davalo željene rezultate, a u štakora je snižavao strijatalni dopamin za 60%. Iako su se ovi modeli pokazali korisnima, višestruko doziranje metamfetamina komplicira ispitivanje neuroprotektivnih učinaka određenih tvari. Teško je odrediti koliko puta se i kada u odnosu na četiri doze metamfetamina mora dati tvar da bi imala optimalan neuroprotektivni učinak (FUKUMURA i sur., 1998.). Neurotoksični model uzrokovan sa jednom visokom dozom (10-40 mg/kg) praktičniji je u određivanju intervala doziranja u odnosu na aplikaciju metamfetamina i veličina doza potencijalno neuroprotektivnih tvari (FUKUMURA i sur., 1998.). Jedna doza metamfetamina može izrazito smanjiti razine dopamina, 5-HT i TH jednako učinkovito kao i više doza, s time da je smrtnost životinja u pokusu značajno smanjena (FUKUMURA i sur., 1998.).

Kako bi se stekao uvid u brojnost podataka i modela, značajan dio dosadašnjih istraživanja neurotoksičnosti metamfetamina na štakorima prikazana su u tablici 2. (KRASNOVA i CADET, 2009.).

Tablica 2. Štakorski modeli metamfetaminske neurotoksičnosti korišteni u dosadašnjim istraživanjima (KRASNOVA i CADET, 2009.)

Doziranje metamfetamina	Vrijeme nakon aplikacije metamfetamina	Tkiva	Dobiveni rezultati	Literatura
15 mg/kg, 9 puta, svakih 6 h	36 h – 13 dana	Strijatum	↓TH aktivnost,	KOGAN i sur., 1976.
	36 h – 3 dana	<i>Substantia nigra</i>	↓DA razina	
15 mg/kg, 5 puta	1- 30 dana	Strijatum	↓TH aktivnost,	HOTCHKISS i sur., 1979.
	1-7 dana		↓TPH aktivnost	
12.5 ili 25 mg/kg, 2 puta/dan tijekom 30 dana	2 tjedna	<i>Nucleus caudatus</i>	↓DA razina	WAGNER i sur., 1979.
15 mg/kg, 4 puta, svaka 2 h	2, 4, 15 i 30 dana	Strijatum	↓TH aktivnost,	HOTCHKISS i GIBB, 1980.
		Strijatum, hipokampus	↓TPH aktivnost	
15 mg/kg, 5 puta, svakih 6 h	7 dana	Strijatum, <i>bulbus olfactorius</i>	↓TH aktivnost,	MORGAN i GIBB, 1980.
	12 h- 30 dana	Strijatum, <i>bulbus olfactorius, nucleus accumbens</i>	↓DA razina	
	12 h- 30 dana		↓TPH aktivnost	
50 mg/kg, 2 puta/dan tijekom 4 dana	3 tjedna	Strijatum, kora, <i>substantia nigra</i> , mezolimbicko područje	↓DA razina	RICAURTE i sur., 1980.
		Strijatum, kora, septum, amigdala, hipotalamus, <i>substantia nigra</i>	↓5-HT aktivnost	
25 ili 50 mg/kg, 2 puta/dan tijekom 4 dana	2 tjedna	<i>Nucleus caudatus</i>	↓DA razina ↓ mjesta unosa DA	WAGNER i sur., 1980.

50 mg/kg tijekom 30 dana	2-8 tjedana	<i>Nucleus caudatus</i>	↓DA razina	
15 mg/kg, 6 puta sa razmakom od 6 h	36 h i 110 dana	Strijatum, hipokampus, kora, <i>nucleus accumbens</i>	↓TH aktivnost, ↓TPH aktivnost, ↓5-HT aktivnost	BAKHIT i sur., 1981.
50 mg/kg, 2 puta/dan tijekom 4 dana	6 mjeseci	<i>Nucleus caudatus</i>	↓DA razina	BITTNER i sur., 1981.
15 mg/kg, 5 puta, svakih 6 h	6 i 11 dana	Strijatum	↑Natečeni živci	LOREZ, 1981.
50 mg/kg, 3 puta svakih 8 h	4 dana 3 tjedna	Strijatum, <i>nucleus accumbens</i> Strijatum	Degeneracija živaca ↓TH aktivnost	RICAURTE i sur., 1982.
15 mg/kg, 5 puta, svakih 6 h Predtretman sa 2.5 mg/kg 5 puta, svakih 6 h, pa sa 5 i 7.5 mg/kg, 5 puta, svakih 6 h, nakon čega se daje 15 mg/kg, 5 puta, svakih 6 h	18 h nakon zadnje doze	Strijatum	↓DA razina, ↓TH aktivnost, ↓TPH aktivnost, ↓5-HT razina ↓DA razina, ↓TPH, ↓5-HT razina	SCHMIDT i sur., 1985.b
100 mg/kg, jednom	2 dana 2 tjedna	Somatosenzorna kora	Degeneracija živaca ↓5-HT razina	COMMINS i SEIDEN, 1986.
15 mg/kg, 4 puta, svaka 3 h	3 dana	Strijatum Kora, hipokampus	↓DA razina, ↓TH aktivnost, ↓5-HT razina	GREEN i sur., 1992.
50 mg/kg, 3 puta, svakih 8 h	12 tjedana	<i>Nucleus caudatus</i> , putamen, <i>nucleus accumbens</i> , <i>bulbus olfactorius</i> Somatosenzorna kora, amigdala, hipokampus	↓DA razina, ↓5-HT razina ↓5-HT razina	RICHARDS i sur., 1993.

7.5 mg/kg, 3 puta, svaka 2h ili 2 mg/kg tijekom 7 dana, pa 7.5 mg/kg, 3 puta, svaka 2h	4 dana	Strijatum, prefrontalna kora Strijatum	↓DA razina, ↓5-HT razina ↓DA razina	STEPHANS i YAMAMOTO, 1996.
12.5 mg/kg, 4 puta, svaka 2 h	48 i 237 dana 48, 139 i 237 dana 48 i 139 dana	<i>Nucleus caudatus</i> <i>Nucleus caudatus</i> , hipokampus Medijalna prefrontalna kora	↓DA razina, ↓5-HT razina ↓5-HT razina	FRIEDMAN i sur., 1998.
40 mg/kg, jednom	12 h – 10 dana 10 dana	<i>Nucleus caudatus</i> , putamen	↓DA razina, ↓5-HT razina, ↓TH razina proteina ↑GFAP proteini	CAPPON i sur., 2000.
5-10 mg/kg, 4 puta, svaka 2	3 tjedna	Strijatum <i>Substantia nigra</i>	↓DA razina, ↓TH mRNA	CHAPMAN i sur., 2001.
15 mg/kg, 4 puta, svaka 2 h	3, 5 ili 14 dana	Strijatum, nucleus accumbens Strijatum, <i>nucleus accumbens</i> , kora, prednja cingularna kora, hipokampus, amigdala, talamus, <i>substantia grisea centralis</i> Strijatum, <i>substantia grisea centralis</i>	↓DAT vezanje ↓5-HT vezanje ↓VMAT2 vezanje	GUILARTE i sur., 2003.
10 mg/kg, 4 puta, svaka 2 h 2.5 mg/kg, 4 puta, svaka 2 h, zatim 5 ili 7.5 mg/kg, 4 puta, svaka 2h, nakon čega se daje 10 mg/kg, 4 puta, svaka 2 h	7 dana nakon posljednje doze	Strijatum Frontalna kora, hipokampus Hipokampus	↓DA, ↓5-HT razina ↓5-HT razina ↓5-HT razina	JOHNSON-DAVIS i sur, 2003.

6 mg/kg, 4 puta, svaka 2h Doze rastu od 0.1 do 4.0 mg/kg tijekom 14 dana, zatim se daje 6 mg/kg, 4 puta, svaka 2h	3 dana	<i>Nucleus caudatus,</i> putamen	↓DA razina, ↓DAT, ↓VMAT2 vezanje ↓DA razina, ↓VMAT2 vezanje	SEGAL i sur., 2003.
32 mg/kg/dan tijekom 5 dana	2 dana	Kora, hipokampus, talamus, septum, amigdala, hipotalamus Strijatum, <i>nucleus accumbens</i> , kora, prednja cingularna kora, hipokampus, septum, amigdala, hipotalamus	↓ mjesta unosa DA ↓ mjesta unosa 5-HT	ARMSTRONG i NOGUCHI, 2004.
8 mg/kg, 4 puta, svaka 4 h 2 mg/kg, 4 puta, svaka 4 h, 4 i 6 mg/kg, 4 puta, svaka 4 h, zatim 8 mg /kg, 4 puta, svaka 4 h	7 dana nakon posljednje doze 2 h 7 dana 2 h	Strijatum Nemembranske frakcije strijatalnih sinaptosoma	↓DA razina, ↓vezikularni unos DA, ↓VMAT2 imunoreaktivnost	JOHNSON-DAVIS i sur., 2004.
5 mg/kg/dan tijekom 12 dana	4-12 dana ili 6 do 19 dana nakon prve injekcije	Medijalna prefrontalna kora	↓TH imunoreaktivnost ↑ TUNEL- pozitivne stanice	KADOTA i KADOTA, 2004.
40 mg/kg, jednom	24 i 48 h 3 dana	Strijatum	↑ TUNEL- pozitivne stanice, ↓DA razina,	JAYANTHI i sur., 2005.

Progresivno češće injekcije (0.125 mg/kg/injekcija) tijekom 40 dnevnih injekcija (0.125 – 0.25 mg/kg/injekcija) tijekom 40 dana	15 minuta, 6 i 30 dana nakon posljednje doze 6 i 30 dana	<i>Nucleus caudatus,</i> putamen	↓DAT, ↓VMAT2 vezanje ↓D1 vezanje ↓D2 vezanje ↓DA razina	SEGAL i sur., 2005.
5, 10 ili 15 mg/kg, 4 puta, svaka 2 h	1 h 7 dana	Strijatum	↓vezikularni unos DA ↓vezikularni unos DA ↓DA razina	TRUONG i sur., 2005.
Povišenje doza tijekom 14 dana, počevši od 0.1 mg/kg, do 4 mg/kg, te naposljetku 6 mg/kg, 4 puta/dan, svakih 6 h tijekom 11 dana	30 dana 3 i 30 dana	Frontalna kora, hipokampus	↓broj piramidalnih neurona; ↓kalbindin- pozitivni interneuronu, mikrogljalna aktivacija	KUCZENSKI i sur., 2007.
5 mg/kg, 6 puta, svaki sat, ili 10 mg/kg, 3 puta, svaka 2h Početna doza 0.5 mg/kg/dan raste do 14 mg/kg/dan, tijekom 14 dana, zatim 5 mg/kg, 6 puta svakih 1 h ili 10 mg/kg, 3 puta, svaka 2 h	 2 i 24 h	Strijatum Kora, hipokampus Strijatum Kora, hipokampus	↓DA, ↓5-HT, ↓NA razine ↓5-HT, ↓NA razine ↓DA, ↓5-HT, ↓NA razine ↓5-HT, ↓NA razine	GRAHAM i sur., 2008.

2.3.1. Metamfetamin i hipertermija

Hipertermija uzrokovana metamfetaminom je važan 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 dorzalnog strijatumu (*nucleus caudatus, putamen*) (BOWYER i sur., 1992.; BOWYER, 1994.) s time da snižavanje tjelesne temperature ipak nije preduvjet neuroprotekcije. U modelima neurotoksičnosti uzrokovane sa metamfetaminom opravdano je hlađenje životinja vodom ili ledom da bi se postiglo što veće preživljavanje, a smatra se da to ne ometa sam pokus (FUKUMURA i sur., 1998.). Smanjene smrtnosti u pokusu povećava točnost rezultata jer se time sprječava gubitak istih. Kada kod štakora tjelesna temperatura prijeđe 41,5 °C smatra se da dolazi do nepovratnog oštećenja monoaminskih živaca te da se tada više ne može utjecati na neurotoksičnost (BOWYER i HOLSON, 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) apliciran štakorima prije četiri doze metamfetamina (4 x 10 mg/kg s.c.) smanjuje gubitak dopamina u strijatumu ali ne utječe na hipertermiju već sprječava razvoj oksidacijskog stresa (CAPPON i sur., 1996.). Rezerpin uzrokuje hipotermiju te smanjuje hipertermiju uzrokovanu metamfetaminom ali ne smanjuje neurotoksičnost metamfetamina (ALBERS i SONSALLA, 1995.).

U pojavi hipertermije uzrokovane metamfetaminom posreduju σ (sigma) receptori koji se nalaze u hipotalamasu i moduliraju tjelesnu temperaturu (GUNDLACH i sur., 1986.; RAWLS i sur., 2002.). Antagonisti ovih receptora smanjuju hipertermiju, no djeluju neuroprotektivno i na druge načine, budući da σ receptori imaju važnu ulogu u mehanizmima stanične smrti koji su rezultat neurotoksičnog djelovanja metamfetamina (KAUSHAL i MATSUMOTO, 2011.).

2.3.2. Učinak neurotoksičnih doza metamfetamina na ponašanje i lokomotornu aktivnost štakora

Metamfetamin djeluje kao psihomotorni stimulans koji potiče lokomotornu aktivnost kada se primjeni u niskim dozama, a stereotipno ponašanje kada se primjeni u višim dozama (KELLY i sur., 1975.; KUCZENSKI i SEGAL, 1999.). Smatra se da su metamfetaminom uzorkovane stereotipije i lokomotorna hiperaktivnost posredovane dopaminergičkom neurotransmisijom u *nucleusu accumbensu* i *nucleusu caudatusu* (CREESE i IVERSEN, 1974.; KELLY i sur., 1975.; KELLY i IVERSEN, 1976.; LUCOT i sur., 1980.). Metamfetamin povisuje izvanstaničnu koncentraciju dopamina u navedenim regijama mozga dijelom utječući na dopaminski transporter i olakšavajući otpuštanje dopamina u citoplazmu, kao i otpuštanje vezikularnih zaliha dopamina (LIANG i RUTLEDGE, 1982.; SCHMIDT i GIBB, 1985.a; O'DELL i sur., 1991.; SEIDEN i sur., 1993.; CUBELLS i sur., 1994.). No, kod primjene većih doza metamfetamina dolazi do dugotrajne deplecije zaliha dopamina; davanje metamfetamina u dozi od 100 mg/kg tijekom nekoliko dana uzrokovalo je smanjenje u početku povišene lokomotorne aktivnosti kod štakora (LUCOT i sur., 1980.). WALLACE i sur. (1999.) su dokazali da neurotoksična doza metamfetamina (10 mg/kg, i.p., svaka 2 h, 4 injekcije) kod štakora uzrokuje depleciju dopamina i serotonina u *nucleusu accumbensu* i *nucleusu caudatusu* uz smanjenje spontane lokomotorne aktivnosti u odnosu na aktivnost nakon davanja niskih doza metamfetamina (0,5, 1 ili 2 mg/kg) ali izraženijih i dužih stereotipija. Metamfetaminom uzrokovana deplecija dopamina i ponavljana primjena metamfetamina mogu biti uzrokom smanjenja stimuliranog otpuštanja dopamina i razvoja izraženijih stereotipija. Neurotoksičnost uzrokovana metamfetaminom mijenja funkcije posredovane dopaminom pa može poslužiti kao koristan model funkcionalnih posljedica umjerene deplecije dopamina (WALLACE i sur., 1999.). WALLACE i suradnici (2001.) dokazali su da je kod štakora tretiranih neurotoksičnom dozom metamfetamina značajno smanjena samo diurnalna lokomotorna aktivnost, što može upućivati na to da je opravdanije promatranje i analiziranje aktivnosti štakora tijekom dana.

2.3.3. Metamfetamin i poremećaji držanja i ravnoteže

Poremećaji držanja i ravnoteže javljaju se u raznim oblicima kod mnogih neurodegenerativnih bolesti; Parkinsonove bolesti, cerebelarne ataksije, subkortikalne arteriosklerotske encefalopatije, Huntingtonove bolesti i spinobulbarne mišićne atrofije (MARDSSEN, 1990.; GERLACH i RIEDERER, 1996.; DIETZ, 1997.; EBERSBACH i sur., 1999.; GUYENET i sur., 2010.). Navedene bolesti uključuju oštećenje strijatuma, SN, kore velikog mozga, hipokampus, hipotalamusa, talamusa, pa i malog mozga (WALKER, 2007.). Mali mozak, čije jezgre čine noradrenergična vlakna koja se pružaju iz *locusa ceruleusa* i 5-HT živčanih završetaka iz *raphe nuclei* moždanog debla, ima značajnu ulogu u repetitivnoj i stereotipnoj motoričkoj aktivnosti (FERRUCCI i sur., 2006.). U glodavaca i primata je opisano nekoliko dopaminergičnih završetaka koji izlaze direktno iz ventralnog tegmentalnog područja u jezgre malog mozga. Unatoč monoaminskoj inervaciji i djelomičnoj ulozi u motoričkoj kontroli koja čini mali mozak potencijalnom metom za toksični učinak metamfetamina, postoji vrlo malo istraživanja učinka metamfetamina na mali mozak (FERRUCCI i sur., 2006.), iako su u literaturi su zabilježeni slučajevi cereberalne ataksije uzrokovane metamfetaminom (BUFFUM i SHULGIN, 2001.; WELLS i sur., 2010.). Tako su JENG i WANG (1998.) dokazali da metamfetamin mijenja noradrenergičku neurotransmisiju u Purkinjeovim stanicama malog mozga, a FERUCCI i sur. (2006.) da metamfetamin pojačava imunoreaktivnost TH u kori malog mozga. Budući da utječe na neurokemijske procese u malom mozgu, smatra se da metamfetamin može utjecati na funkcije posredovane malim mozgom, kao što su održavanje ravnoteže, mišićna koordinacija i kontrola pokreta.

2.3.4. Metamfetamin i poremećaji fine motorike

Do promjena u motorici dolazi nakon kratkog izlaganja metamfetaminu i one ostaju vidljive dugo nakon što je izlaganje metamfetaminu prekinuto (BALOGH i sur., 2004.). Metamfetamin djeluje na motoričku funkciju najvećim dijelom preko kortiko-strijato-palidotalmičkog sklopa kojeg tvore direktna i indirektna motorička petlja bazalnih ganglija (ALBIN i sur., 1989.; ALEXANDER i sur., 1990.; DELONG, 1990.). Direktnu petlju čine motorička

kora velikog mozga, strijatum, unutrašnji segment *globus pallidusa* i retikularnog dijela supstancije nigre (GPi/SNr) i talamus, a u njoj dopamin iz SNc djeluje ekscitacijski na GABAnergičke i kolinergične neurone strijatuma. Indirektna petlja prolazi kroz koru velikog mozga, strijatum, vanjski segment *globusa pallidusa* (GP), subtalamičku jezgru (STN), GPi/SNr, talamus i opet koru velikog mozga, a u njoj dopamin iz SNc djeluje inhibitory na GABAnergičke neurone strijatuma. Izlaganje metamfetaminu dovodi do promjena u nigrostrijatalnoj razini dopamina, što utječe i na GABAnergičku i glutamatnu transmisiju i rezultira raznim poremećajima motorike (CALIGIURI i BUITENHUYS, 2005.). No, uz to, metamfetamin (četiri doze od 10 mg/kg, svaka 2 h) djeluje na segmente motoričkih puteva koji su siromašniji dopaminskim živčanim završecima, pa tako značajno povisuje razinu malondialedehida u motoričkoj kori velikog mozga i hipokampusu (HORNER i sur., 2011.).

U finu motoriku štakora ubrajaju se pokreti distalnog dijela prednjih ekstremiteta, prstiju i zapešća prilikom manipulacije hranom i prilikom posezanja za predmetima. Finu motoriku reguliraju dijelovi piramidalnog trakta; rubrospinalni i kortikospinalni trakt. Lezije piramidalnog trakta značajnije su smanjile sposobnost vještog i spontanog posezanja za hranom u štakora od lezija crvene jezgre. Obje vrste lezija oštetile su rotacijske pokrete, uključujući usmjeravanje ekstremiteta, pronaciju i supinaciju. Lezije crvene jezgre umanjuju mogućnost *arpeggio* pokreta prstima kojima se šapa orijentira za traženje i hvatanje hrane (WHISHAW i sur., 1998.). Unilateralno oštećenje motoričkog dijela kore velikog mozga, ovisno o veličini lezije, uzrokuje poremetnje u finoj motorici kontralateralnog ekstremiteta u odnosu na mjesto lezije (WHISHAW i sur., 1986.). Prilikom pružanja ekstremiteta i hvata hrane šapama oštećenja fine motorike su manje izražena, nego kod primicanja šapa i prednjih ekstremiteta k ustima (WHISHAW i KOLB, 1987.). Pri unilateralnoj depleciji dopamina u strijatumu, koji sudjeluje u kontroli tonusa mišića i izvedbi pokreta (FUXE i sur., 2006.) dolazi do potpune nemogućnosti korištenja kontralateralnog ekstremiteta, bez mogućnosti oporavka, kao i oštećenja u finoj motorici ipsilateralnog ekstremiteta (WHISHAW i sur., 1986.). U štakorskom modelu Parkinsonove bolesti, štakori su također očitovali značajna oštećenja fine motorike u vidu nemogućnosti pružanja prednjih ekstremiteta i normalne manipulacije hranom bez mogućnosti oporavka (METZ i WHISHAW, 2002.). Budući da je brahijalni splet živaca kod štakora vrlo sličan onome kod ljudi, procjena fine motorike prednjih ekstremiteta čini važan dio štakorskih modela neurodegenerativnih bolesti koje su karakterizirane poremećajima kretanja i funkcije prednjih ekstremiteta (BERTELLI i MIRA, 1993.).

2.3.5. Metamfetamin i lipidna peroksidacija u mozgu

Mozak je organ posebno osjetljiv na oksidacijski stres zbog visoke potrošnje kisika, manjeg antioksidacijskog kapaciteta (manja koncentracija glutationa) i staničnih membrana vrlo bogatih nezasićenim masnim kiselinama osjetljivima na peroksidaciju (FLOYD, 1999.; CHRISTEN, 2000.). Oksidacijski stres u mozgu povezan je sa procesom starenja i sa razvojem neurodegenerativnih bolesti.

Malondialdehid (MDA) je završni produkt lipidne peroksidacije koja se razvija u živčanom tkivu kao posljedica pretjeranog stvaranja reaktivnih kisikovih radikala i kinona dopamina potaknutog neurotoksičnim dozama metamfetamina. MDA je pokazatelj lipidne peroksidacije i oštećenja stanične membrane, no u mozgu ima i ulogu u prijenosu signala, regulaciji unutarstaničnog Ca^{2+} (CAI i sur., 2009.) i oštećenju živčanih stanica. MDA je reaktivni elektrofil koji može modificirati amino grupe u proteinima, pa time i inaktivirati enzime ili proteine uključene u mitohondrijalni transport elektrona, što dodatno omogućuje razvoj oksidacijskog stresa (LONG i sur., 2009.), a može i povisiti razinu toksičnih intermedijarnih produkata katabolizma dopamina (JINSMAA i sur., 2009.). Povišene razine MDA dokazane su u mozgovima metamfetaminskih ovisnika i laboratorijskih životinja pokusno tretiranih metamfetaminom (ACIKGOZ i sur., 1998.; YAMAMOTO i ZHU, 1998.; KITA i sur., 2000.). Metamfetamin povisuje razinu MDA u nigrostrijatumu, području najosjetljivijem na njegovo neurotoksično djelovanje, no i u područjima sa manje dopaminergičkih završetaka, kao što su kora i hipokampus (HORNER i sur., 2011.). Zanimljivo je da je i neurotoksično djelovanje metamfetamina povezano sa poremećenom regulacijom unutarstaničnog Ca^{2+} putem aktivacije kalpaina (JAYANTHI i sur., 2004.), proteaze osjetljive na kalcij i uključene u apoptozu ovisnu o endoplazmatskom retikulumu (NAKAGAWA i YUAN, 2000.). Metamfetamin uzrokuje smrt stanica pojačavajući aktivaciju kalpaina u motoričkim neuronima kralježnične moždine i neuronima kore velikog mozga (SAMANTARAY i sur., 2006.). Putem aktivacije kalpaina metamfetamin dovodi do proteolize spektrina, važnog za očuvanje integriteta stanične membrane i strukture citoskeleta u strijatumu (STASZEWSKI i YAMAMOTO, 2006.), hipokampusu, kori velikog mozga (WARREN i sur., 2005.; WARREN i sur., 2007.) i kulturama neurona (SAMANTARAY i sur., 2006.).

MDA je povezan i sa patogeneom raznih neurodegenerativnih bolesti, pa se tako smatra da povišene koncentracije MDA u plazmi pacijenata mogu upućivati na napredovanje

amiotrofične lateralne skleroze, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (DIB i sur., 2002.). Prilikom obdukcija pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti, u SN-i je utvrđena povišena razina MDA i smanjena razinu višenezasićenih masnih kiselina koje su supstrat za lipidnu peroksidaciju (DIB i sur., 2002.). Zbog pristupačnosti i jednostavnosti dokazivanja ovaj se biološki pokazatelj može koristiti i u kliničkim ispitivanjima.

2.3.6. Metamfetamin i patomorfološke promjene u mozgu

Smrt nakon zlouporabe metamfetamina povezana je sa kardiovaskularnog kolapsom, moždanim edemom i difuznim petehijalnim krvarenjima u mozgu (CHAN i sur., 1994.; INOUE i sur. 2006.). Cerebrovaskularna patologija koju karakteriziraju kontinuirana anoksija i smanjen protok krvi, praćena sa akutnim zatajenjem metaboličkih procesa zbog disfunkcije mitohondrija vode do nekroze neurona zbog deplecije staničnog ATP-a (LI i sur., 2012.). Na hematoksilin- eozinom (HE) obojanim rezovima produžene moždine štakora koji su intravenski primili 48 mg/kg metamfetamina vildjive su bile nekrotične stanice sa skupljenom citoplazmom, kromatolizom (oštećena Nisslova tjelešca), kariolizom i karioreksom, a izostala je aktivacija kaspaze 3 kao pokazatelja apoptoze (LI i sur, 2012.). Metamfetamin i amfetamin dovode do bubrenja živčanih vlakna i oštećenja dopaminergičkih živaca u strijatumu štakora i miševa kojima su se kontinuirano aplicirali (ELLISON i sur., 1978.; LOREZ, 1981.; JONSSON i NWANZE, 1982.). Gubitak neurona sa receptorima za tirozin hidorksilazu sa izraženom gliozom opisali su HESS i suradnici (1990.) nakon što su miševima aplicirali četiri doze metamfetamina od 10 mg/kg.

SONSALLA i suradnici (1996.) su koristeći krezil violet i bojanje specifično za TH ustanovili značajan gubitak tijela neurona (do 50%) u supstanciji nigri miševa kojima su aplicirali metamfetamin u dozi koja je bila dovoljna da izazove 90% depleciju dopamina u strijatumu. Dakle, osim što izaziva neurokemijske promjene u obliku deplecije neurotransmitera, metamfetamin uzrokuje degeneraciju živčanih završetaka i gubitak neurona u strijatumu i povezanim strukturama (KITA i sur, 2003.).

Doze metamfetamina koje dovode do oštećenja neurona, degeneracije mijelina i reaktivne astrocitoze u kori velikog mozga dovode i do poremećaja u funkciji krvno –

moždane barijere (SHARMA i sur., 2007.). U vezi s oštećenjem funkcije krvno-moždane barijere opisani su deformirani neuroni, oštećenja glija stanica, vezikulacija mijelina i promjene u vaskularnom endotelu i epitelu u kori velikog mozga, hipokampusu, talamusu i hipotalamusu 30 – 80 minuta nakon primjene metamfetamina (SHARMA i KIYATKIN, 2009.). Uslijed oštećenja funkcije barijere dolazi do prelaska albumina iz seruma u tkivo mozga; koru, hipokampus, talamus, hipotalamus, mali mozak i amigdalu (BOWYER i ALI, 2006.; KIYATKIN i sur., 2007.; SHARMA i sur., 2007.).

2.4. Terapeutski peptidi i pentadekapeptid BPC 157

Iako zanimanje za regulatorne peptide i njihovu funkciju u živim organizmima raste, smatra se da nisu dobri kandidati za farmaceutski razvoj zbog brojnih ograničenja. Prema VLIEGHE i sur. (2010.), ta ograničenja su sljedeća:

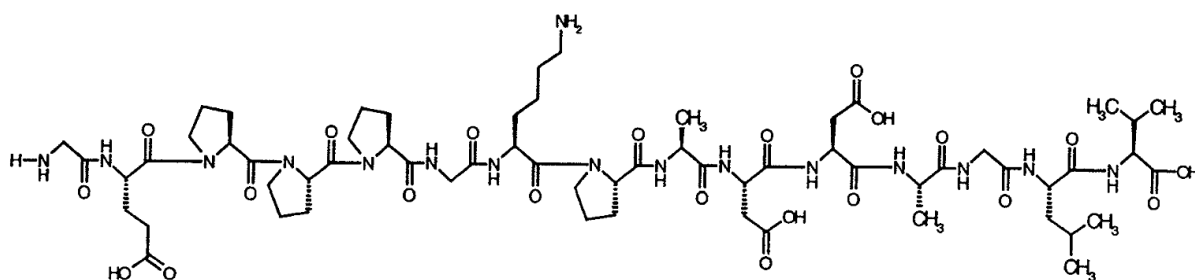
- Nedostatna bioraspoloživost nakon peroralne primjene,
- Kratak poluvijek zbog razgradnje protelitičkim enzimima koji se nalaze u probavnom traktu i želucu,
- Brzo uklanjanje putem jetre i bubrega (jetreni i bubrežni klirens),
- Otežani prolazak kroz fiziološke barijere zbog hidrofилности,
- Loša specifična distribucija zbog visoke konformacijske fleksibilnosti peptida rezultira niskom selektivnošću zbog koje peptidi dolaze u interakciju sa više raznih receptora pa mogu i uzrokovati više nuspojava,
- Rizik od imunogenih učinaka,
- Visoki troškovi proizvodnje

Ključni preduvjeti za razvoj peptida kao lijeka su biološki učinak, dobar farmakokinetički profil i niska imunogenost. Da bi se navedeni preduvjeti postigli, molekule peptida se modificiraju na različite načine; prevode se u cikličke molekule ili čak u molekule koje više nisu peptidi ali zadržavaju njihov biološki učinak (peptidomimetici), a otpornije su na razgradnju i eliminaciju, bolje su bioraspoloživosti i selektivnosti (VLIEGHE i sur.,

2010.). Ipak, peptidi imaju nekoliko prednosti u odnosu na rekombinantne proteine i protutijela; zbog male veličine peptidi lakše prolaze kroz tkiva, manje su imunogeni, proizvodnja je jeftinija, stabilniji su i imaju višu aktivnost po jedinici mase (LADNER i sur., 2004.; MCGREGOR, 2008.).

Prednosti koje peptidi imaju u odnosu na manje organske molekule koje čine većinu standardnih lijekova na tržištu su veća učinkovitost, selektivnost i specifičnost (LADNER i sur., 2004.). Budući da su razgradni produkti peptida aminokiseline, manji je rizik od toksičnog djelovanja (LOFFET, 2002.). Zbog kratkog poluvijeka, jako malo peptida se nakuplja u tkivima. Većina peptida djeluje agonistički, a i manje ih je potrebno da bi aktivirali receptore od interesa (HRUBY, 2002.; LIEN i LOWMAN, 2003.)

Pentadekapeptid BPC 157 (GEPPPGKPADAGLV, M.W.1419) je aktivni dio stabilnog želučanog peptida BPC (engl. *Body Protection Compound*) izdvojenog iz želučanog soka (VELJAČA i sur., 1995.) sa dokazanim antiulkusnim djelovanjem (SIKIRIĆ i sur., 1994.; SIKIRIĆ i sur., 1996.a, b; SIKIRIĆ i sur., 1997.a). U kliničkim studijama za upalnu bolest crijeva i cijeljenje rana potvrđena je sigurnost primjene ovog antiulkusnog peptida (PL-10, PLD-116, PL 14736 Pliva, Hrvatska), budući da prilikom istraživanja nisu zapaženi nikakvi toksični učinci (VELJAČA i sur., 2002.; RUENZI i sur., 2005.). Za razliku od standardnih peptida koji potiču cijeljenje tkiva i djeluju antiulkusno, ali su nestabilni i trebaju se primjeniti uz nosač (MUSTOE i sur., 1987.; URIST, 1996.), BPC 157 ne treba biti primjenjen uz nosač da bi učinkovito djelovao (SIKIRIĆ, 1999.a). Tijekom posljednjih 20 godina dokazani su brojni zaštitni učinci i potencijalne indikacije za primjenu ovog peptida.



Slika 2. Pentadekapeptid BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 prvotno je izoliran iz želučanog soka, a u studijama distribucije BPC-a tijekom razvoja, SIKIRIĆ i suradnici (1993.a) su koristeći kunića poliklonska protutijela dokazali da je, u skladu s poznatim činjenicama o osovini mozak –

probavni trakt, BPC 157 prisutan u želudcu, crijevima i mozgu. Poluvrijeme eliminacije egzogenog radionuklida BPC-a 157 je 80 h nakon jednokratne p.o. i 77 h nakon jednokratne i.v. doze, a do 75 -80% ga se izluči mokraćom i fecesom nakon 168 h (7 dana) (INSTITUT ZA BIOMEDICINSKA ISTRAŽIVANJA "ANTOINE MARXER", 1996.a, b, c). Velika prednost BPC-a 157 kao potencijalno terapeutskog peptida je njegova stabilnost u organizmu, posebno u želučanom soku i vodi u kojima se nije razgradio niti nakon 24 sata inkubacije, dok su drugi standardni peptidi (h-EGF i h-TGF) stabilni u vodi, ali se vrlo brzo (već i nakon 15 minuta) razgrade u želučanom soku (VELJAČA i sur., 1995.).

U studijama farmakodinamike BPC-a 157 (u studiji naveden kao PL 14736), odnosno prilikom izrade receptograma u Institutu za biomedicinska istraživanja „Antoine Marxer SPA“ (1995.a), istraživani su afinitet peptida za adrenergičke (α , β), muskarinske (M_1 , M_2 i M_3), histaminske, serotoninске (5-HT₁, 5HT₂) dopaminske i adenozičke (A₁ and A₂) receptore. Mjerila se sposobnost PL 14736 da kompetitivno inhibira vezanje specifičnih radioliganda za navedene receptore. PL 14736 nije pokazao nikakvu interakciju sa navedenim receptorima i njihovim radioligandima, te je receptogram bio prazan. Uz to, PL 14736 nije inducirao aktivnost mikrosomalnih enzima u jetri miša; niti citokroma P-448 niti P-450 (INSTITUT ZA BIOMEDICINSKA ISTRAŽIVANJA "ANTOINE MARXER", 1995.b).

Jedno od mogućih objašnjenja mehanizma djelovanja BPC-a 157 je modulacija sustava dušikovog monoksida (NO) (GRABAREVIĆ i sur., 1997.; SIKIRIĆ i sur., 1997.b). U pokusima na pilićima L-arginin, supstrat za stvaranje NO, i BPC 157 su spriječili pogoršanje eksperimentalne plućne hipertenzije, uzrokovane smanjenjem temperature u nastambi, koje je potaknuo L-NAME (N-omega-nitro-L-arginin metil ester), nespecifični antagonist endotelne sintaze dušikovog monoksida (eNOS) (GRABAREVIĆ i sur., 1997.). Nadalje, dokazano je da se BPC 157 upliće u učinke NO na cjelovitost sluznice želuca i održavanje krvnog tlaka na specifičan način, uglavnom sinergistički sa L-argininom i antagonistički sa L-NAME (s time da L-NAME ne može poništiti učinak BPC-a kao što može L-arginina), djelujući jače ili sasvim drugačije od NO (SIKIRIĆ i sur., 1997.b). Nadalje, poznato je da BPC 157 potiče angiogenezu (SEIWERTH i sur., 1997.; SIKIRIĆ i sur., 1999.c; BRČIĆ i sur., 2009.) i stimulira ekspresiju gena za čimbenik ranog odgovora rasta, egr-1, ranu formaciju kolagena te da suprimira protein koji veže čimbenik rasta neurona 1-A, nab2 (TKALČEVIĆ i sur., 2007.).

Zanimljivo je kako se gastroprotektivni učinak BPC-a poništio nakon eksperimentalne adrektomije (uklanjanja srži nadbubrežne žlijezde) i ovariektomije, što je dodatni dokaz o interakciji BPC-a sa endokrinim, naročito adrenergičkim sustavom (SIKIRIĆ i sur., 1992.).

2.4.1. Peptidergička citoprotekcija/organoprotekcija i citoprotektivno/ organoprotektivno djelovanje pentadekapeptida BPC 157

Središnji i periferni živčani sustav imaju važnu ulogu u regulaciji integriteta sluznice želuca posredstvom brojnih neuropeptida; adrenomedulina, amilina, grelina, leptina, nociceptina, opioida, kolekistokinina, supstance P, YY peptida, β endorfina i dr. Dobro je poznata i definirana uloga i veza neuroendokrinog hipotalamusa i središnjeg autonomnog sustava (dio hipotalamo-hipofizno-adrenalne osovine čija je najvažnija uloga u nespecifičnom odgovoru organizma na stres); descendenta eferentna vlakna hipotalamusa nose povratne signale do viscerosenzornih neurona i katekolaminergičkih neurona produžene moždine te regulatorne signale do preganglijskih neurona parasimpatikusa (dorzalni vagus) i simpatikusa (torakolumbarni intermediolateralni dio). Putevi između hipotalamusa i autonomnog živčanog sustava su dvosmjerni; descendenti aksoni su peptidergički (neurosekretorni; čimbenik otpuštanja kortikotropina, vazopresin, oksitocin, somatostatin, enkefalin, pro-opiomelanokortin), a ascendentni su i peptidergički (enkefalin, neuropeptid Y, neurotensin, dinorfini) i katekolaminergički (PALKOVITS, 1999.). Učinkovite gastroprotektivne doze neuropeptida su uglavnom jako male, u pikomolarnom rasponu, dok je za endomorfina-1, endomorfina-2 i β endorfin dokazano da su učinkoviti čak i u femtomolarnim (10^{-15}) dozama (GYRIES i RONAI, 2001.; GYRIES i sur., 2011.).

U skladu s paradigmom osovine mozak - probavni trakt, želudac pogođen nekim oblikom stresa šalje signale u središnji živčani sustav kao aktivni neuroendokrini obrambeni organ te se smatra da iz želuca započinje niz organoprotektivnih učinaka. Pri tome otpuštanje želučanih peptida predstavlja važan urođeni mehanizam odgovora na stresor.

Pentadekapeptid BPC 157 štiti sluznicu želuca nakon akutne i kronične indukcije alkoholnih lezija (PRKAČIN i sur., 2001.; BOBAN BLAGAIĆ i sur., 2004.; BOBAN BLAGAIĆ i sur., 2006.) te lezija uzrokovanih nesteroidnim protuupalnim lijekovima (SIKIRIĆ i sur., 1997.a). Zbog navedenog se smatra endogenim medijatorom Robertove

citoprotekcije i adaptivne citoprotekcije u probavnom sustavu (SIKIRIĆ i sur., 2010.). Robertova citoprotekcija podrazumijeva zaštitnu ulogu prostaglandina u očuvanju sluznice želuca prilikom instilacije raznih iritansa, najčešće etanola u želudac, a smatra se da je taj zaštitni učinak prostaglandina neovisan o želučanoj kiselini (ROBERT, 1979.), dok je adaptivna citoprotekcija mehanizam kojim se prethodno blago iritirana sluznica želuca štiti od agresivnijih iritansa i razvoja većih lezija (ROBERT i sur., 1983.; ROBERT, 1985.). Kao oblik citoprotekcije može se promatrati cijeljenje rana, dok simultano cijeljenje različitih tkiva potaknuto djelovanjem citoprotektivnih tvari nije dokazano do nedavno u štakorskom modelu gastrokutane fistule (ŠKORJANEC i sur., 2009.). Riječ je o modelu trajnog želučanog ulkusa i rane na koži sa nedostatnim spontanom cijeljenjem, u kojem je pentadekapeptid BPC 157, primijenjen putem vode za piće ili intraperitonealno u dozama od 10 µg, 10 ng, or 10 pg/kg pokazao učinkovitost istovremeno u poticanju cijeljenja kože i sluznice želuca i zatvaranja fistule u kratkom vremenskom roku nakon aplikacije (ŠKORJANEC i sur., 2009.).

Pentadekapeptid BPC 157 potiče cijeljenje ozljeda različitih tkiva koje spontano sporo cijele, pa tako i ozljede mišića, tetiva, živaca i kostiju bez formacije ožiljnog tkiva (ŠEBEČIĆ i sur., 1999.; STAREŠINIĆ i sur., 2003.; KRIVIĆ i sur., 2006.; NOVINŠČAK i sur., 2008.; GJURAŠIN i sur., 2010.; PEVEC i sur., 2010.), kao i cijeljenje lezija sluznice probavnog trakta u različitim pokusnim modelima (SIKIRIĆ i sur., 1994.; SIKIRIĆ i sur., 1996.a, b). Osim toga, djeluje hepatoprotektivno nakon aplikacije toksičnih doza paracetamola (ILIĆ i sur., 2010.) i nakon ligature žučovoda i *a. hepaticae*, aplikacije CCl₄ (SIKIRIĆ i sur., 1993.c) i kroničnog unosa etanola (PRKAČIN i sur., 2001.). Ublažava razvoj lezija na plućima uzrokovane intratrahealnom instilacijom klorovodične kiseline (STANČIĆ-ROKOTOV i sur., 2001.). U modelu predoziranja inzulinom sprječava napadaje uzorkovane hipoglikemijom, oštećenje neurona u kori velikog mozga i hipokampusu, razvoj ulkusa u želucu, hepatomegaliju, razgradnju glikogena i kalcifikaciju stijenki krvnih žila (ILIĆ i sur., 2009.).

2.4.2. Neuroprotektivni učinak pentadekapeptida BPC 157

Neuroprotektivni učinak BPC-a 157 dokazan je u brojnim modelima mehaničkih i neurotoksičnih oštećenja živčanog sustava (SIKIRIĆ i sur., 1996.a; GJURAŠIN i sur., 2010.; TUDOR i sur., 2010.). BPC 157 apliciran štakorima i.p., p.o. i lokalno u dozama od 10 ng/kg

i 10 µg/kg je potaknuo brže cijeljenje presječenog ishijadičnog živca sa anastomozom i bez anastomoze, što znači da ima direktno i posredno neuroprotektivno djelovanje; na mjestu presjeka kod tretirane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu histomorfološki je dokazana brža i homogena regeneracije aksona, veća gustoća i veličina regenerativnih vlakana, postojanja epineuralne i perineuralne regeneracije, veći omjera živčanog u odnosu na vezivno tkivo, veći promjer mijelinskih vlakana, funkcionalno (ishijadični funkcionalni indeks) je dokazan brži oporavak ozljeđene stražnje noge kao i odsutnost autotomije na istoj (GJURAŠIN i sur., 2010.) .

U mišjem modelu traumatske ozljede mozga uzrokovane utegom, BPC 157 (10 ng/kg i 10 µg/kg, i.p.) je smanjio smrtnost tretiranih miševa u prvih 24 h nakon izazivanja ozljede, tretirani miševi su imali očuvaniju svijest u odnosu na kontrolne, manji edem mozga, manje hemoragičnih laceracija, subarahnoidalnih krvarenja i intraventrikularnih krvarenja (TUDOR i sur., 2010.).

Zaštitni učinak BPC-a 157 dokazan je u modelu želučanih lezija uzrokovanih stresom (sputanost), 96% etanolom i indometacinom (SIKIRIĆ i sur., 1996.a). Navedeni učinak povezan je sa djelovanjem na senzorne živce u prisutnosti i bez kapsaicina. Kapsaicin u višim dozama (125 mg/kg, s.c. u odraslog štakora) može oštetiti senzorna vlakna, dok u niskim dozama potiče oslobađanje neurotransmitera i zaštitu sluznice želuca. BPC 157 je u odsustvu kapsaicina štitio sluznicu od etanola, stresa i indometacina, dok je kapsaicin imao negativni učinak na navedeno djelovanje BPC-a, no ukoliko bi se povećala doza BPC-a, zaštitni učinak na sluznicu je opet bio vidljiv. Iz ovoga proizlazi dokaz o složenom sinergizmu zaštitnog djelovanja BPC-a 157 i peptidgeričke aktivnosti senzornih živaca (SIKIRIĆ i sur., 1996.a).

Neuroprotektivni učinak je potvrđen i u modelu predoziranja nesteroidnim protuupalnim lijekovima (NSPUL) gdje je BPC 157 antagonizirao toksične učinke diklofenaka, ibuprofena i paracetamola, pa između ostalog spriječio razvoj hepatične encefalopatije, popratne lezije mozga i konvulzije (ILIĆ i sur., 2010.; ILIĆ i sur., 2011.a, b).

Iako BPC 157 ne mijenja normalno ponašanje zdravih životinja (JELOVAC i sur., 1998.), u brojnim istraživanjima se uplitao u djelovanje mnogih centralno aktivnih tvari; poput naloksona je antagonizirao morfinsku analgeziju kod miševa (BOBAN BLAGAIĆ i sur., 2009.), ublažio je sindrom ustezanja kod miševa koji su 13 dana pili 20% alkohol (7.6 g/kg) i spriječio akutne učinke intoksikacije alkoholom (anesteziju, hipotermiju, povišene koncentracije etanola u krvi, 25% smrtnost) kod miševa koji su primili alkohol i.p. u dozi od 4 g/kg (BOBAN BLAGAIĆ i sur., 2004.). Kada je BPC 157 primjenjivan uz diazepam, agonist GABA_A receptora, antikonvulzivni učinak diazepama je bio prolongiran, a izostao je razvoj

tolerancije i ovisnosti koja inače predstavlja velik problem prilikom učestale primjene diazepama u klinici (JELOVAC i sur., 1999.). Anksiolitički učinak samog BPC-a 157 potvrđen je u pokusima na štakorima koji su uključivali test izazivanja šoka i zakapanja te boravka na svijetlu i u mraku (SIKIRIĆ i sur., 2001.).

Dobro je poznato da pentadekapeptid BPC 157 regulira dopaminski sustav te da je njegov antiulkusni učinak povezan sa tim sustavom (SIKIRIĆ i sur., 2011.), pa se smatra da bi mogao biti indiciran kod brojnih poremećaja razine dopamina u središnjem živčanom sustavu, osobito u nigrostrijatalnom dopaminskom putu. Učinkovitost BPC-a 157 je ispitana u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane neurotoksinom MPTP-om koji uništava dopaminergična vlakna u supstanciji nigri (SIKIRIĆ i sur., 1999.b) te u raznim modelima dopaminergičke preosjetljivosti i amfetaminske senzitivacije (JELOVAC i sur., 1998.; SIKIRIĆ i sur., 2002.). U takvim je modelima potvrđen učinak BPC-a 157 na ponašanje i somatosenzorne reflekse pokusnih životinja.

U modelu Parkinsonove bolesti uzrokovane MPTP-om (30 mg/kg, i.p., 1/dan, tijekom 6 dana i 50 mg/kg, i.p., jednokratno nakon 4 dana) BPC 157 (1.50 µg/kg ili 15.0 ng/kg i.p., 15 min prije i 15 min poslije MPTP-a) je poboljšao somatosenzornu orijentaciju tretiranih miševa, te je smanjio hiperaktivnost i motoričke smetnje; tremor, akineziju i katepsiju, koje su bile vrlo izražene u kontrolnoj skupini miševa. U modelu Parkinsonove bolesti uzrokovanom rezerpinom (5 mg/kg, i.p.) BPC 157 (10 ng/kg i 10 µg/kg, i.p.) apliciran 15 minuta prije rezerpina je spriječio katepsiju i reducirao hipotermiju, dok je BPC-157 u posttretmanu 24 h nakon davanja rezerpina dokinuo katepsiju i spriječio daljnji pad tjelesne temperature (SIKIRIĆ i sur., 1993.d).

U pokusima amfetaminske senzitivacije i preosjetljivosti na amfetamin uzrokovane haloperidolom BPC 157 je smanjio intenzitet amfetaminskih stereotipija, hiperaktivnosti i penjanja uzrokovanih amfetaminom ili amfetaminom i haloperidolom u kombinaciji, kao i katepsiju uzrokovanu haloperidolom kod miševa (JELOVAC i sur., 1998.). Suzbio je pojačane reakcije (straha) na zvučni stimulans koje se javljaju kod životinja na amfetaminu i u potpunosti je spriječio razvoj preosjetljivosti na amfetamin koju je inače kod kontrolne skupine bilo moguće potaknuti davanjem haloperidola 3 dana prije aplikacije amfetamina (JELOVAC i sur., 1998.). U odvojenoj studiji je apliciran u dozama od 10 ng/kg i 10 µg/kg (i.p.) antagonizirao katepsiju i somatosenzornu dezorijentaciju uzrokovanu haloperidolom (0.625, 1.25, 2.5, 5 i 10 mg/kg, i.p.) i flufenazinom (0.315, 0.625, 1.25, 2.5 i 5 mg/kg, i.p.) kod miševa (JELOVAC i sur., 1999.). Kako haloperidol blokiranjem dopamina izaziva stvaranje ulkusa kod štakora, BPC 157 (10 µg, 10 ng, 1.0 ng, i 100 pg/kg, i.p.) je spriječio

nastanak ulkusa kod tretiranih štakora kojima je apliciran haloperidol u kataleptogenoj dozi (5 mg/kg, i.p.). Ulkus je bio vidljiv u kontrolnoj skupini životinja 24 h nakon aplikacije haloperidola (JELOVAC i sur., 1999.). U sprječavanju lezija želuca uzrokovanih haloperidolom drugi antiulcerogeni lijekovi; lansoprazol, pantoprazol, ranitidin, cimetidin i misoprostol, nisu bili učinkoviti kao BPC 157 (BILIĆ i sur., 2001.).

Osim sa dopaminskim sustavom, BPC 157 utječe i na djelovanje serotonergičkog sustava. BPC 157 (10 µg/kg, i.p.) potiče stvaranje 5-HT u supstanciji nigrii, medijalnoj prednjoj olfaktornoj jezgri, a smanjuje razinu 5-HTa u dorzalnom talamusu, hipokampusu, lateralnom genikulatnom tjelešcu i hipotalamusu (TOHYAMA i sur., 2004.). Nakon tjedan dana svakodnevnih aplikacija BPC-a 157 (10 µg/kg, s.c.) izmjerena je smanjena razina 5-HTa u dorzalnoj rafe jezgri, a značajno povišene razine 5-HTa u odnosu na kontrolnu skupinu izmjerene su u SN, lateralnom *nucleusu caudatusu*, *nucleusu accumbensu* i gornjoj olivarnoj jezgri (TOHYAMA i sur., 2004.). U modelima depresije BPC 157 je značajno smanjio trajanje nepokretnosti u odnosu na imipiramin što je dodatni dokaz djelovanja na serotonergički i noradrenergički sustav (SIKIRIĆ i sur., 2000.). Serotoninski sindrom je najozbiljnija nuspojava primjene antidepresiva, a u pokusnih životinja ju karakteriziraju tapkanje prednjim nogama, adukcija stražnjih nogu, „wet dog shake“ drhtanje i hipotermija nakon koje slijedi hipertermija. Moguće djelovanje BPC-a 157 na serotoninski sindrom istraženo je na štakorima kojima su aplicirani paragilin (75 mg/kg, i.p.), inhibitor MAO, i L-triptofan (100 mg/kg, i.p.), prekursor 5-HT, odvojeno ili u kombinaciji. BPC 157 je blokirao serotoninski sindrom, a posebno hipertermiju i „wet dog shake“ koji su povezani sa stimulacijom 5-HT_{2A} receptora (BOBAN BLAGAIĆ i sur., 2005.).

3. Obrazloženje teme

3.1. Obrazloženje teme

Svrha ovog rada je istražiti može li pentadekapeptid BPC 157, s obzirom na sve navedene dosadašnje dokazane zaštitne učinke, djelovati zaštitno u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom, a posebno kada je ta neurotoksičnost pojačana prethodnim izazivanjem dopaminske preosjetljivosti haloperidolom. Provjeriti će se, ukoliko postoji zaštitni učinak BPC-a 157 u ovim modelima, da li se on može objasniti suzbijanjem lipidne peroksidacije ili pak nekim drugim mehanizmima. Budući da metamfetamin primjenjen u neurotoksičnim dozama oštećuje nigrostrijatalni dopaminski sustav koji je oštećen i u oboljelih od Parkinsonove bolesti i parkinsonizama, rezultati ovog istraživanja mogu potvrditi ili opovrgnuti potencijal BPC-a 157 u liječenju Parkinsonove i sličnih bolesti i doprinijeti odluci o daljnjem razvoju BPCa-157 za kliničku studiju.

Osim navedene primarne svrhe, ovaj rad će poslužiti i za procjenu primjerenosti korištenih modela dopaminergičke neurotoksičnosti i preosjetljivosti u istraživanju poremećaja monoamina i parkinsonizama. Utvrditi će se povezanost oštećenja dopaminergičkih živaca u nigrostrijatumu s lipidnom peroksidacijom u mozgu i promjenama u fenotipu pokusnih životinja, što će doprinijeti ukupnom znanju o patološkim mehanizmima koji se javljaju kod navedenih poremećaja.

4. Materijal i metode

4.1. Pokusne životinje

U pokusima je korišteno 106 Wistar štakorica, starih 3-4 mjeseca i mase oko od 160 - 220 g. Uzgojene su i držane 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. Štakoricama su hrana (pelete za glodavce) i voda bile dostupne *ad libitum*, osim preko noći tijekom pokusa kada im je uskraćena hrana do idućeg dana i testiranja. Štakorice su tijekom pokusa odvajane svaka u svoj kavez da se ne bi međusobno grizle. Životinje su izvagane i obilježene prije početka pokusa. Nisu bile naviknute na pokusne uvjete prije pokusa (aplikacija lijekova i.p., otvoreni kavezi bez stelje, aparat za lokomotornu aktivnost), niti su trenirane prije testiranja. Svaka životinja je u pokusu korištena samo jednom. Pokus je odobrilo Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (klasa: 640-01/12-17/18, ur.broj: 251/61-01/139-12-1) i Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (klasa: UP/I-322-01/12-01/88, ur.broj: 525-10/0255-12-2).

4.2. Pentadekapeptid BPC 157

Pentadekapeptid BPC 157 je fragment organoprotektivnog proteina želučanog soka BPC (SIKIRIĆ i sur., patent EP 0432400, 1995.), topiv je u vodi i fiziološkoj otopini, a sastoji se od 15 aminokiselina: Gly-Glu-Pro-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val, Mt 1.419 Daltona. Dobiven je sintezom na čvrstoj fazi kako je opisano (SIKIRIĆ i sur., patent EP 0572688, 1997.). U istraživanju je korišten peptid čistoće (HPLC) 99% (1-des-Gly peptid kao nečistoća). Proizvođač BPC-a 157 je Orpegen Peptide Chemicals GmbH (Heidelberg, Njemačka). Miligram BPC-a 157 otopio se u litri fiziološke otopine (Pliva, Zagreb, Hrvatska) i tako pripremljena otopina se čuvala u hladnjaku na 4°C. Štakoricama se otopina aplicirala i.p., 1 ml/200 g tjelesne mase, kako bi se postigla doza BPC-a 157 od 10 µg/kg koja se koristila u svim pokusima.

4.3. Lijekovi za životinje

U pokusu su korišteni metamfetamin hidroklorid, tablete od 5 mg (Abbott Laboratories, Illinois, SAD) i haloperidol (Haldol[®], ampule od 1ml sa 5 mg aktivne tvari, Krka, Slovenija). Tableta metamfetamina se izmrvila u tarioniku i od nje se napravilo 5 ml suspenzije u fiziološkoj otopini (Pliva, Zagreb, Hrvatska) koja se aplicirala potkožno u tri doze: 10, 20 ili 40 mg/kg. Haloperidol se direktno aplicirao i.p. uvijek u dozi od 5 mg/kg.

4.4. Reagensi za kromatografiju

Tiobarbiturna kiselina (čistoća $\geq 98\%$), 1,1,3,3 – tetraetoksipropan (čistoća $\geq 96\%$), natrijev dodecil-sulfat (čistoća $\geq 99\%$), metanol (čistoća $\geq 99,9\%$) su kupljeni od tvrtke Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka). Ultračista voda za kromatografiju natočena je na Milli-Q[®] sustavu (Millipore, Massachusetts, SAD) na Zavodu za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

4.5. Priprema ostalog materijala za analizu mozgova

Matična otopina fosfatnog pufera (PBS, engl. *phosphate buffered saline*) je pripremljen od 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na₂HPO₄ i 2,3g NaH₂PO₄ u u 1 l ultračiste vode. Matična otopina se razrijedi sa ultračistom vodom u omjeru 1:9 i tako pripremljena otopina se drži na -20 °C te se prije usmrćivanja životinja izvadi na sobnu temperaturu kako bi se malo odledila i kako bi se u nju mogli uroniti izvađeni mozgovi štakorica.

4.6. Pokusni protokol

Raspored pokusnih životinja po skupinama, postupci s njima i vrijeme provedbe tih postupaka prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Raspored životinja u pokusima po skupinama

Sati od primjene metamfetamina	Postupci	1.Kontrolna skupina (fiziološka otopina + 10, 20 i 40 mg/kg MA)	2. Kontrolna skupina (fiziološka otopina + haloperidol + za 3 dana 10 mg/kg MA)	1. Pokusna skupina (BPC 157 + 10, 20 i 40 mg/kg MA)	2. Pokusna skupina (BPC 157 + haloperidol + za 3 dana 10 mg/kg MA)
Prije primjene metamfetamina	Mjerenje lokomotorne aktivnosti	+	+	+	+
	Usmrćivanje	+	-	+	-
	Analize mozgova	+	-	+	-
Prva 2 h	Bodovanje stereotipija	+	+	+	+
	Mjerenje tjel. temperature	+	+	+	+
	Usmrćivanje	+	-	+	-
	Analize mozgova	+	-	+	-
Nakon 24 h	Mjerenje lokomotorne aktivnosti	+	+	+	+
	Bodovanje ataktičnog fenotipa	+	+	+	+
	Bodovanje poremećaja fine motorike	+	+	+	+
	Usmrćivanje	+	+	+	+
	Analize mozgova	+	+	+	+

U pokusu dopaminergičke neurotoksičnosti životinjama su aplicirani fiziološka otopina ili BPC 157 u jednakim volumenima (1 ml/200 g t.m.), te nakon 30 minuta metamfetamin (10, 20 ili 40 mg/kg s.c.).

U pokusu dopaminergičke preosjetljivosti životinjama su aplicirani fiziološka otopina ili fiziološka otopina i haloperidol ili BPC 157 i haloperidol. Životinjama je mjerena lokomotorna aktivnost tijekom iduća tri dana a četvrti dan je apliciran metamfetamin. Stereotipije su snimane i bodovane kod svih životinja u prva dva sata od primjene metamfetamina, kada je njegovo djelovanje najintenzivnije. Praćena je tjelesna temperatura životinja i ukoliko bi i jednoj životinji temperatura prelazila 41.2°C polijevale bi se sa hladnom vodom (FUKUMURA i sur., 1998.).

Polovina životinja svih skupina u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti (jednokratna doza metamfetamina) je usmrćeno nakon 2 h, a ostale životinje su usmrćene 24 h od primjene metamfetamina - nakon procjene spontane aktivnosti, ataktičnog fenotipa i oštećenja fine motorike.

4. 7. Mjerenje tjelesne temperature

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

4. 8. Bodovanje stereotipija

Ponašanje životinja je prva 2 h nakon aplikacije metamfetamina promatrano, snimano (Logitech web kamera, Morges, Švicarska) i bodovano prema sustavu bodovanja navedenom u CURZON i sur. (1979.). Životinji bi se za određen oblik ponašanja (Tablica 4.) dao po jedan bod svakih 10 minuta i te bi se svi bodovi za pojedinu životinju zbrojili za period od 2 sata.

Tablica 4. Bodovanje učinka metamfetamina na ponašanje štakorica prema CURZON i sur. (1979.)

Bodovanje stereotipija uzrokovanih metamfetaminom prema CURZON i sur. (1979.)								
Ponašanja ovisna o 5-HT-u				Hodanje unatrag	Kruženje, okretanje	Ponašanja ovisna o dopaminu		
Dignut rep	Adukcija stražnjih nogu	Tapkanje prednjim nogama	Mahanje glavom			Dizanje na stražnje noge	Grizenje, lizanje	Hodanje naprijed

4. 9. Mjerenje spontane lokomotorne aktivnosti i vremena čišćenja

Lokomotorna aktivnost snimala (Logitech web kamera, Morges, Švicarska) pod svjetlom jačine 80 luksa, od 12 do 16 h u staklenom kavezu sa ucrtanim pravokutnicima na podlozi dimenzija 22 x 40 cm. Zbog pretpostavke da će uskraćivanje hrane na 24 h utjecati na aktivnost i ponašanje štakorica, izmjerila se aktivnost zdravih, netretiranih štakorica prije i 24 h nakon uskraćivanje hrane (štakoricama u pokusu se preko noći uskratila hrana zbog snimanja za procjenu poremećaja fine motorike). Tako su dobivene fiziološke vrijednosti lokomotorne aktivnosti i stereotipnog ponašanja u kavezu i te su vrijednosti prikazane grafički, za lakšu usporedbu sa vrijednostima dobivenima u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti i proesjetljivosti. Uz to jednoj skupini štakorica dao se BPC 157 u dozi u kojoj je korišten u pokusu (10 µg/kg), uskraćena im je hrana tijekom 24 h i nakon toga je mjerena njihova lokomotorna aktivnost kako bi se provjerilo utječe li BPC 157 na lokomotornu aktivnost zdravih štakorica, odnosno štakorica koje nisu primile metamfetamin. Kao parametri lokomotorne aktivnosti mjerile su se horizontalna i vertikalna lokomotorna aktivnost (KELLY i sur., 1998.), te vrijeme čišćenja koje spada u stereotipna ponašanja (TAYLOR i sur., 2010.) ali se zbog vremena analize navodi uz lokomotornu aktivnost. Horizontalna lokomotorna aktivnost mjerila se brojanjem prijeđenih pravokutnika u staklenom kavezu. Vertikalna lokomotorna aktivnost mjerila se brojanjem podizanja na stražnje noge (dok su obje prednje noge u zraku). Vrijeme čišćenja mjerilo se brojanjem sekundi koje je štakorica provela čisteći (šapama) i grickajući svoje krzno.

4. 10. Bodovanje poremećenog držanja i ravnoteže

U tablici 5. je prikazan sustav bodovanja poremećenog držanja i ravnoteže, tj. ataktičnog fenotipa prema GUYENET i suradnicima (2010.). Životinje su snimane dok ih se držalo samo za bazu repa, dok su hodale na ravnoj podlozi i na rubu kaveza. Usporeni snimci su se pregledali i bodovali.

Tablica 5. Sustav bodovanja poremećenog držanja i ravnoteže (GUYENET i sur. , 2010.)

Parametar i izvedba	Bodovi	Objašnjenje bodova
Preklapanje stražnjih ekstremiteta (engl. <i>Hindlimb clasping</i>): štakor se primi za bazu repa i podigne te se 10 sekundi promatraju pokreti stražnjih ekstremiteta	0	Stražnje se noge odmiču lateralno od trbuha.
	1	Jedan stražnji ekstremitet se primiče trbuhu više od 50 % vremena.
	2	Oba ekstremiteta se primiču trbuhu gotovo da se preklapaju (do 50 % vremena).
	3	Ekstremiteti se preklapaju više od 50 % vremena.
Držanje prilikom hoda (engl. <i>Gait</i>) Snima se i ocijenjuje hod štakora po ravnoj površini	0	Štakor hoda brzo, trbuhom ne dodiruje podlogu, sva 4 ekstremiteta ravnomjerno podupiru tijelo i jednakomjerno se koriste pri hodu, leđa su ravna.
	1	Lagani tremor i šepanje, stopala lagano odmaknuta od trupa, brzi hod „kao po jajima“.
	2	Izraženiji tremor, stopala odmaknuta od trupa, šepanje, tapkanje, povremena diskinezija (manje od 50% vremena).
	3	Štakor vuče trbuh po podlozi, bradikinezija, znakovi diskinezije prisutni više od 50 % vremena.
Kifoza (engl. <i>Kyphosis</i>)	0	Ravna leđa pri hodanju i mirovanju
	1	Kifoza pri mirovanju, leđa se ravnaju prilikom hoda
	2	Blaga kifoza prisutna i pri hodu, no leđa se mogu ispraviti prilikom dizanja na stražnje noge
	3	Izražena prilikom kretanja i mirovanja

<p>Test koordinacije na rubu kaveza (engl. <i>The ledge test</i>): Štakor se stavi na rub kaveza tri puta i snima se njegovo kretanje po rubu</p>	0	Štakor normalno hoda po rubu, ne gubi ravnotežu.
	1	Štakoru se kližu stopala, ali može hodati i spustiti se u kavez.
	2	Štakor otežano upotrebljava stražnje noge prilikom hoda po rubu i spuštanju u kavez, zabacuje stražnji kraj tijela, prisutan lagani tremor.
	3	Izraziti tremor, padanje i akinezija

4. 11. Bodovanje poremećene funkcije prednjih ekstremiteta

Štakori su testirani na oštećenje fine motorike modificiranim testom za procjenu poremećene funkcije prednjih ekstremiteta prema IRVINE, BEATTIES i BRESNAHANU (IBB) (IRVINE i sur., 2010.). Štakori su testirani u prozirnomo staklenom cilindru visine 30 cm, debljine dna 1 cm i debljine stakla 6mm. Nakon što su stavljani u očišćen cilindar, na 10 minuta kako bi se prilagodili na nov okoliš, dane su im skraćene pelete kojima se uobičajeno hrane. Sve pelete korištene u testiranju bile su približno jednake veličine i oblika, debljine 0,3 cm i promjera 1 cm. Cijeli postupak hranjenja sniman je ručnom kamerom te su nakon toga snimke pregledavane i analizirane uz ocjenjivanje stupanja oštećenja fine motorike. Ukupna ocjena oštećenja fine motorike prednjih ekstremiteta je donešena na temelju procjene 6 parametara. Maksimalni broj bodova koji označava najveće oštećenje fine motorike je 10, dok je minimalni broj bodova 0 koji ukazuje da nema nikakvih promjena u finoj motorici prednjih ekstremiteta. Radi boljeg razumijevanja IBB testa, procjenjivani parametri i način bodovanja su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Prikaz modificirane IBB skale za procjenu fine motorike prednjih ekstremiteta.

Modificirana IBB skala za procjenu fine motorike prednjih ekstremiteta		
Parametar	Bodovi	Objašnjenje bodova
Prilagodba pelete u dlanovima	0	normalna prilagodba pelete u dlanovima
	1	pretjerano namještanje pelete u dlanovima
	2	nemogućnost smještaja pelete između dlanova
Kontura prstiju u odnosu na peletu	0	prsti prate položaj pelete
	1	ispruženi i kruti prsti tijekom više od 50% vremena hranjenja
Potpora pelete dlanovima	0	potpora dlanovima 95% vremena hranjenja i više
	1	potpora dlanovima manje od 95% vremena
	2	jedan dlan uopće ne podupire peletu
Hvat pelete	0	normalni hvat tijekom 90% i više vremena hranjenja
	1	normalni hvat tijekom 60 do 90% vremena
	2	normalni hvat tijekom 10 do 60% vremena
	3	normalni hvat manje od 10% vremena
Mogućnost držanja pelete	1	nemogućnost držanja pelete tijekom hranjenja
Podizanje pelete	1	nemogućnost podizanja pelete s dna cilindra

4.12. Usmrćivanje životinja

Nakon provedenih testiranja štakori su usmrćivani metodom dekapitacije bez prethodne sedacije, nakon čega su im uzrokovani mozgovni za patohistološku pretragu i kromatografsku analizu.

4.13. Uzorkovanje mozгова za kromatografsku analizu

Nakon usmrćivanja, štakoricama su izvađeni mozgovni iz lubanja u ledeni fosfatni pufer (PBS, pH 7.4), te su na smrznutim petrijevim zdjelicama odvojeni mali mozak, hipokampus, diencefalon, strijatum, frontalna kora i kora. Odvojeni dijelovi su djelomično

smrznuti i izvagani, te pospremljeni u tekući dušik do analize. Kako bi se dobile fiziološke vrijednosti uzorkovali su se i mozgovni štakorica netretiranih metamfetaminom, prije i poslije uskraćivanje hrane na 24 h radi što vjerodostojnije usporedbe sa vrijednostima izmjerenih u mozgovima štakorica tretiranih metamfetaminom.

4. 14. Mjerenje koncentracije MDA

Prije analize dijelovi mozga su homogenizirani u 0.14 M KCl-u, a koncentracije MDA su izmjerene metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na TSP-130 sustavu (Thermo Separation Products, Inc, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, SAD) prema modificiranoj metodi GROTTO i suradnika (2007.). Paralelno sa uzorcima, svakodnevno se na jednak način pripremao vanjski standard 1,1,3,3 – tetraetoksipropan, u koncentracijama 0.005, 0.1517, 1.517, 3.035, 15.175 i 30.35 μM te je svakoj analizi prethodila kalibracija. U 150 μl svakog uzorka ili standarda dodalo se 50 μl vode i 50 μl natrijeve lužine (3 N). Nakon 30 minuta inkubacije u tresućoj kupelji na 60 °C, dodano je 250 μl 6%-tne fosfatne kiseline i 250 μl 0,8 %-tne tiobarbiturne kiseline, nakon čega su uzorci inkubirani još 45 minuta u kupelji temperature 90°C. Nakon hlađenja, spoj MDA i tiobarbiturne kiseline se ekstrahira dodavanjem 250 μl metanola i 100 μl 10% natrijevog dodecil-sulfata, vorteksiranjem 20 sekundi te centrifugiranjem na 3600 U/min kroz 10 minuta. Pri analizi kromatografijom reverznih faza koristila se Ascenitis[®] C18 kolona (Supelco, Bellefonte, SAD) duljine 15 cm, promjera 4.6 mm sa česticama punila promjera 5 μm . Korištena je pokretna faza od metanola i 50 mM vodene otopine kalijeveg dihidrogenfosfata u omjeru 50:50 s dodatkom kalijeve lužine do postizanja pH od 6,72. Protok pokrete faze bio je 1 ml/min, vrijeme analize 10 minuta, a valna duljina UV detektora 532 nm. U navedenim uvjetima vrijeme zadržavanja je 3 minute. Linearnost ovakve metode bila je od 0.99, a pouzdanost 99 %. Koncentracija MDA u pojedinim dijelovima mozga izražena je kao nmol/g tkiva.

4.15. Patohistološka analiza mozgova

Nakon usmrćivanja mozgovi su fiksirani 48 sata u 4%-tnom puferiranom formalinu te su učinjeni frontalni serijski rezovi. Uzorci su zatim dehidrirani u etanolu rastućih koncentracija (70%, 80%, 96% i 100%). Tkivo je zatim provedeno kroz ksilol te prožeto u tekućem parafinu na temperaturi od +60 °C nakon čega je uklopljeno u parafinske blokove. Tako uklopljeno tkivo bilo je ohlađeno na +4 °C te je rezano na kliznom mikrotomu na rezove debljine 4-5 µm. Ovi rezovi nakon deparafiniranja u ksilolu i dehidracije u opadajućem nizu koncentracije etanola (100%, 96%, 80% i 70%) obojani su hematoksilin-eozinom (HE). Svjetlosnim mikroskopom su slikani neuroni u području strijatuma te brojani na 6 velikih vidnih polja obostrano (Issa, Vamstec). Brojani su neuroni urednog izgleda te hipoksično promijenjeni, crveni neuroni i neuroni nalik na oligodendrocite.

4.16. Statistička obrada podataka

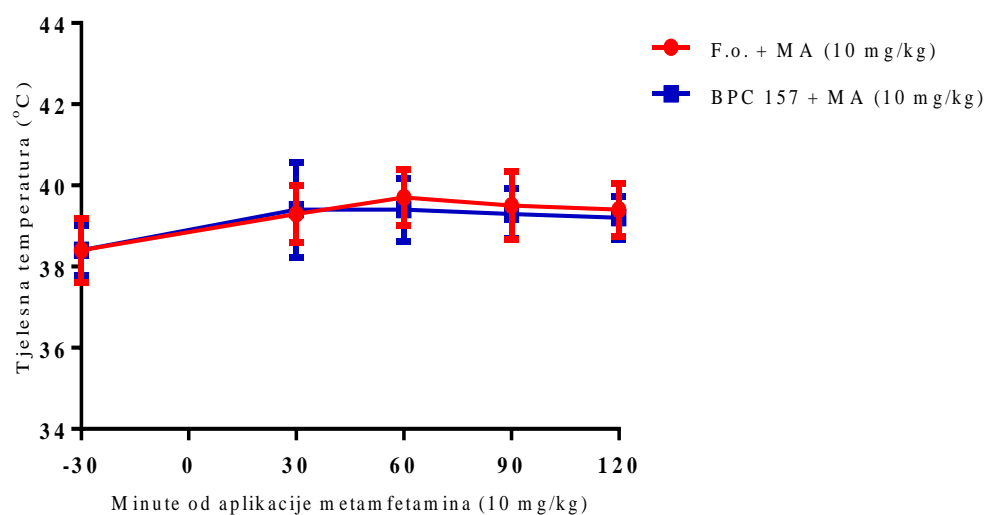
Statistička obrada i grafički prikazi rezultata napravljeni su u programu Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, SAD). Izračunati su ukupni bodovi za opažajne parametre, te aritmetičke sredine i standarne devijacije za svaki mjereni parametar. Normalnost raspodjele prikupljenih podataka unutar pojedinih skupina provjerena je D`Agostino & Pearson omnibus testom normalne distribucije. Značajnost razlika između mjerenih parametara provjerena je Mann-Whitney-evim U-testom kod pokazatelja koji nisu slijedili normalnu raspodjelu, odnosno t-testom sa dvosmjernom distribucijom i jednosmjernom ANOVA-om kod pokazatelja koji su slijedili normalnu raspodjelu. Odnos doza metamfetamina i učinka na lipidnu peroksidaciju (razinu MDA u dijelovima mozgova), ataksiju i finu motoriku prikazan je grafički. Ukoliko je na grafičkom prikazu uočena pozitivna ili negativna korelacija doze i učinka, provjereni su Pearsonov korelacijski koeficijenti za parametre sa normalnom distribucijom ili neparametrijski Spearmanov korelacijski koeficijent za parametre bez normalne distribucije i njihova statistička značajnost, te su navedeni u opisima grafičkih prikaza. Osim toga, na isti način je provjerena korelacija razine MDA u mozgu i izraženosti ataktičnog fenotipa i poremećaja fine motorike.

5. Rezultati

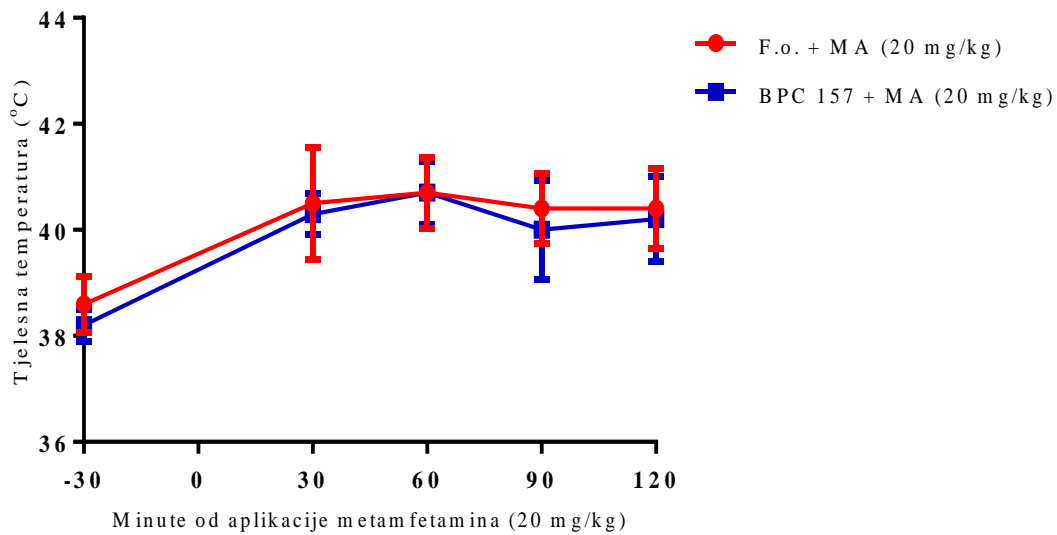
5.1. Tjelesna temperatura

5.1.1. Učinak BPC-a 157 na tjelesnu temperaturu štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom

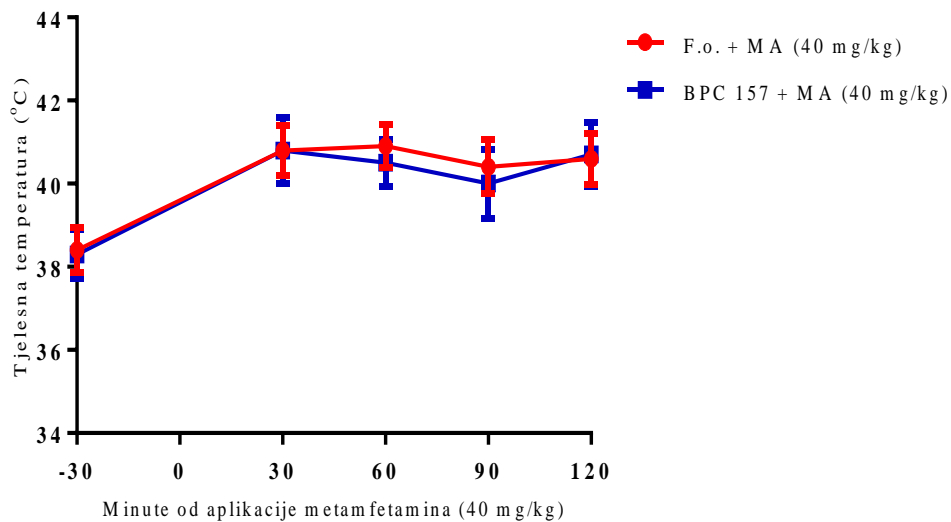
Na slikama 3., 4. i 5. je prikazan učinak BPC-a 157 na hipertermiju uzrokovanu metamfetaminom. Na slikama je vidljivo da BPC 157 ne utječe, odnosno ne snižava hipertermiju uzrokovanu metamfetaminom.



Slika 3. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija tjelesnih temperatura štakorica u prva dva sata nakon aplikacije 10 mg/kg metamfetamina (MA). F.o. – fiziološka otopina



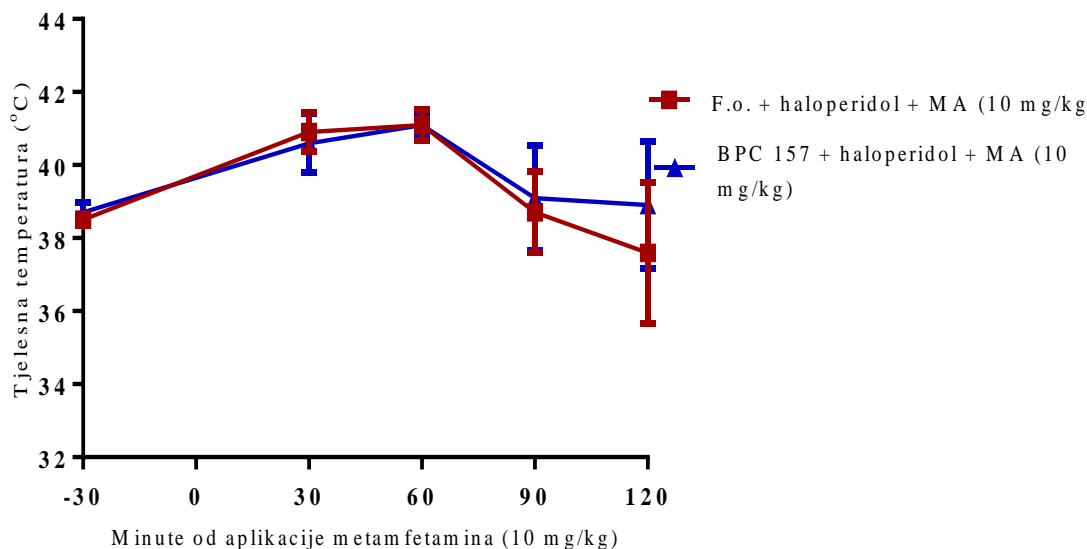
Slika 4. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija tjelesnih temperatura štakorica u prva dva sata nakon aplikacije 20 mg/kg metamfetamina.



Slika 5. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija tjelesnih temperatura štakorica u prva dva sata nakon aplikacije 20 mg/kg metamfetamina.

5.1.2. Učinak BPC-a 157 na tjelesnu temperaturu štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom

Na slici 6. su prikazane aritmetičke sredine tjelesnih temperatura štakorica nakon davanja 10 mg/kg metamfetamina, a treći dan nakon davanja 5 mg/kg haloperidola.



Slika 6. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija tjelesnih temperatura štakorica tretiranih haloperidolom u prva dva sata nakon aplikacije 10 mg/kg metamfetamina.

5.2. Ponašanje i diskinezije

5.2. 1. Učinak BPC-a 157 na ponašanje štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom

Učinak BPC-a 157 i metamfetamina na ponašanje životinja prikazan je u tablicama 7., 8., 9. i 10.

Iz tablica je vidljivo da BPC 157 nije značajno utjecao na promijenjeno ponašanje životinja uzrokovano neurotoksičnim dozama metamfetamina. Isto tako, sa povišenjem doze

metamfetamina ne raste broj bodova za stereotipije, jer se, uslijed jakog neurotoksičnog inzulta većom dozom (npr. 40 mg/kg), životinje nisu u stanju više kretati od životinja na manjim dozama metamfetamina (10 ili 20 mg/kg), njihovi su pokreti podjednako repetitivni.

Tablica 7. Aritmetičke sredine i standardne devijacije (s.d.) ponašanja stimuliranih metamfetaminom u dozi od 10 mg/ kg.

Tretman	Ponašanja ovisna o 5-HT-u				Hod unatrag	Kruženje, okretanje	Ponašanja ovisna o dopaminu			Ukupno
	Dignut rep	Adukcija stražnjih nogu	Tapkanje prednjim nogama	Mahanje glavom			Dizanje na stražnje noge	Grizenje lizanje	Hod naprijed	
F.o. + met. N=18	0,50 ±0,7	1,16 ±1,58	7,83 ±1,72	11,27 ±1,17	3,27 ±3,16	1,94 ±2,85	2,33 ±1,13	2,38 ±3,03	3,27 ±1,64	34,00 ±5,28
BPC 157 + met. N=18	0,61 ±0,97	1,61 ±1,19	7,33 ±2,47	10,61 ± 2,47	3,05 ±2,26	1,11 ±2,19	1,77 ±0,94	3,61 ±2,77	3,05 ±1,62	32,77 ±3,77

Tablica 8. Aritmetičke sredine i standardne devijacije (s.d.) ponašanja stimuliranih metamfetaminom u dozi od 20 mg/ kg.

Tretman	Ponašanja ovisna o 5-HT-u				Hod natrag	Kruženje, okretanje	Ponašanja ovisna o dopaminu			Ukupno
	Dignut rep	Adukcija stražnjih nogu	Tapkanje prednjim nogama	Mahanje glavom			Dizanje na stražnje noge	Grizenje, lizanje	Hod naprijed	
F.o. + met. N=8	0,25 ± 0,46	2,62 ±1,12	8,25 ± 2,60	10,87 ±1,76	4,50 ±2,82	3,87 ±2,79	1,13 ±1,19	5,50 ±1,40	1,75 ±0,99	38,75 ±5,59
BPC 157 + met. N=8	0,25 ± 0,46	0,87 ±1,30	7,25 ± 2,37	10,63 ± 1,88	3,50 ± 2,33	2,13 ± 2,58	1,00 ±0,35	4,37 ±2,26	2,12 ±0,7	32,13 ± 4,15

Tablica 9. Aritmetičke sredine i standardne devijacije (s.d.) ponašanja stimuliranih metamfetaminom u dozi od 40 mg/ kg.

Tretman	Ponašanja ovisna o 5-HT-u				Hod natrag	Kruženje, okretanje	Ponašanja ovisna o dopaminu			Ukupno
	Dignut rep	Adukcija stražnjih nogu	Tapkanje prednjim nogama	Mahanje glavom			Dizanje na stražnje noge	Grizenje lizanje	Hod naprijed	
F.o. + met. N=10	0	3,00 ±2,16	9,10 ±1,85	10,00 ± 2,054	3,22 ±1,30	4,80 ±3,42	1,30 ±1,56	2,80 ±2,04	2,10 ±1,197	36,00 ± 3,197
BPC 157 + met. N=10	0,10 ± 0,3	2,00 ±1,18	9,30 ±2,05	10,40 ± 2	2,60 ± 1,8	3,8 ± 2,75	0,03 ± 0,46	2,80 ± 1,54	2,60 ± 1,28	33,90 ± 4,55

5. 2. 2. Odnos doze metamfetamina i učinka na stereotipije

Pearsonov korelacijski koeficijent doze metamfetamina i ukupnih stereotipija kod kontrolne skupine je 0,24, kod tretirane skupine 0,76.

Spearmanov korelacijski koeficijent doze metamfetamina i izraženosti ponašanja ovisnih o 5-HT-u kod kontrolne skupine je -0,50, a kod BPC 157 skupine 0,50.

Pearsonov korelacijski koeficijent doze metamfetamina i izraženosti ponašanja ovisnih o dopaminu kod kontrolne je skupine -0,98 , a kod tretirane -0,88.

Pearsonov korelacijski koeficijent doze metamfetamina i diskinezija kontrolne je skupine 0,60, a kod tretirane 0,93.

Korelacijski koeficijenti između doza metamfetamina i učinka na ponašanje štakorica nisu bili statistički značajni.

5. 2. 3. Učinak BPC-a 157 na ponašanje štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom

U tablici 10. su prikazani bodovi stereotipija životinja kojima je apliciran haloperidol tri dana prije metamfetamina, kao i životinja kojima je uz haloperidol apliciran BPC 157. Iz tablice je vidljivo da je haloperidol neznatno uzrokovao izraženije stereotipije kod životinja koje su tri dana nakon haloperidola primile metamfetamin u dozi od 10 mg/kg ($39,2 \pm 8,78$) u odnosu na životinje koje su primile samo fiziološku otopinu i metamfetamin u jednakoj dozi ($34 \pm 5,28$). U ovom pokusu je BPC 157 apliciran uz haloperidol djelomično antagonizirao tu preosjetljivost.

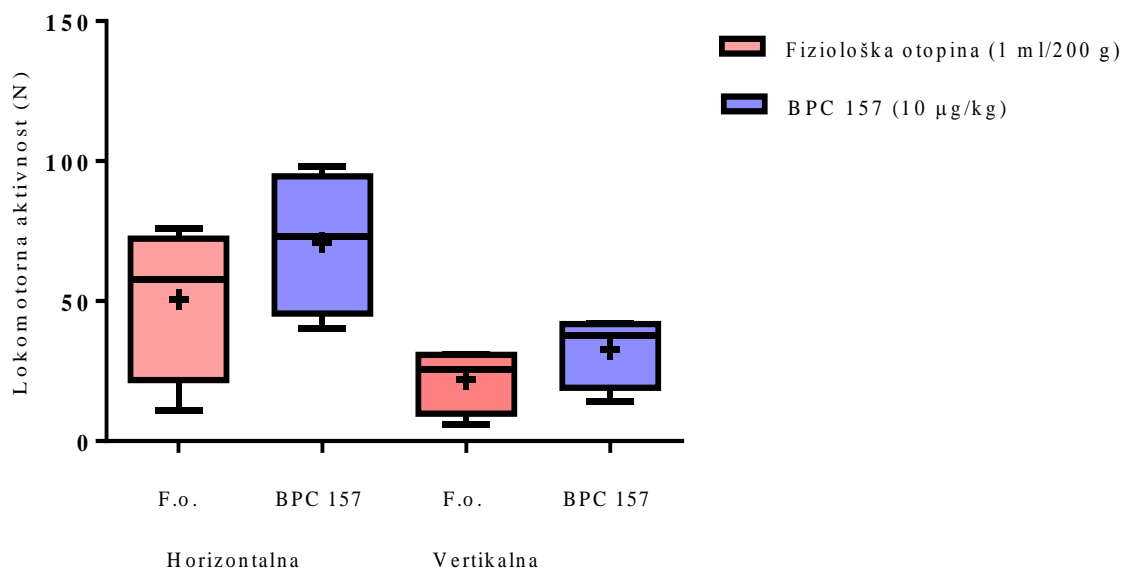
Tablica 10. Aritmetičke sredine i standardne devijacije (s.d.) stereotipija uzrokovanih haloperidolom (5 mg/kg) i metamfetaminom (10 mg/kg).

Tretman	Ponašanja ovisna o 5-HT-u				Hod natrag	Kruženje okretanje	Ponašanja ovisna o dopaminu			Ukupno
	Dignut rep	Adukcija stražnjih nogu	Tapkanje prednjim nogama	Mahanje glavom			Dizanje na stražnje noge	Grizenje lizanje	Hod naprijed	
F.o. + halo. + met. N=6	0	6,6 $\pm 1,67$	3,8 $\pm 2,04$	3,8 $\pm 10,83$	5,8 $\pm 3,76$	8 $\pm 2,82$	1,40 $\pm 0,54$	6,80 $\pm 0,84$	3 $\pm 1,58$	39,2 $\pm 8,78$
BPC 157 + halo. + met. N=6	0,33 $\pm 0,81$	2,33 $\pm 2,06$	0,5 $\pm 0,54$	2,83 $\pm 1,83$	4,83 $\pm 4,07$	6,66 $\pm 3,14$	2,4 $\pm 0,54$	7,66 $\pm 1,63$	3,83 $\pm 2,31$	31,00 $\pm 6,63$

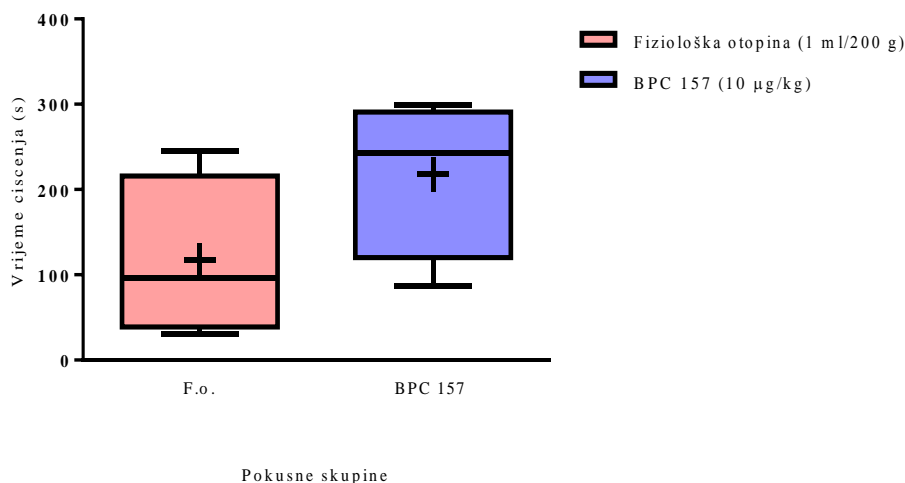
5. 3. Spontana lokomotorna aktivnost

5.3.1. Spontana lokomotorna aktivnost zdravih štakorica kojima je na 24 h uskraćena hrana

Na slikama 7. i 8. prikazana je lokomotorna aktivnost štakorica kojima su aplicirani ili fiziološka otopina ili BPC 157, te im je na 24 h uskraćena hrana. BPC 157 povećava aktivnost štakorica, no zbog velikih varijacija u aktivnosti životinja unutar iste skupine, taj učinak nije statistički značajan.



Slika 7. Aritmetičke sredine (+), najmanje i najveće vrijednosti horizontalne (N) i vertikalne lokomotorne aktivnosti (N) štakorica koje su tretirane fiziološkom otopinom ili BPC-om 157 nakon čega im je na 24 h uskraćena hrana.

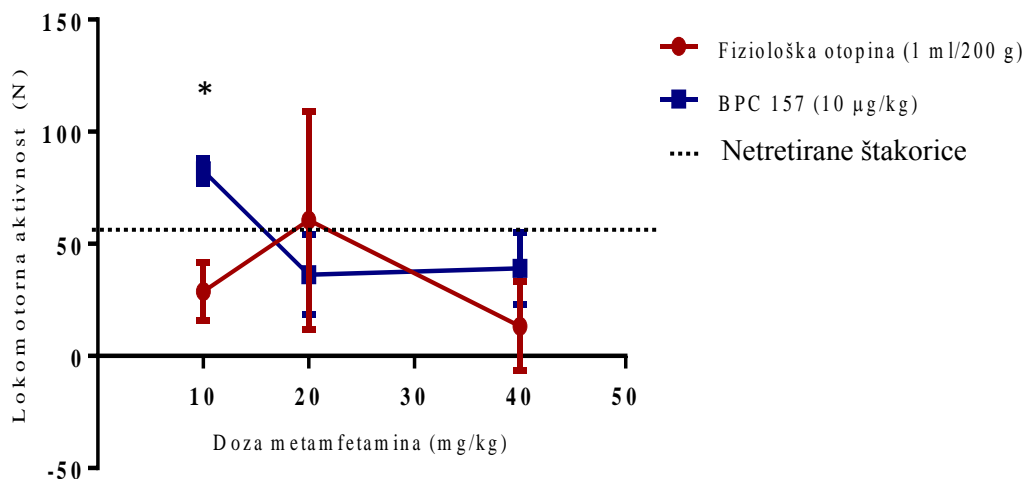


Slika 8. Aritmetičke sredine (+), najmanje i najveće vrijednosti vremena čišćenja štakorica koje su tretirane fiziološkom otopinom ili BPC-om 157 i nakon toga im je na 24 h uskraćena hrana.

5.3.2. Učinak BPC-a 157 na spontanu lokomotornu aktivnost štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom

Učinak BPC-a 157 i metamfetamina apliciranog u tri različite doze (10, 20 ili 40 mg/kg) na spontanu horizontalnu i vertikalnu lokomotornu aktivnost i vrijeme čišćenja krzna štakorica prikazan je na slikama 9., 10. i 11. Crna isprekidana linija označava lokomotornu aktivnost netretiranih štakorica kojima je na 24 h uskraćena hrana. Metamfetamin je doveo do smanjenja horizontalne lokomotorne aktivnosti (broj prijeđenih pravokutnika u kavezu) kod kontrolne skupine štakorica, dok je kod tretirane skupine (BPC 157) aktivnost bila vrlo slična onoj u zdravih životinja (netretiranih metamfetaminom, vidi sliku 7.).

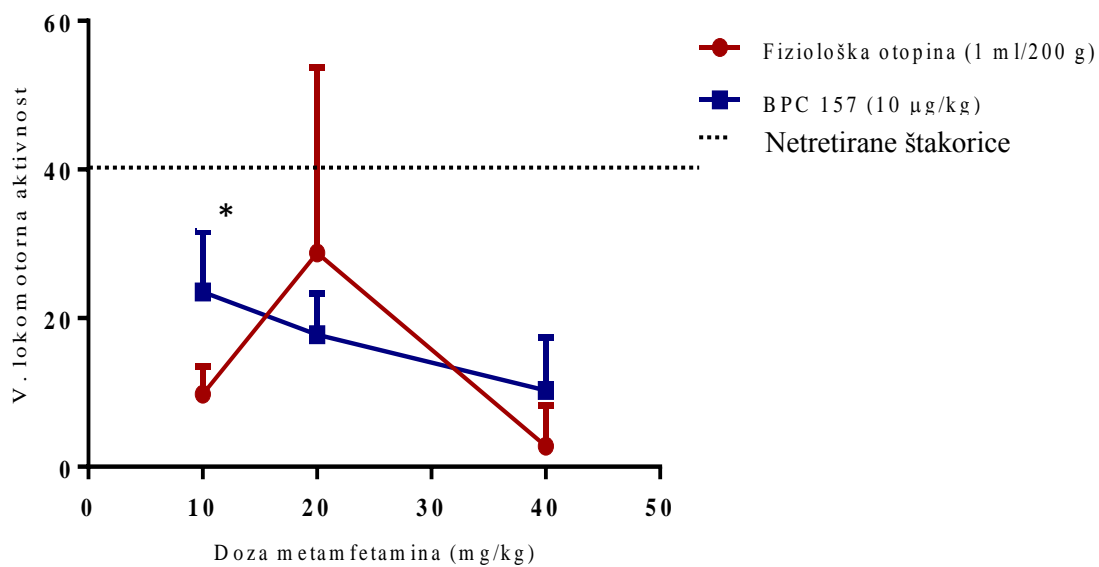
Korelacija doze metamfetamina sa horizontalnom lokomotornom aktivnošću prikazanom na slici 9. kod kontrolne skupine iznosi $-0,494$, a kod tretirane BPC-om 157 -0.720 .



* Značajna razlika uz $P < 0.05$

Slika 9. Aritmetičke sredine, najmanje i najveće vrijednosti horizontalne lokomotorne aktivnosti (N) štakorica 24 h nakon administracije metamfetamina.

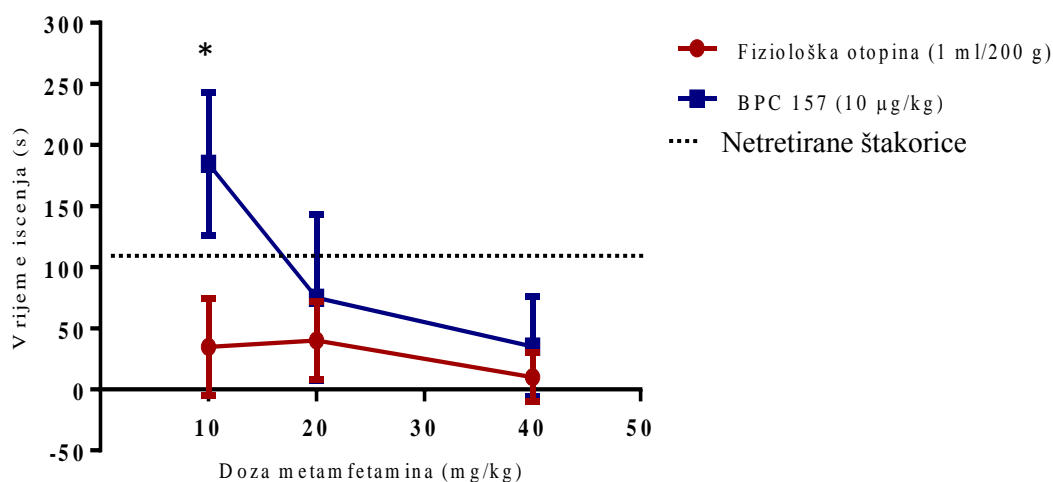
Korelacija doze metamfetamina sa vertikalnom lokomotornom aktivnošću prikazanom na slici 10. kod kontrolne skupine iznosi $-0,437$, a kod tretirane BPC-om 157 $-0,993$.



* Značajna razlika uz $P < 0.05$

Slika 10. Aritmetičke sredine, najmanje i najveće vrijednosti vertikalne lokomotorne aktivnosti (N) štakorica 24 h nakon administracije metamfetamina.

Korelacija doze metamfetamina sa vremenom čišćenja prikazanim na slici 11. kod kontrolne skupine iznosi $-0,878$, a kod tretirane BPC-om 157 $-0,899$.

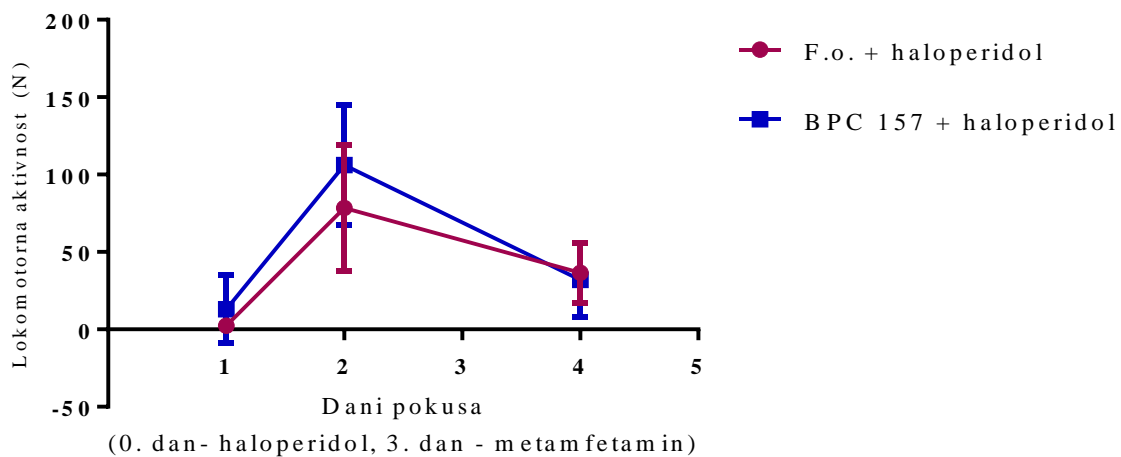


* Značajne razlike uz $P < 0.05$

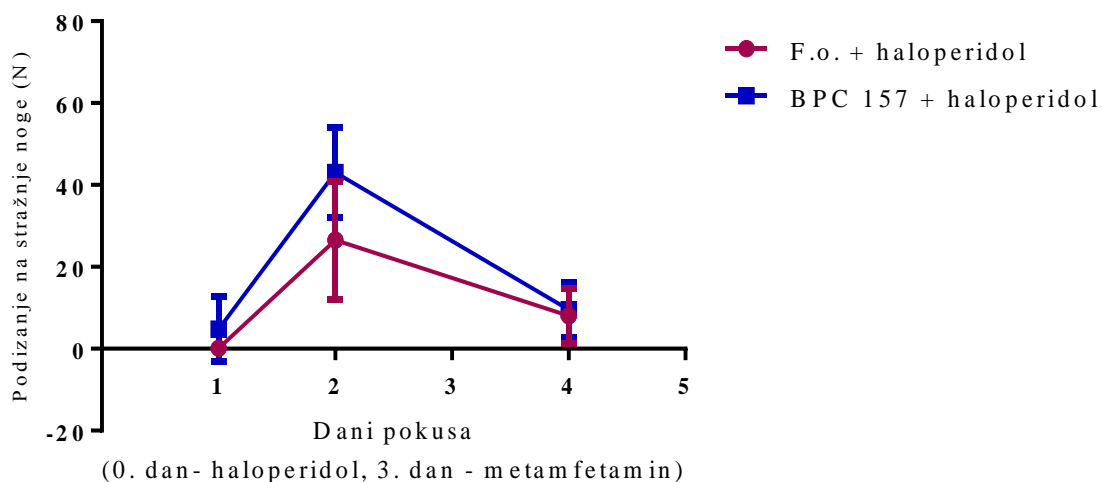
Slika 11. Aritmetičke sredine, najmanje i najveće vrijednosti vremena čišćenja (s) štakorica 24 h nakon administracije metamfetamina.

5.3.3. Učinak BPC-a 157 na spontanu lokomotornu aktivnost štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom

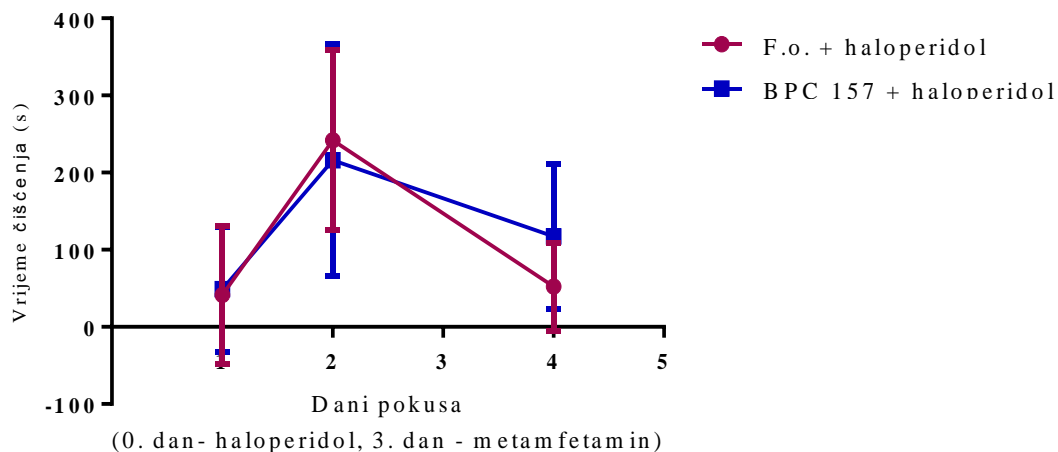
Učinak BPC-a 157 na spontanu lokomotornu aktivnost štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom prikazana je na slikama 12., 13. i 14. U svakoj je skupini bilo po šest štakorica, a nakon davanja metamfetamina (3. dan pokusa) dvije su štakorice iz kontrolne skupine (fiziološka otopina i haloperidol) uginule.



Slika 12. Aritmetičke sredine i standardne devijacije horizontalne lokomotorne aktivnosti (N) štakorica po danima pokusa – prvi, drugi i četvrti dan nakon i.p. aplikacije 5 mg/kg haloperidola (u kombinaciji sa fiziološkom otopinom ili BPC-om 157), s time da je trećeg dana pokusa s.c. aplicirano 10 mg/kg metamfetamina.



Slika 13. Aritmetičke sredine i standardne devijacije vertikalne lokomotorne aktivnosti (N) štakorica po danima pokusa – prvi, drugi i četvrti dan nakon i.p. aplikacije 5 mg/kg haloperidola (u kombinaciji sa fiziološkom otopinom ili BPC-om 157), s time da je trećeg dana pokusa s.c. aplicirano 10 mg/kg metamfetamina.

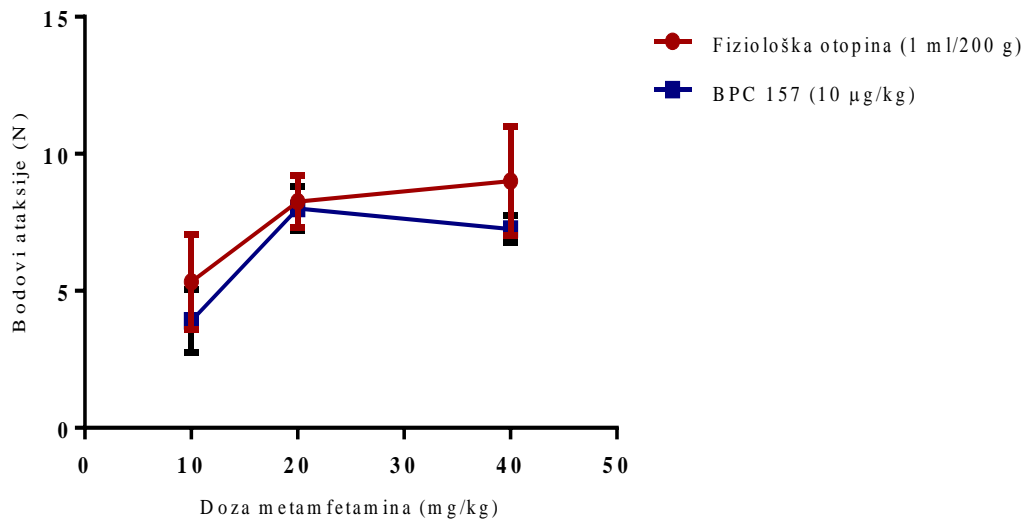


Slika 14. Aritmetičke sredine i standardne devijacije vremena čišćenja krzna (s) štakorica po danima pokusa – prvi, drugi i četvrti dan nakon i.p. aplikacije 5 mg/kg haloperidola (u kombinaciji sa fiziološkom otopinom ili BPC-om 157) , s time da je trećeg dana pokusa s.c. aplicirano 10 mg/kg metamfetamina.

5.4. Ataktični fenotip

5.4.1. Učinak BPC-a 157 na ataksiju u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom

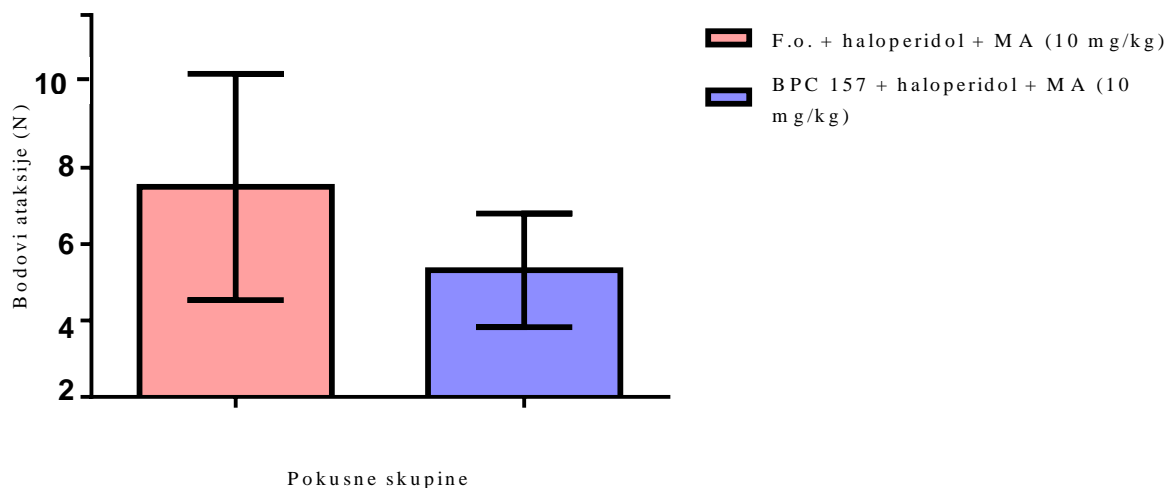
Na slici 15. prikazan je odnos aritmetičkih sredina i standardnih devijacija bodova za ataktični fenotip kontrolne skupine i skupine tretirane sa BPC 157 24 h nakon davanja metamfetamina. Ataksija je bila izraženija kod kontrolne skupine, iako razlike među skupinama nisu bile statistički značajne. Korelacija doze metamfetamina sa učinkom kod kontrolne skupine bila je 0,87, a kod tretirane BPC 157 skupine 0,61.



Slika 15. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija bodova za ataktični fenotip kontrolne skupine i skupine tretirane sa BPC 157 24 h nakon davanja metamfetamina.

5.4.2. Učinak BPC-a 157 na ataksiju u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom

Na slici 16. prikazane su aritmetičke sredine i standardne devijacije bodova za ataktični fenotip kontrolne skupine i skupine tretirane sa BPC 157 24 h nakon davanja 10 mg/kg metamfetamina, a četvrti dan nakon davanja haloperidola. Ataksija je bila izraženija kod kontrolne skupine, iako razlike među skupinama nisu bile statistički značajne.

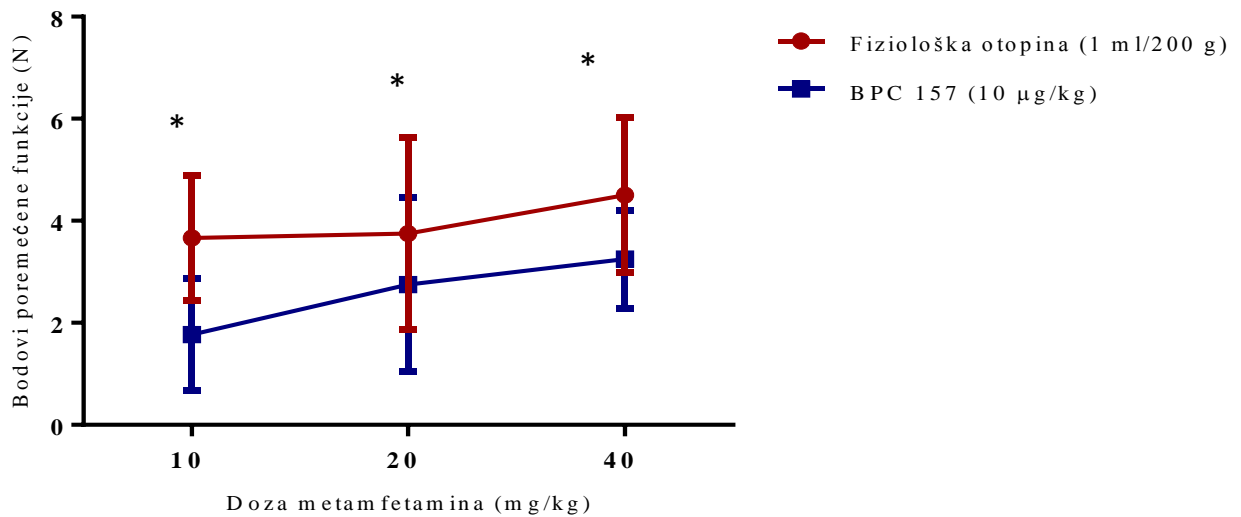


Slika 16. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija bodova za ataktični fenotip kontrolne skupine i skupine tretirane sa BPC 157 24 h nakon davanja metamfetamina.

5.5. Fina motorika

5.5.1. Učinak BPC-a 157 na finu motoriku štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom

Na slici 17. prikazan je odnos učinka različitih doza metamfetamina na poremećaj fine motorike; odnos aritmetičkih sredina i standardnih devijacija bodova za poremećenu funkciju prednjih ekstremiteta životinja koje su prije tri doze metamfetamina dobile fiziološku otopinu (1 ml/200 g) ili BPC 157 (10 µg/kg). Korelacija doze metamfetamina sa oštećenje funkcije prednjih ekstermiteta kod kontrole skupine je bila 0,97, a kod tretirane 0,93.



* Značajne razlike među skupinama uz $P < 0.05$

Slika 17. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija bodova za poremećenu motoriku prednjih ekstremiteta kontrolne skupine i skupine tretirane sa BPC 157 24 h nakon davanja metamfetamina.

U tablici 11. su prikazane aritmetičke sredine za svaki pojedini parametar funkcije prednjih ekstremiteta bodovan prema modificiranoj IBB skali (IRVINE i sur., 2010), kod skupina štakorica koje su primile 10 20 ili 40 mg/kg metamfetamina, uz prethodnu aplikaciju fiziološke otopine ili BPC-a 157. Veći broj bodova podrazumjeva veću nepravilnosti u izvođenju pojedinog parametra. Kod normalnih, zdravih životinja koje pravilno manipuliraju pelatama prilikom hranjenja ukupan zbroj bodova sa IBB skale je 0.

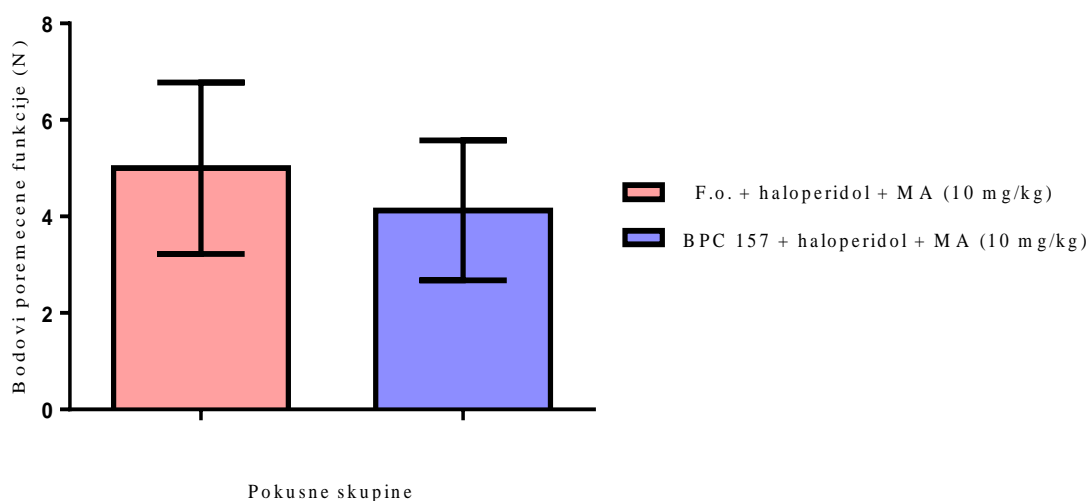
Tablica 11. Aritmetičke sredine i standardne devijacije za svaki parametar funkcije prednjih ekstremiteta štakorica na 10, 20 ili 40 mg/kg metamfetamina uz prethodnu aplikaciju fiziološke otopine (1 ml/200 g) ili BPC-a 157 (10 µg/kg).

Parametar	Fiziološka otopina + metamfetamin			BPC 157 + metamfetamin		
	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
Prilagodba pelete u dlanovima	0,75 ± 0,43	0,75 ± 0,5	1,0 ± 0	0,66 ± 0,47	0,75 ± 0,5	0,75 ± 0,5
Kontura prstiju u odnosu na peletu	0,25 ± 0,43	0,75 ± 0,5	0,80* ± 0,44	0	0,25 ± 0,5	0*
Potpora pelete dlanovima	0,25 ± 0,43	1,0 ± 0	1,0 ± 0	0,25 ± 0,43	0,75 ± 0,5	1,0 ± 0
Hvat pelete	1,0 * ± 0,41	0,75 ± 0,5	1,8* ± 0,84	0,58* ± 0,49	0,25 ± 0,5	0,75* ± 0,5
Mogućnost držanja pelete	0	0	0	0	0	0
Podizanje pelete	0,92* ± 0,27	0,50 ± 0,57	0,8±0,44	0,33* ± 0,47	0,75 ± 0,5	1,0 ± 0
Ukupno	3,66 ± 1,23	3,75 ± 1,9	4,5 ± 1,52	1,77 ± 1,09	2,75 ± 1,7	3,25 ± 0,96

* Značajna razlika među skupinama na istoj dozi metamfetamina uz P < 0,05, t-test

5.5.2. Učinak BPC-a 157 na finu motoriku štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom

Na slici 18. prikazan je odnos aritmetičkih sredina i standardnih devijacija bodova za poremećenu funkciju prednjih ekstremiteta životinja koje su tri dana prije 10 mg/kg metamfetamina dobile fiziološku otopinu (1 ml/200 g) i haloperidol (5 mg/kg) ili BPC 157 (10 µg/kg, 1ml/200 g) i haloperidol (5 mg/kg).



Slika 18. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija bodova za poremećenu motoriku prednjih ekstremiteta dvaju kontrolnih skupina i skupine tretirane sa BPC 157 24 h nakon davanja metamfetamina.

Tablica 12. Aritmetičke sredine i standardne devijacije za svaki parametar funkcije prednjih ekstremiteta štakorica koje su 3 dana prije 10 mg/kg metamfetamina primile haloperidol (5 mg/kg) i fiziološku otopinu (1 ml/200 g) ili BPC 157 (10 µg/kg).

Parametar	Fiziološka otopina + haloperidol + metamfetamin	BPC 157 + haloperidol + metamfetamin
Prilagodba pelete u dlanovima	0,50 ± 0,57	0,66 ± 0,52
Kontura prstiju u odnosu na peletu	1,0 ± 0	0,83 ± 0,41
Potporna pelete dlanovima	1,0 ± 0	0,50 ± 0,55
Hvat pelete	1,50 ± 0,57	1,33 ± 0,52
Mogućnost držanja pelete	0	0,16 ± 0,41
Podizanje pelete	0,50 ± 0,57	0,66 ± 0,51
Ukupno	5,0 ± 1,7	4,13 ± 1,45

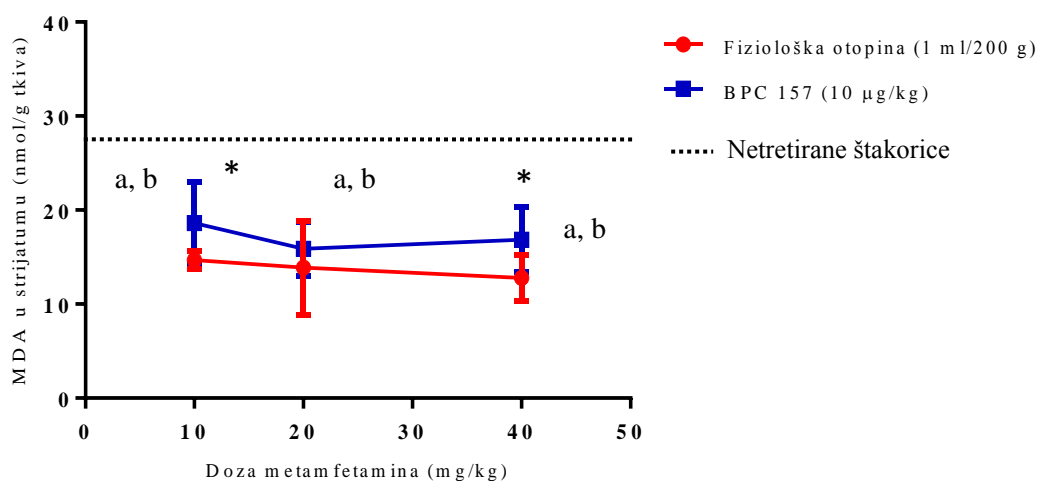
5.6. Lipidna peroksidacija u mozgu

5.6.1. Učinak BPC-a 157 na koncentraciju MDA u dijelovima mozgovih štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom

Na slikama 19.-30. prikazane su aritmetičke sredine i standardne devijacije koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u strijatumu, hipokampusu, diencefalonu, frontalnoj kori, kori velikog mozga i malom mozgu 2 h i 24 h nakon aplikacije 10 mg/kg, 20 mg/kg i 40 mg/kg metamfetamina. Crna isprekidana crta na slikama označava fiziološku razinu MDA u navedenim dijelovima mozga izmjerenu kod zdravih štakorica, a zbog podudarnosti sa eksperimentalnim protokolom na grafičkim prikazima razina MDA izmjerenih 2 h nakon aplikacije metamfetamina ucrtana je prosječna vrijednost MDA kod štakorica koje nisu gladovale, dok je na grafičkim prikazima razina MDA izmjerenih 24 h nakon davanja metamfetamina ucrtana prosječna vrijednost MDA kod netretiranih štakorica koje su gladovale preko noći baš kao i tretirane štakorice (gladovanje je bilo potrebno kako bi drugi dan štakorice jele pelete za test poremećaja fine motorike). Iz slika 19., 21., 23., 25., 27. i 29. je vidljivo da je metamfetamin doveo do statistički značajnog pada razina MDA u prva dva sata od aplikacije. Na slikama 21., 23., 25., 27. i 29. vidljiv je pravilan odnos doze metamfetamina i lipidne peroksidacije, odnosno da porastom doze metamfetamina raste i lipidna peroksidacija u hipokampusu, diencefalonu, kori i malom mozgu 2 h nakon aplikacije metamfetamina, a u diencefalonu taj odnos kod kontrolne skupine ostaje izražen i nakon 24 h. Kod tretirane (BPC 157) skupine životinje vidljiva je visoka korelacija između doze metamfetamina i lipidne peroksidacije u strijatumu i hipokampusu 24 h nakon davanja metamfetamina (slike 20. i 22.), dok se kod kontrolne skupine ta korelacija gubi na dozi metamfetamina od 40 mg/kg i postaje negativna (slike 20. i 22.).

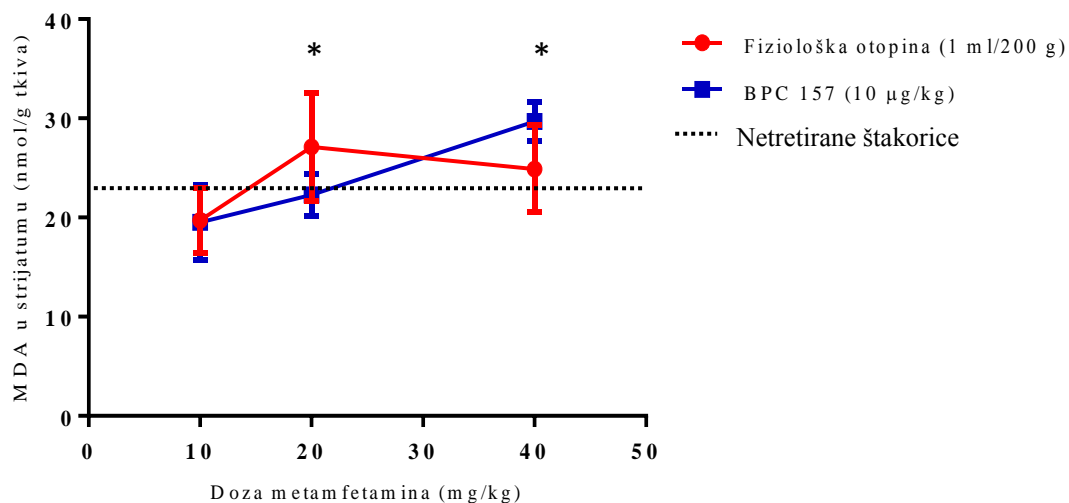
5.6.1.1. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u strijatumu

Slike 19. i 20. prikazuju koncentracije MDA izmjerene u strijatumima štakorica 2h i 24 h nakon davanja sve tri doze metamfetamina uz fiziološku koncentraciju MDA (crna isprekidana linija) kod netretiranih štakorica. Nakon 24 h kod kontrolne skupine korelacija između doze metamfetamina i koncentracije MDA bila je 0,534, a kod tretirane skupine 0,998 i ona je bila statistički značajna.



* Značajne razlike uz $P < 0.05$

Slika 19. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) strijatumu 2 h nakon aplikacije metamfetamina. * Značajne razlike između kontrolne (fiziološka otopina) i tretirane BPC 157 skupine, između ^akontrolne/ ^bBPC 157 skupine i netretiranih štakorica ($P < 0,05$).

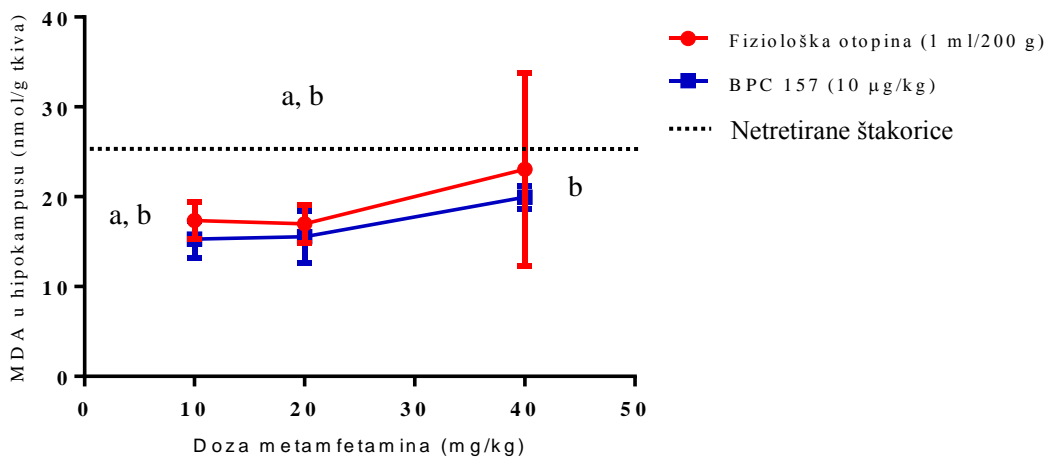


* Značajne razlike uz $P < 0.05$

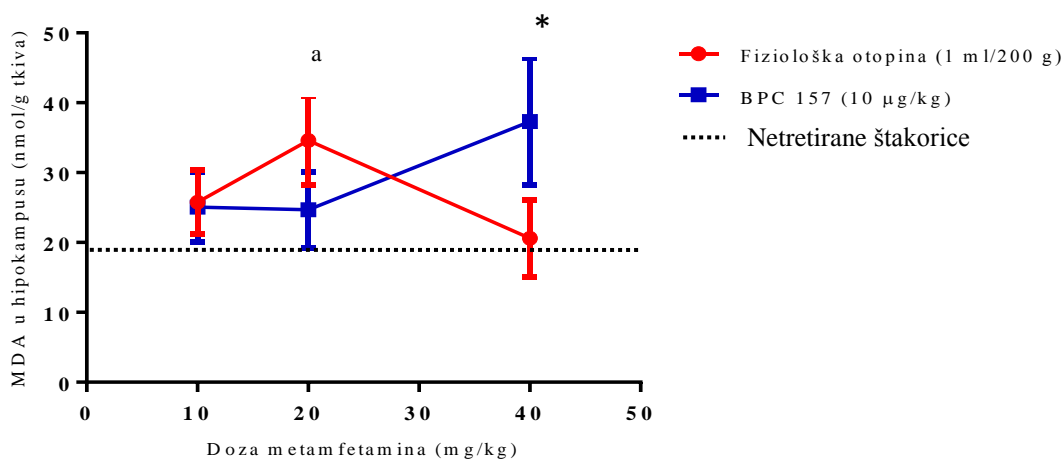
Slika 20. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) strijatumu 24 h nakon aplikacije metamfetamina. *Značajne razlike između kontrolne i BPC 157 skupinane ($P < 0,05$).

5.6.1.2. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u hipokampusu

Na slikama 21. i 22. prikazane su koncentracije MDA izmjerene u hipokampusima 2h i 24 h nakon davanja sve tri doze metamfetamina uz fiziološku koncentraciju MDA (crna isprekidana linija). Kod kontrolne skupine je 2 h nakon davanja metamfetamina korelacija između doze metamfetamina i koncentracije MDA bila 0,9257, a kod BPC 157 skupine 0,9605. Nakon 24 h kod kontrolne skupine je korelacija između doze metamfetamina i koncentracije MDA bila negativna, -0,5356, a kod tretirane skupine pozitivna; 0,9352.



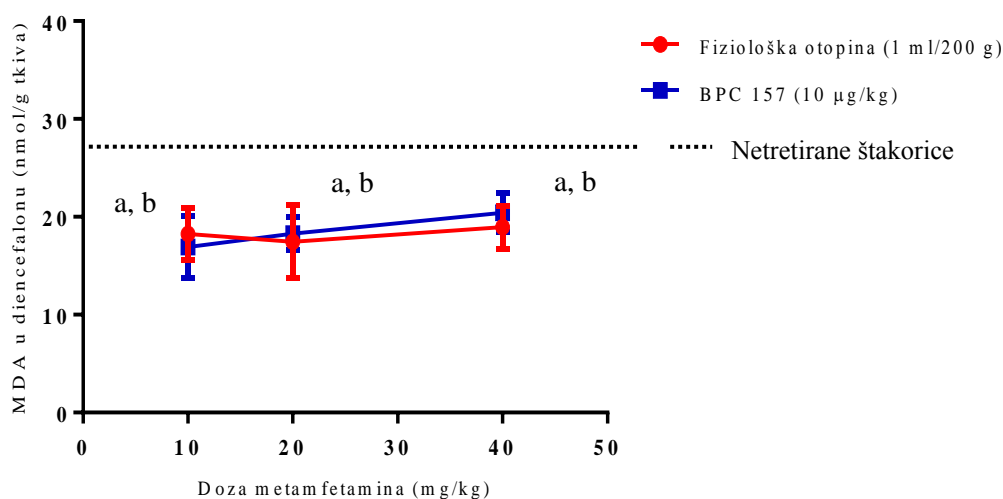
Slika 21. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u hipokampusu 2 h nakon aplikacije metamfetamina. ^aStatistički značajna razlika između kontrolne skupine i netretiranih štakorica, ^bstatistički značajna razlika između BPC 157 i netretiranih štakorica (P<0,05).



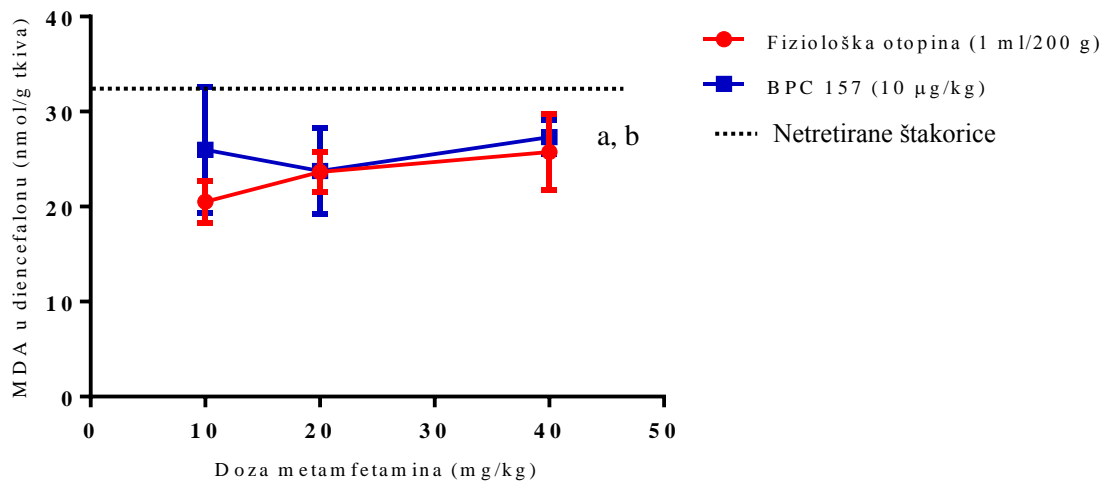
Slika 22. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u hipokampusu 24 h nakon aplikacije metamfetamina. *Značajne razlike među tretiranim skupinama, ^a između kontrolne skupine i netretiranih štakorica (P<0,05).

5.6.1.3. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u diencefalonu

Na slikama 23. i 24. prikazane su koncentracije MDA izmjerene u diencefalonima 2 i 24 h nakon davanja sve tri doze metamfetamina uz fiziološku koncentraciju MDA (crna isprekidana linija). Kod kontrolne skupine je 2 h nakon davanja metamfetamina korelacija između doze metamfetamina i koncentracije MDA bila 0,624, a kod tretirane skupine je bila 0,998 i statistički značajna. Nakon 24 h kod kontrolne skupine je korelacija između doze metamfetamina i koncentracije MDA bila 0,952, a kod tretirane skupine 0,539.



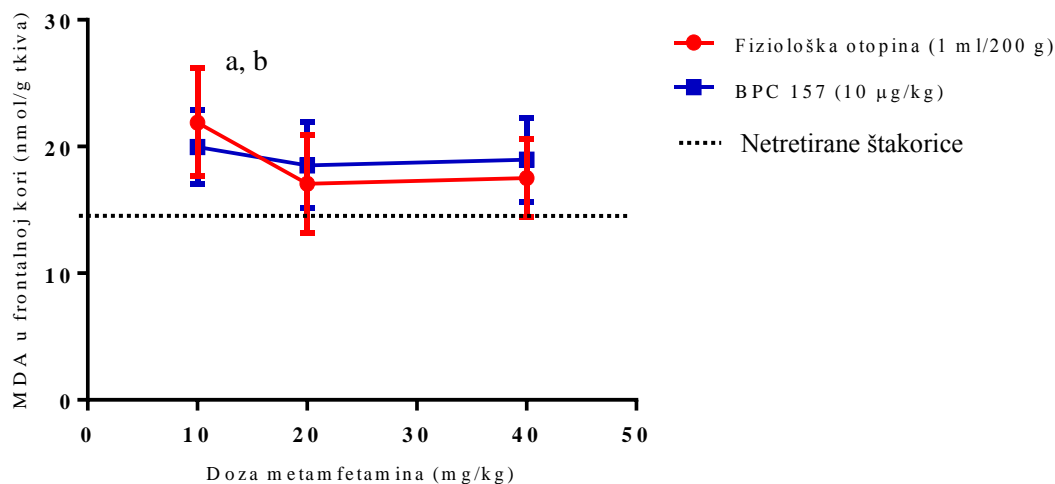
Slika 23. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u diencefalonu 2 h nakon aplikacije metamfetamina. ^aStatistički značajna razlika između kontrolne skupine i netretiranih štakorica, ^b između BPC 157 i netretiranih štakorica ($P < 0,05$).



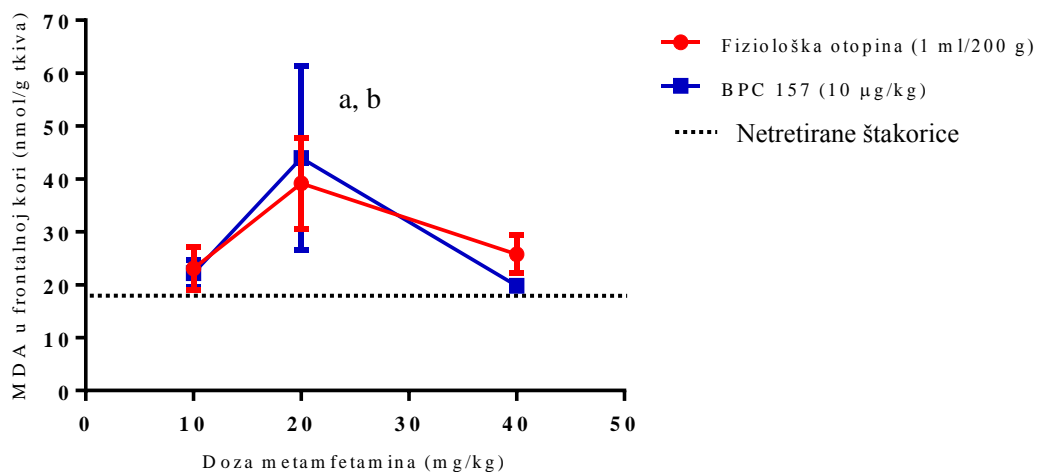
Slika 24. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u diencefalonu 24 h nakon aplikacije metamfetamina. ^aStatistički značajna razlika između kontrolne skupine i netretiranih štakorica, ^b između BPC 157 i netretiranih štakorica ($P < 0,05$).

5.6.1.4. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u frontalnoj kori velikog mozga

Na slikama 25. i 26. prikazane su koncentracije MDA izmjerene u frontalnim korama velikog mozga 2 i 24 h nakon aplikacije tri doze metamfetamina uz fiziološku koncentraciju MDA (crna isprekidana linija). Nije uočen porast ili pad koncentracije MDA sa dozom metamfetamina.



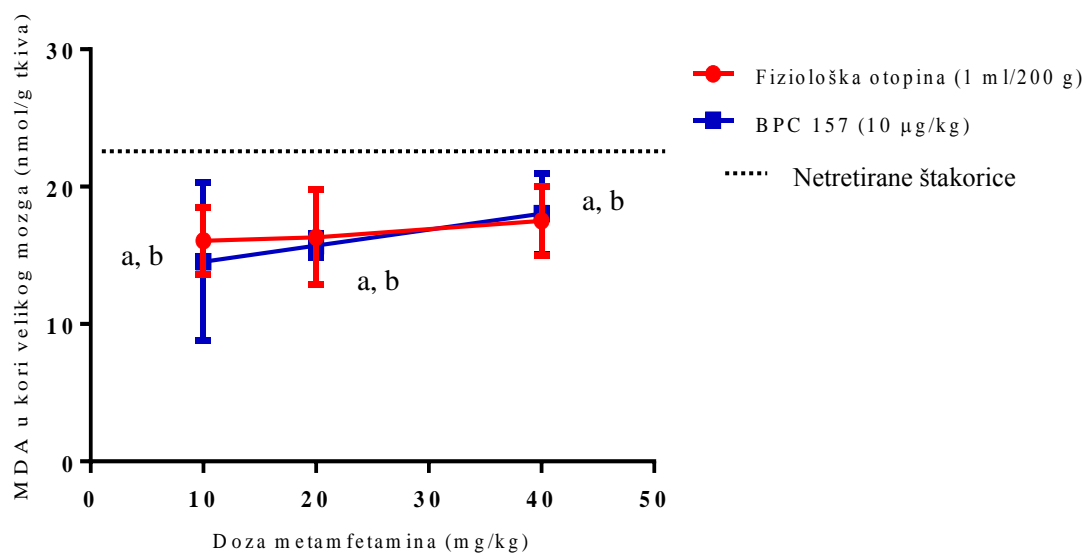
Slika 25. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u frontalnoj kori 2 h nakon aplikacije metamfetamina. ^aStatistički značajna razlika između kontrolne skupine i netretiranih štakorica, ^b između BPC 157 i netretiranih štakorica ($P < 0,05$).



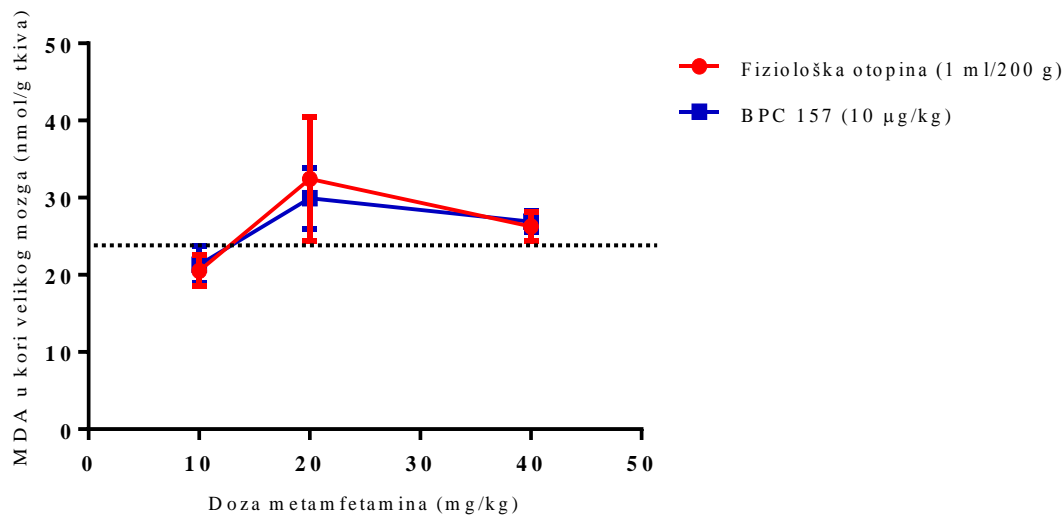
Slika 26. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u frontalnoj kori 24 h nakon aplikacije metamfetamina. ^aStatistički značajna razlika između kontrolne skupine i netretiranih štakorica, ^bstatistički značajna razlika između BPC 157 i netretiranih štakorica ($P < 0,05$).

5.6.1.5. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u kori velikog mozga

Na slikama 27. i 28. prikazane su koncentracije MDA izmjerene u kori velikog mozga 2 i 24 h nakon aplikacije metamfetamina uz fiziološku koncentraciju MDA (crna isprekidana linija). Kod kontrolne skupine je 2 h nakon davanja metamfetamina korelacija između doze metamfetamina i koncentracije MDA bila 0,984, a kod tretirane skupine je bila 1,0 i statistički značajna.



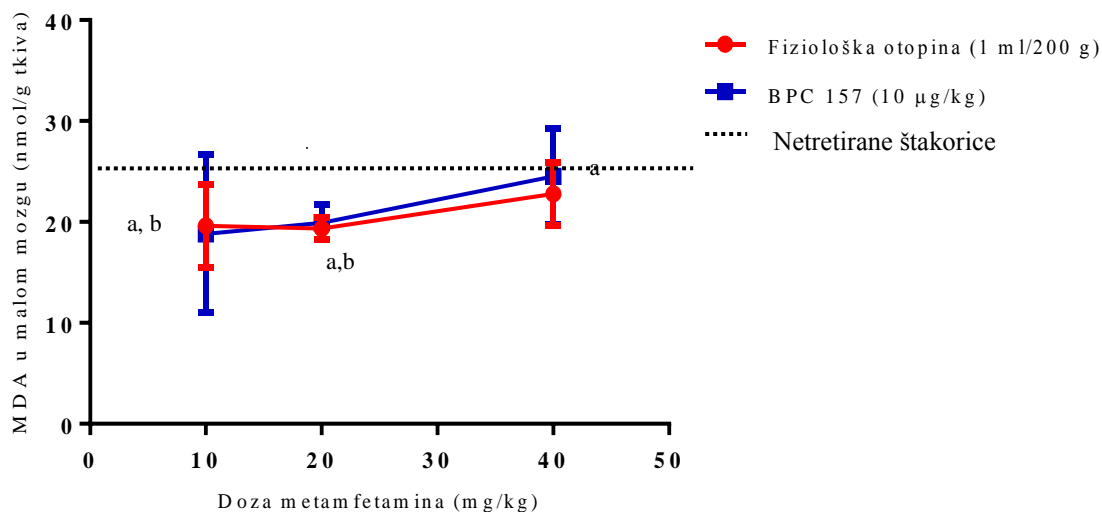
Slika 27. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u kori velikog mozga 2 h nakon aplikacije metamfetamina. ^aStatistički značajna razlika između kontrolne skupine i netretiranih štakorica, ^b između BPC 157 i netretiranih štakorica ($P < 0,05$).



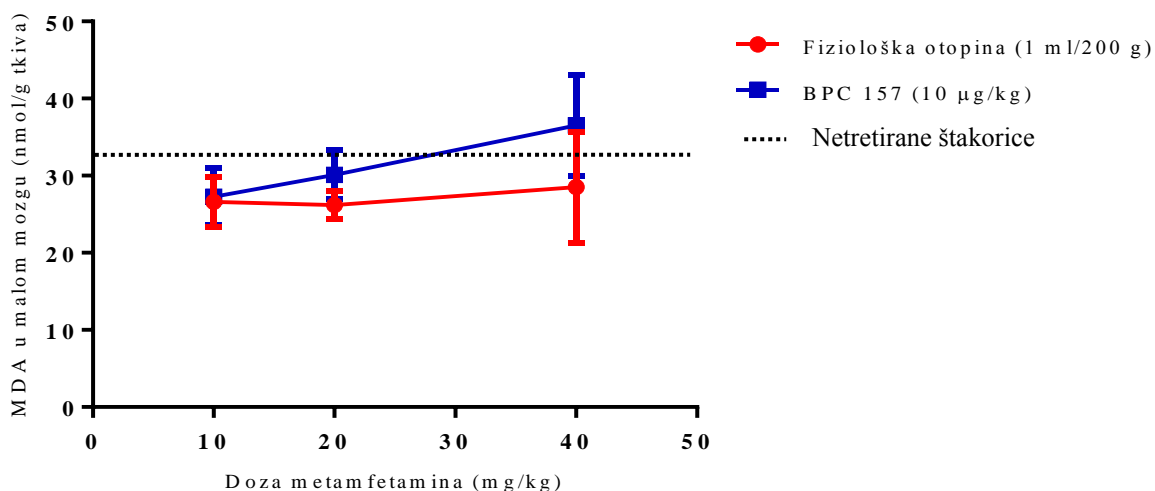
Slika 28. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u kori velikog mozga 24 h nakon aplikacije metamfetamina.

5.6.1.6. Koncentracije MDA (nmol/g tkiva) izmjerene u malom mozgu

Slike 29. i 30. prikazuju koncentracije MDA izmjerene u malom mozgu 2h i 24 h nakon davanja sve tri doze metamfetamina uz fiziološku koncentraciju MDA (crna isprekidana linija). Nakon 2 h kod kontrolne skupine korelacija između doze i učinka bila je 0,9205, a kod tretirane skupine 0,9888, no ona nije bila statistički značajna. Nakon 24 h kod kontrolne skupine korelacija između doze i učinka bila je 0,8748, a kod tretirane skupine 0,999 i ona je bila statistički značajna.



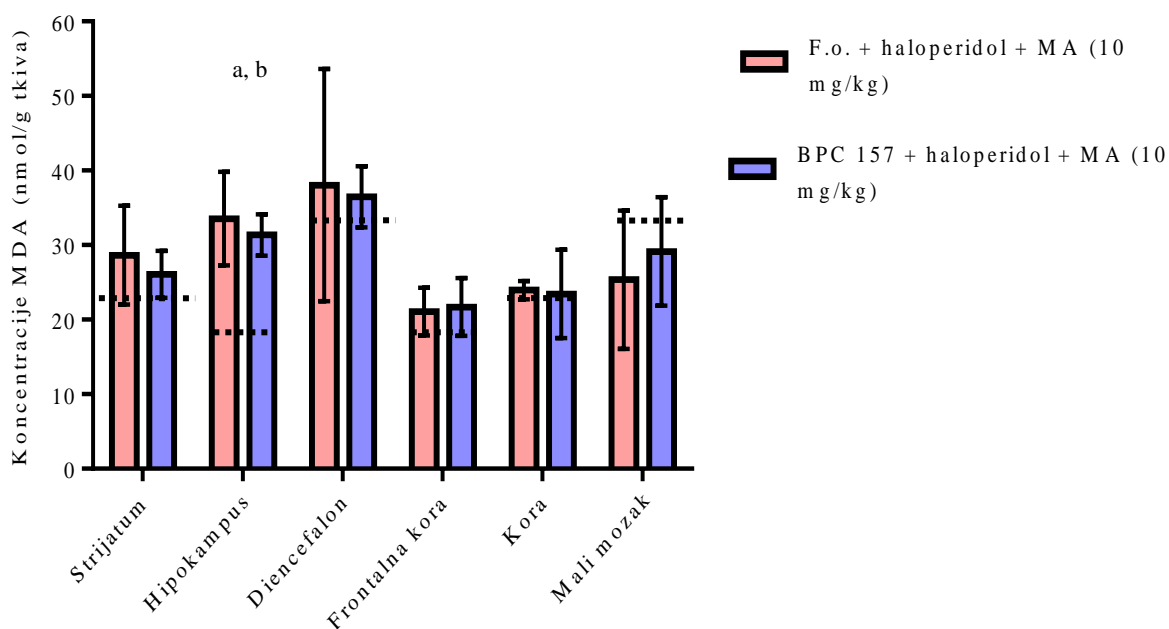
Slika 29. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u malom mozgu 2 h nakon aplikacije metamfetamina. ^aStatistički značajna razlika između kontrolne skupine i netretiranih štakorica, ^b između BPC 157 i netretiranih štakorica ($P < 0,05$).



Slika 30. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u malom mozgu 24 h nakon aplikacije metamfetamina.

5.6.2. Učinak BPC-a 157 na koncentraciju MDA u dijelovima mozgovia štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom

Na slici 31. prikazana je koncentracija MDA (nmol/g tkiva) u mozgovima štakorica 24 h nakon aplikacije 10 mg/kg metamfetamina, uz prethodnu (72 h) aplikaciju fiziološke otopine, haloperidola i/ili BPC-a 157. Crna isprekidana linija pokazuje aritmetičku sredinu fizioloških vrijednosti MDA u pojedinim dijelovima mozga kod štakorica kojima je na 24 h uskraćena hrana (kao i štakoricama u pokusu).



Slika 31. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija koncentracija MDA (nmol/g tkiva) 24 h nakon aplikacije 10 mg/kg metamfetamina, a 96 h nakon aplikacije fiziološke otopine, haloperidola i BPC-a 157. Isprekidane crte prikazuju vrijednosti kod netretiranih, zdravih štakorica.^aStatistički značajna razlika između kontrolne skupine i netretiranih štakorica, ^b između BPC 157 i netretiranih štakorica ($P < 0,05$).

5.6.3. Korelacije između lipidne peroksidacije u mozgu i oštećenja motorike i ravnoteže

U tablicama 13. i 14. su prikazani odnosi (Pearsonov koeficijent korelacije) između aritmetičkih sredina i standardnih devijacija razina MDA u mozgu i poremećaja funkcije prednjih ekstremiteta i izraženosti ataktičnog fenotipa kod kontrolne skupine (tablica 13.) i kod štakorica koje su dobile BPC 157 (tablica 14).

Tablica 13. Korelacije koncentracija MDA u dijelovima mozga sa brojem bodova za oštećenja motorike i ravnoteže kod životinja koje su dobile fiziološku otopinu prije metamfetamina.

Parametar	Koncentracija MDA (nmol/g tkiva)					
	Strijatum	Hipokampus	Diencefalon	Frontalna kora	Kora	Mali mozak
Poremećena funkcija prednjih ekstremiteta (N)	0,322	-0,718	0,855	-0,266	0,077	0,964
Ataktični fenotip (N)	0,883	-0,046	0,978	0,467	0,739	0,519

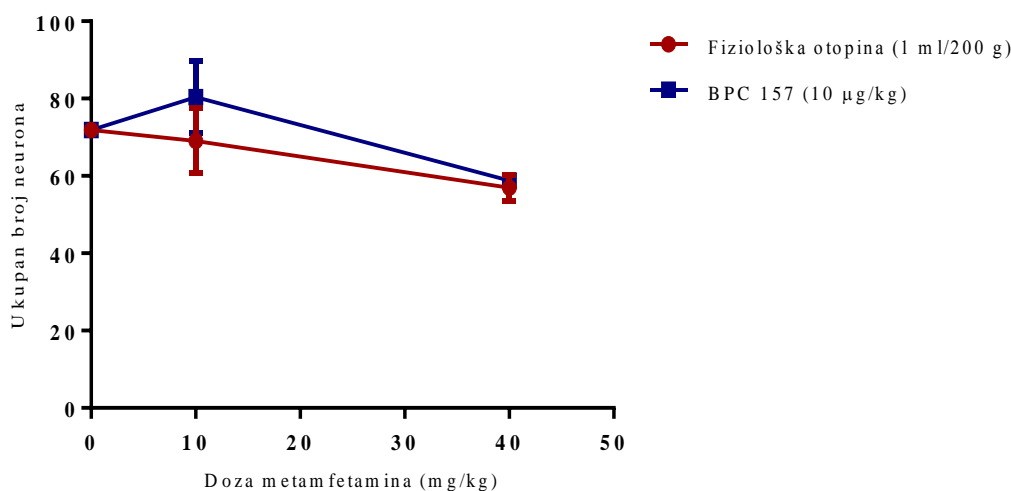
Tablica 14. Korelacije koncentracija MDA u dijelovima mozga sa brojem bodova za oštećenja motorike i ravnoteže kod skupine životinja tretiranih sa BPC-om 157 prije metamfetamina.

Parametar	Koncentracija MDA (nmol/g tkiva)					
	Strijatum	Hipokampus	Diencefalon	Frontalna kora	Kora	Mali mozak
Poremećena funkcija prednjih ekstremiteta (N)	0,904	0,740	0,194	0,095	0,77	0,919
Ataktični fenotip (N)	0,580	0,316	-0,312	0,570	0,904	0,609

5.7. Učinak na broj zdravih neurona u strijatumu

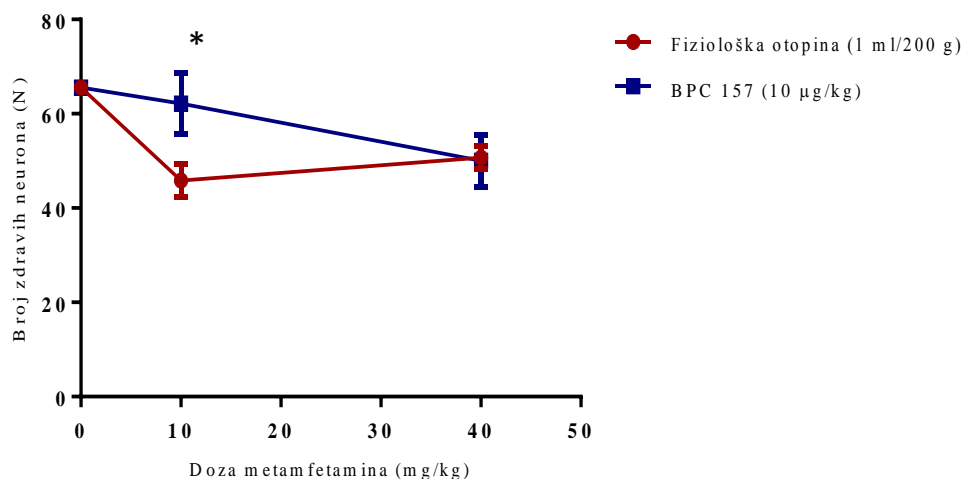
5.7.1. Učinak BPC-a 157 na broj i izgled neurona u strijatumima štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane sa metamfetaminom

Na slikama 32. 33. i 34. prikazane su aritmetičke sredine i standardne devijacije ukupnog broja neurona, broja neurona zdravog izgleda te zbroja crvenih, hipoksičnih neurona i neurona nalik oligodendrocitima u strijatumu štakorica usmrćenih 24 h nakon administracije 10 mg/kg i 40 mg/kg metamfetamina. Korelacija doze metamfetamina sa ukupnim brojem neurona kod kontrolne skupine je negativna i statistički značajna a iznosi -0.998, dok je kod skupine tretirane BPC-om 157 također negativna no nije statistički značajna, a iznosi 0.800 (Pearson, $P < 0.05$).



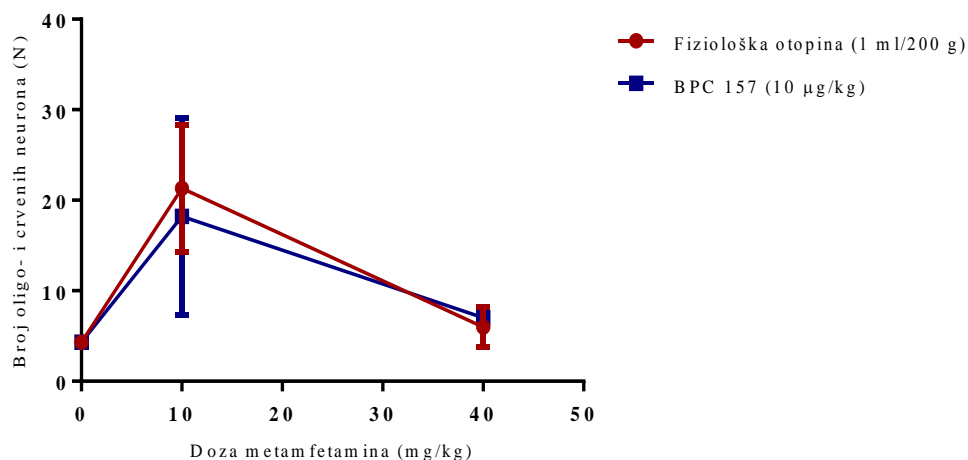
Slika 32. Prikaz odnosa aritmetičkih sredina i standardnih devijacija ukupnog broja neurona (N) u strijatumima štakorica koje nisu dobile metamfetamin (0 mg/kg), te 24 h nakon 10 mg/kg i 40 mg/kg metamfetamina.

Korelacija doze metamfetamina sa brojem neurona zdravog izgleda kod kontrolne skupine iznosi -0.503, a kod tretirane BPC-om 157 -0.999 i statistički je značajna (Pearson, $P < 0.05$).



* Značajne razlike uz $P < 0.05$

Slika 33. Prikaz odnosa aritmetičkih sredina i standardnih devijacija broja zdravih neurona (N) u strijatumu štakorica koje nisu dobile metamfetamin (0 mg/kg), te 24 h nakon 10 mg/kg i 40 mg/kg metamfetamina.



Slika 34. Prikaz odnosa aritmetičkih sredina i standardnih devijacija zbroja crvenih, hipoksičnih neurona i neurona nalik oligodendrocitima u strijatumu štakorica koje nisu dobile metamfetamin (0 mg/kg), te štakorica usmrćenih 24 h nakon administracije 10 mg/kg i 40 mg/kg metamfetamina.

5.7.2. Korelacija broja neurona u strijatumu sa poremećajem fine motorike i ravnoteže

Provjeren je odnos broja zdravih neurona i neurona nalik oligodendrocitima i poremećaja u finoj motorici i ravnoteži kod štakorica koje su dobile 10 mg/kg metamfetamina (uspoređivane su individualne vrijednosti). Pearsonovi korelacijski koeficijenti su navedeni u tablici 15. Nije bilo statistički značajnih korelacija.

Tablica 15. Korelacije broja zdravih i promijenjenih neurona sa poremećenom funkcijom prednjih ekstremiteta i ataktičnim fenotipom štakorica koje su primile 10 mg/kg metamfetamina uz prethodnu aplikaciju fiziološke otopine (1 ml/200 g) ili BPC-a 157 (10 µg/kg)

Pokusne skupine	Parametar poremećene motorike i ravnoteže	Broj zdravih neurona	Broj neurona promijenjenog izgleda (oligo)
Kontrolna skupina (Fiziološka otopina)	Poremećena funkcija prednjih ekstremiteta (N)	0,233	-0,2336
	Ataktični fenotip (N)	0,522	0,545
Tretirana skupina (BPC 157)	Poremećena funkcija prednjih ekstremiteta (N)	0,520	0,160
	Ataktični fenotip (N)	-0,838	0,862

5.7.3. Korelacija broja neurona u strijatumu sa koncentracijom MDA u strijatumu

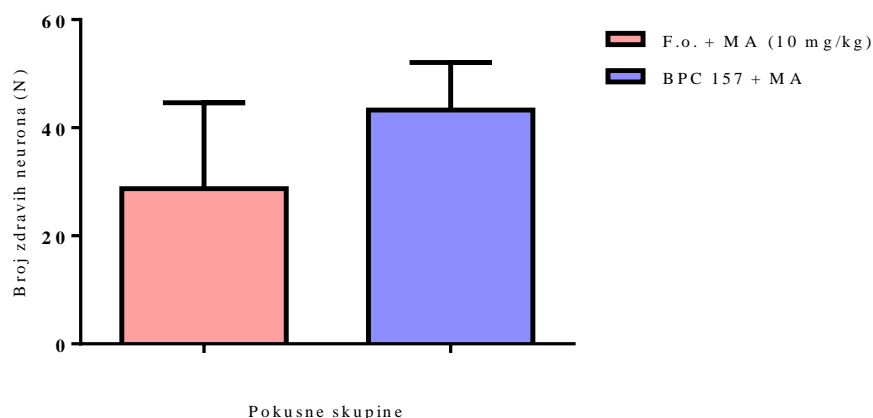
Provjeren je odnos aritmetičkih sredina i standardnih devijacija broja neurona sa aritmetičkim sredinama i standardnim devijacijama koncentracija MDA u strijatumu bez metamfetamina, nakon doze od 10 mg/kg i 40 mg/kg metamfetamina. Pearsonovi korelacijski koeficijenti su navedeni u tablici 16. Nije bilo statistički značajnih korelacija.

Tablica 16. Korelacije aritmetičkih sredina broja neurona sa aritmetičkim sredinama koncentracija MDA u strijatumu štakorica koje su primile 10 mg/kg ili 40 mg/kg metamfetamina uz prethodnu aplikaciju fiziološke otopine (1 ml/200 g) ili BPC-a 157 (10 µg/kg).

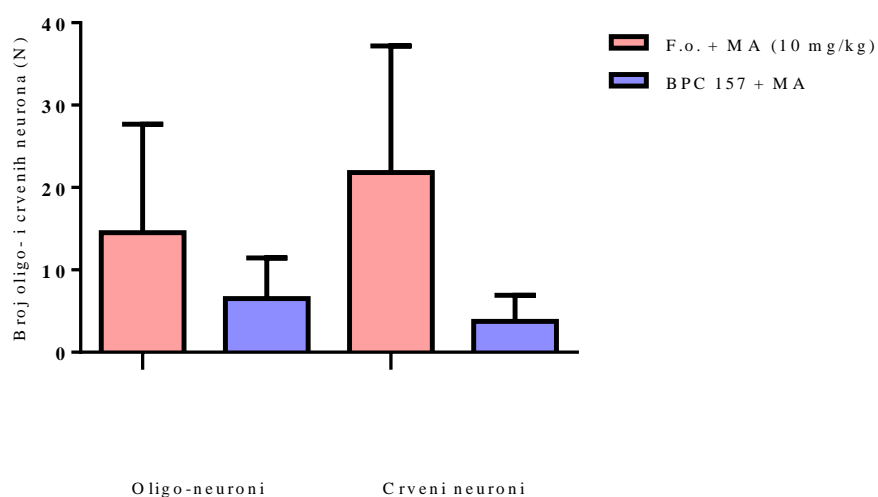
Pokusne skupine	Koncentracija MDA u strijatumu (nmol/g tkiva)	Ukupan broj neurona	Broj zdravih neurona	Broj neurona promijenjenog izgleda
Kontrolna skupina (Fiziološka otopina)	2 h nakon metamfetamina	0,7246	0,9402	-0,483
	24 h nakon metamfetamina	-0,6054	0,4420	-0,923
Tretirana skupina (BPC 157)	2 h nakon metamfetamina	0,2148	0,02584	-0,576
	24 h nakon metamfetamina	-0,5544	0,7379	-0,988

5.7.4. Učinak BPC-a 157 na broj i izgled neurona u ventralnom tegmentalnom području i SNc štakorica u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane sa metamfetaminom

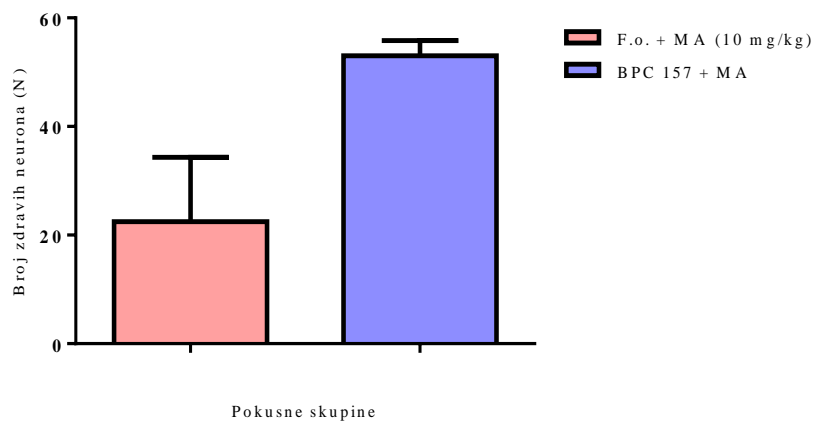
Na slikama 35.-38. prikazane su iste vrijednosti za ventralno tegmentalno područje i SNc štakorica usmrćenih 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina.



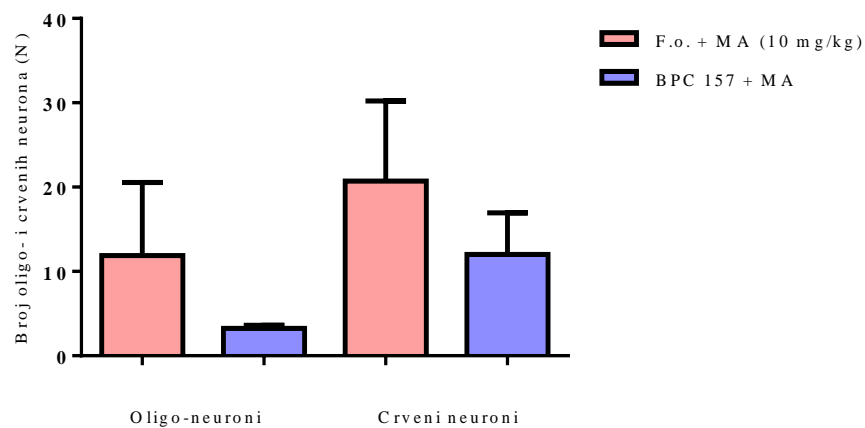
Slika 35. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija broja zdravih neurona (N) u ventralnom tegmentalnom području štakorica 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina.



Slika 36. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija broja neurona nalik oligodendrocitima (oligo-neuroni) i crvenih, hipoksičnih neurona (N) u ventralnom tegmentalnom području štakorica 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina.



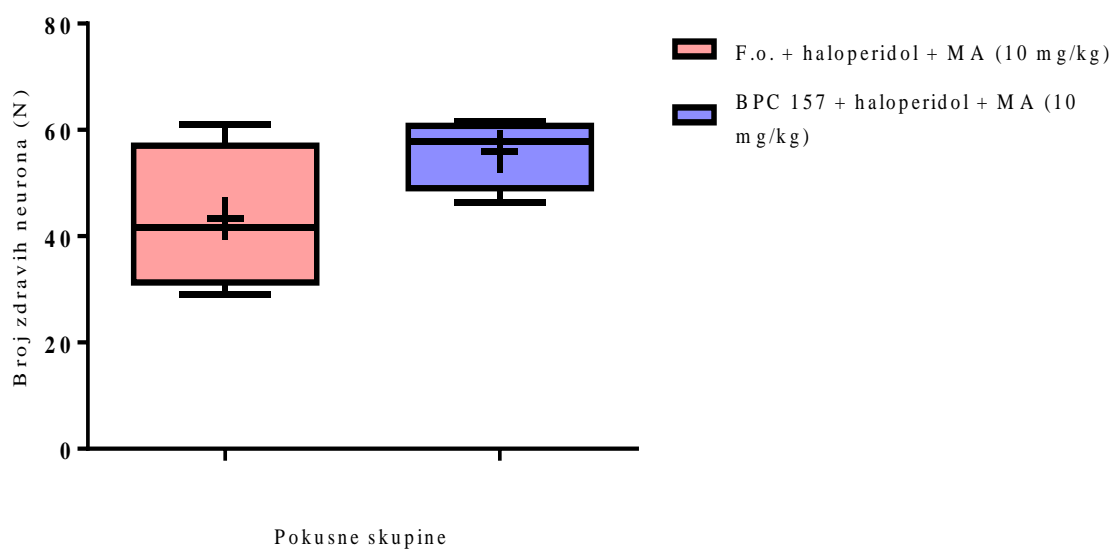
Slika 37. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija broja zdravih neurona (N) u SNc štakorica 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina.



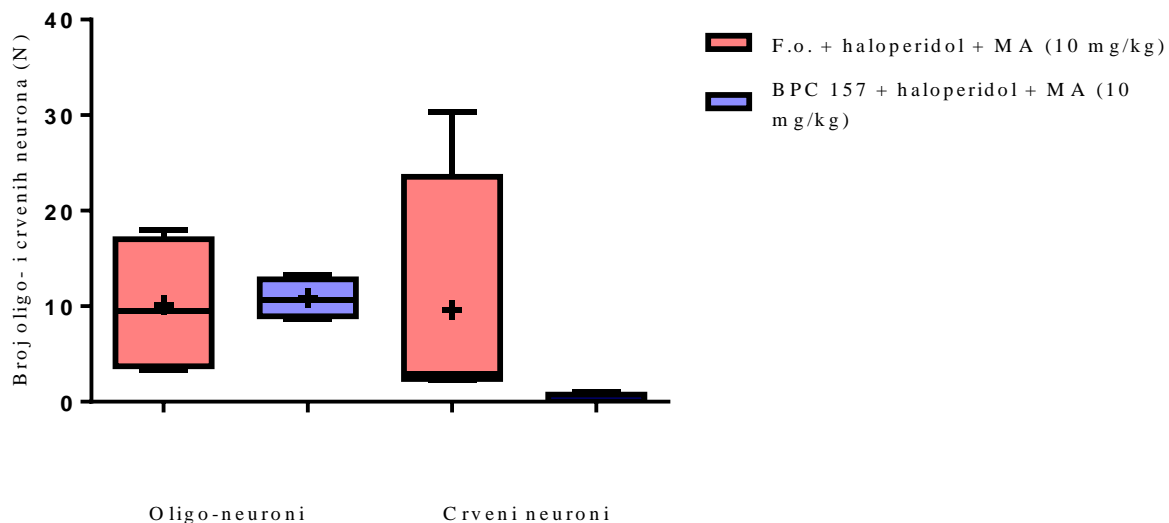
Slika 38. Prikaz aritmetičkih sredina i standardnih devijacija broja neurona nalik oligodendrocitima (oligo-neuroni) i crvenih, hipoksičnih neurona (N) u SNc štakorica 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina.

5.7.5. Učinak BPC-a 157 na broj i izgled neurona u strijatumima štakorica u modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom

Na slici 39. prikazane su aritmetičke sredine, najveće i najmanje vrijednosti broja zdravih neurona, a na slici 40. crvenih, hipoksičnih neurona i neurona nalik oligodendrocitima (oligo-neuroni) u strijatumu štakorica usmrćenih 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina, a koje su 72 h prije metamfetamina dobile haloperidol.

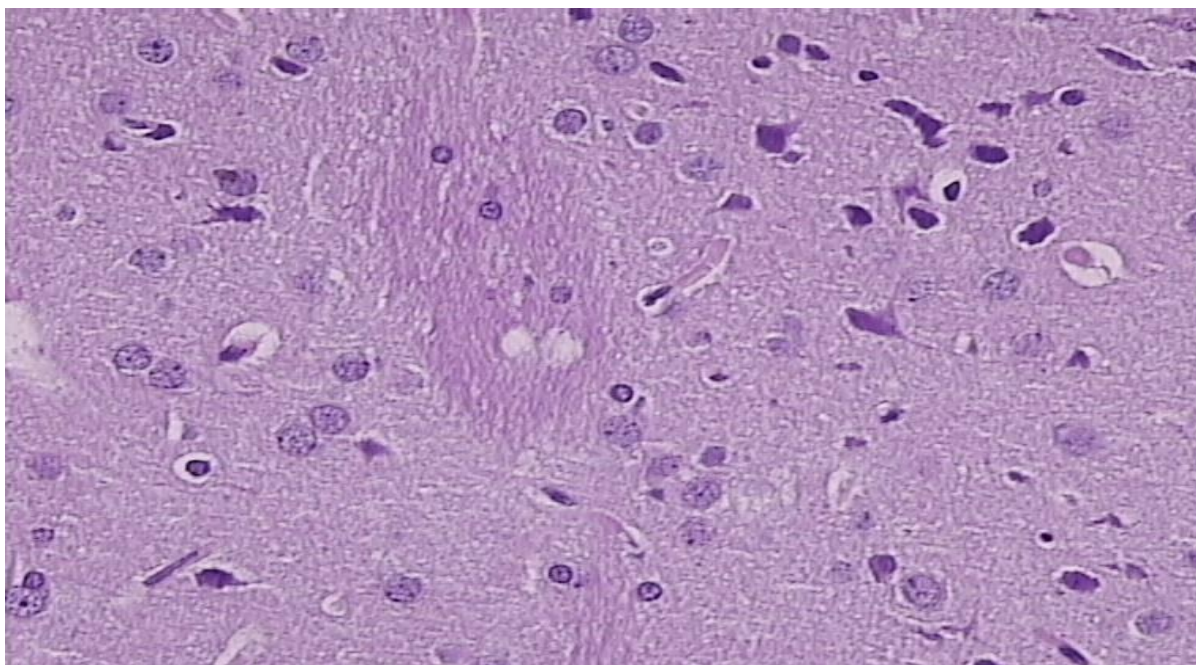


Slika 39. Prikaz aritmetičkih sredina (+) najvećeg i najmanjeg broja zdravih neurona (N) u strijatumu štakorica 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina, a 72 h nakon haloperidola.

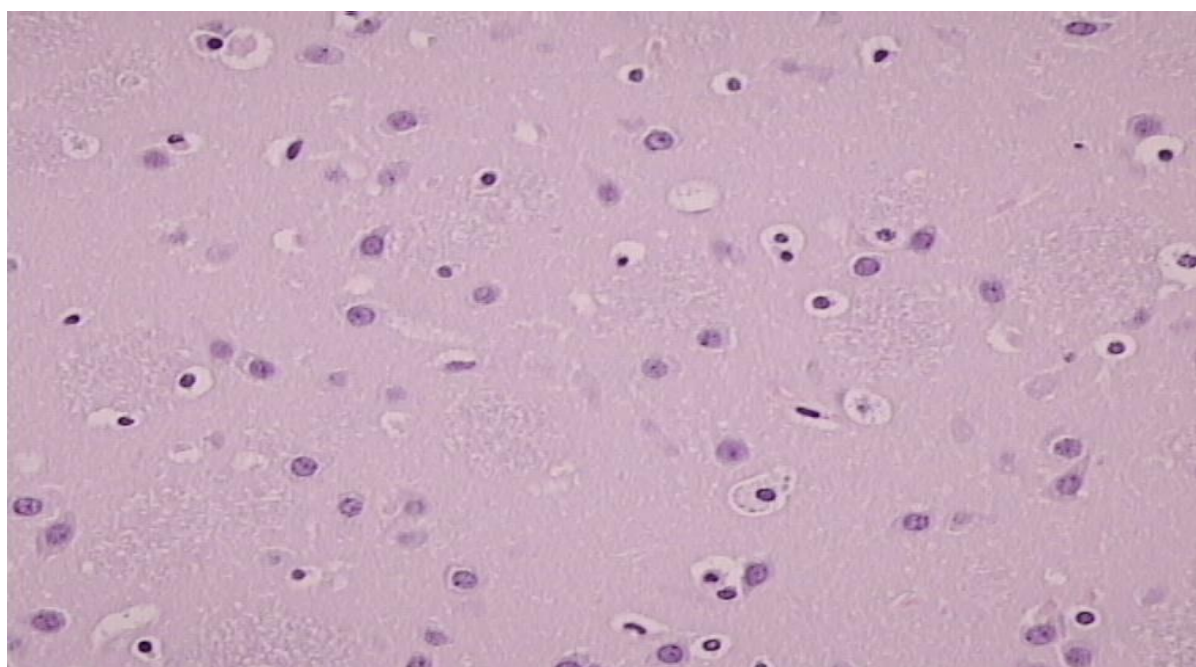


Slika 40. Prikaz aritmetičkih sredina (+) najvećeg i najmanjeg broja neurona nalik oligodendrocitima (oligo-neuroni) i crvenih, hipoksičnih neurona u strijatumu štakorica 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina, a 72 h nakon haloperidola.

Slika 41. prikazuje uzorak strijatuma štakorice koja je 3 dana prije metamfetamina dobila samo fiziološku otopinu i haloperidol. Prisutno je više crvenih neurona. Slika 42. prikazuje strijatum životinje koja je 3 dana prije metamfetamina dobila i BPC 157 i haloperidol, U uzorku nema crvenih neurona, neuroni su urednog izgleda uz nekoliko neurona nalik na oligodendrocite.



Slika 41. Brojni crveni neuroni na presjeku strijatuma štakorice 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina, a 72 h nakon fiziološke otopine i haloperidola (kontrolna skupina) (HE, x40).



Slika 42. Neuroni pretežno zdravog izgleda, sa nekoliko neurona nalik na oligodendrocite na presjeku strijatuma štakorice 24 h nakon administracije 10 mg/kg metamfetamina, a 72 h nakon BPC 157 i haloperidola (tretirana skupina) (HE, x40)

6. Rasprava

Poremećaji ravnoteže monoamina su heterogena i brojna skupina neuroloških poremećaja koji rezultiraju smetnjama pri kretanju, kognitivnim procesima i ponašanju ljudi i životinja. Iako se intenzivno istražuju, za parkinsonizme i Parkinsonovu bolest još uvijek nema odgovarajuće terapije koja bi se mogla primjenjivati dugotrajnije bez štetnih posljedica. Terapija koja se koristi, levodopa, zamjena je za dopamin čija je razina u bazalnim ganglijima smanjena. Iako u ranijim stadijima bolesti terapija levodopom daje dobre rezultate, kasnije se u pacijenata javljaju motoričke smetnje, dok učinak terapije sve više oscilira. Regulacija dopamina i uspostavljanje homeostaze u oštećenom dopaminskom sustavu, a ne samo primjena zamjene za dopamin, mogle bi osigurati učinkovitije liječenje navedenih poremećaja.

S obzirom na rezultate dosadašnjih istraživanja koji upućuju na to da želučani pentadekapeptid BPC 157 regulira dopaminski sustav (SIKIRIĆ i sur., 2011.), smatra se da bi BPC 157 mogao biti indiciran kod raznih poremećaja razine dopamina (ali i serotonina) u središnjem živčanom sustavu, posebno u nigrostrijatalnom dopaminskom putu. Takav neuroprotektivni učinak BPC-a 157 već je potvrđen u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane neurotoksinom MPTP-om (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) koji uništava dopaminergička vlakna u supstanciji nigri (SIKIRIĆ i sur., 1999.b) te u modelima dopaminergičke preosjetljivosti i amfetaminske senzitivizacije (JELOVAC, 1998.; SIKIRIĆ i sur., 2002.). U takvim je modelima potvrđen učinak BPC-a 157 na ponašanje i somatosenzorne reflekse pokusnih životinja. Osim navedenih modela, u istraživanjima poremećaja ravnoteže monoamina se koristi model dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom (GERLACH i RIEDERER, 1996.; KITA i sur., 2003.). U ovom istraživanju htjelo se pobliže ispitati može li BPC 157 spriječiti ili smanjiti oštećenja dopaminskog nigrostrijatalnog puta u mozgu koje uzrokuju metamfetamin i haloperidol, te može li preventivno očuvati funkcije koje nigrostrijatalni sustav regulira. Ovo je prvi put da se u tu svrhu na štakorima koristio model dopaminergičke preosjetljivosti izazvane sa haloperidolom (5 mg/kg) i tri dana nakon toga sa metamfetaminom (10 mg/kg) i da je uspoređen sa jednostavnijim modelom dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane sa tri jednokratne doze metamfetamina; 10, 20 i 40 mg/kg.

6.1. Učinak BPC-a 157 na stereotipije i diskinezije uzrokovane metamfetaminom

Istraživanje je započelo sa analizom promijenjenog ponašanja štakorica u prva dva sata nakon davanja metamfetamina, kako bi se provjerilo može li BPC 157 antagonizirati učinak metamfetamina na ponašanje što bi rezultiralo slabije izraženim stereotipijama kod skupine štakorica koje su prije metamfetamina dobile BPC 157. Stereotipije su ponavljani pokreti bez svrhe a mogu biti uzrokovani dopaminskim agonistima, pogotovo sa derivatima amfetamina, ili raznim psihičkim stanjima, primjerice, dosadom ili tjeskobom. Poznato je da metamfetamin potiče lokomotornu aktivnost kada se primjeni u niskim dozama, a stereotipno ponašanje kada se primjeni u višim dozama (KELLY i sur., 1975.; KUCZENSKI i SEGAL, 1999.).

U prijašnjem istraživanju amfetaminske sentizacije i preosjetljivosti na amfetamin uzrokovane haloperidolom BPC 157 je značajno smanjio intenzitet amfetaminskih stereotipija, hiperaktivnosti i penjanja uzrokovanih amfetaminom ili amfetaminom i haloperidolom u kombinaciji, kao i katalepsiju uzrokovanu haloperidolom kod miševa (JELOVAC i sur., 1998.). U ovom istraživanju prosječan broj stereotipija je bio manji kod skupine štakorica tretiranih sa BPC-om 157 u odnosu na kontrolnu skupinu u svim pokusima u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti i u modelu dopaminergičke preosjetljivosti, no to smanjenje nije bilo statistički značajno. Ipak, u ovom su istraživanju zbog većih doza metamfetamina, a i zbog jačeg djelovanja metamfetamina u odnosu na amfetamin (NIDA, 2006.), obuhvaćeni brojniji oblici ponašanja a i motoričkih smetnji, odnosno diskinezija kao što su okretanje oko vlastite osi i hod unatrag. Zbog toga je korišten drugačiji, opširniji sustav bodovanja nego u navedenom istraživanju, pa se rezultati oba istraživanja ne mogu uspoređivati, no može se utvrditi sličnost u odnosu na ishod pokusa. Ovaj opširniji sustav bodovanja prvi su koristili CURZON i suradnici (1979.) prilikom bodovanja učinka amfetamina (15 mg/kg), p-kloroamfetamina i fenfluramina na ponašanje životinja, a obuhvaća sve oblike ponašanja koji se javljaju i nakon aplikacije visokih doza metamfetamina, uključujući i kretanje životinja i diskinezije. Broj bodova stereotipija u ovom istraživanju nije rastao pravilno s dozom, iz razloga što bi se s porastom doze metamfetamina kod životinja 30 minuta nakon aplikacije smanjila lokomotorna aktivnost, a bilo je izraženije usredotočeno stereotipno ponašanje, primjerice stereotipni pokreti glavom i ustima, što je u skladu s podacima iz literature (KUCZENSKI i SEGAL, 1999.). Zbog toga se u ovim pokusima broj

bodova iz stereotipija ne može smatrati odrazom oštećenosti središnjeg živčanog sustava, već samo jednim načinom kvantificiranja učinka metamfetamina na ponašanje i aktivnost životinja. Štakorice na dozi od 40 mg/kg nisu imale veći broj bodova iz stereotipija od životinja na nižim dozama metamfetamina (10, 20 mg/kg) koje su se više kretale i ponašale raznoliko. Što se tiče pojedinih oblika ponašanja, kod skupine prethodno tretirane sa BPC-om 157 doza metamfetamina je bila u pozitivnoj i umjerenoj korelaciji ($r = 0,5$) sa ponašanjima ovisnima o 5-HT-u, dok je kod kontrolne skupine ta korelacija bila negativna ($r = -0,5$). Iznenađujuće, ponašanja ovisna o dopaminu bila su u negativnoj i visokoj, ali ne statistički značajnoj korelaciji kod obje skupine životinja; $-0,98$ kod kontrolnih i $-0,88$ kod tretiranih skupine životinja. Diskinezije su bile izraženije sa porastom doze, pa je tako korelacija doze i diskinezija bila $0,60$ kod kontrolnih i $0,93$ kod tretiranih (BPC 157) skupina. Skupina prethodno tretirana sa BPC-om 157 nije imala statistički značajno manje izražene pojedinačne oblike ponašanja, iako je iz tablica 7. i 9. vidljiv prosječno manji broj bodova iz diskinezija. Najveći broj bodova iz stereotipija, naročito iz diskinezija, imale su životinje koje su tri dana prije 10 mg/kg metamfetamina dobile haloperidol, što ukazuje na to da se kod tih životinja razvila preosjetljivost na metamfetamin. Životinje koje su prije haloperidola dobile BPC 157 imale su manji broj bodova iz stereotipija, iako ta razlika nije bila statistički značajna ($31,00 \pm 6,63$ u odnosu na $39,2 \pm 8,78$). Iz tablice 10. je vidljiv manji prosječni broj bodova iz ponašanja ovisnih o 5-HT-u, veći prosječni broj bodova iz ponašanja ovisnih o dopaminu i manji prosječan broj bodova iz diskinezija.

6.2. Učinak BPC-a 157 na hipertermiju uzrokovanu metamfetaminom

Metamfetamin potiče pojačano otpuštanje dopamina, noradrenalina i 5-HT-a, a sva tri monoamina imaju ulogu u regulaciji tjelesne temperature u središnjem i perifernom živčanom sustavu (SALMI i sur., 1993.; SALMI i AHLENIUS, 1998.; CANNON i NEDERGAARD, 2004.) pa igraju važnu ulogu u razvoju hipertermije uzrokovane metamfetaminom (BOWYER i sur., 1994.; RUSYNIAC i sur., 2008.). Pojačana lokomotorna aktivnost koja se javlja kao rezultat takvog djelovanja metamfetamina doprinosi povišenje tjelesne temperature

jer se u procesu produkcije ATP-a koji nužan za kontrakcije mišića oslobađa toplina (KRUSTUP i sur., 2003.).

Očekivano, metamfetamin je uzrokovao hipertermiju kod svih skupina životinja u pokusima (FUKUMURA i sur., 1998.). Najviša tjelesna temperatura štakorica (aritmetička sredina) na dozi od 10 mg/kg metamfetamina bila je 39,7°C i izmjerena je nakon sat vremena kod kontrolne skupine životinja. To je više nego u istraživanju (FUKUMURA i sur., 1998.) u kojem je najviša izmjerena tjelesna temperatura na istoj dozi bila 39,0°C, ali ona je postignuta u istom vremenskom periodu, u sat vremena. Isto tako, sat vremena nakon aplikacije 20 mg/kg metamfetamina kod obje je skupine životinja izmjerena najviša tjelesna temperatura, 40,7 °C, gotovo jednako kao kod FUKUMURE i suradnika (1998.) gdje je izmjerena 40,6 °C. No, nakon davanja 40 mg/kg nije postignut očekivani porast temperature kao u navedenom istraživanju gdje je najviša tjelesna temperatura bila 42,0 °C. U ovom istraživanju je bilo pojedinačnih slučajeva kod kojih je izmjerena ovako visoka temperatura, ali je najviša prosječna temperatura bila 40,9 °C. Dakle, porast temperature bio je ovisan o dozi, ali ne kao u navedenom istraživanju (FUKUMURA i sur., 1998.).

BPC 157 nije smanjio hipertermiju uzrokovanu sa metamfetaminom ni u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti, niti u modelu dopaminergičke preosjetljivosti. To ne umanjuje potencijalno neuroprotektivno djelovanje, jer smanjenje hipertermije nije preduvjet neuroprotektivnog djelovanja (KRASNOVA I CADET, 2009.). Naprotiv, niti neke druge farmakološke (inhibitori nNOS, inhibitori ponovnog unosa dopamina) i genetske manipulacije (interleukin-6 *knock-out* miševi) koje mogu zaustaviti neke od mehanizama neurotoksičnosti nemaju utjecaja na hipertermiju (ITZHAK i sur., 2000.; LADENHEIM i sur., 2000.; SANCHEZ i sur., 2003.). Dakle, smatra se da promjena u tjelesnoj temperaturi nije izravni pokazatelj toksičnosti metamfetamina, iako sama hipertermija može dovesti do trajnih oštećenja središnjeg živčanog sustava i do smrti.

6.3. Učinak BPC-a 157 na smanjenu lokomotornu aktivnost 24 h nakon aplikacije metamfetamina

Lokomotorna aktivnost analizirana je kroz tri parametra; horizontalnu lokomotornu aktivnost koja se odnosi na broj prijeđenih pravokutnika u kavezu za mjerenje lokomotorne aktivnosti, vertikalnu lokomotornu aktivnost ili broj podizanja na stražnje noge (obje prednje noge su u zraku) i vrijeme čišćenja koje se zapravo više ubraja u stereotipna ponašanja, no s obzirom da je mjereno istovremeno kada se analizirala lokomotorna aktivnost, navedeno je u rezultatima na istom mjestu.

Budući da se skupinama životinja koje se usmrćuju 24 h nakon davanja metamfetamina uskraćuje hrana kako bi radije jele pelete prilikom procjene fine motorike, prije pokusa sa metamfetaminom provjereno je da li to jednodnevno gladovanje utječe na lokomotornu aktivnost kod štakorica netretiranih sa metamfetaminom. Gladovanje je značajno smanjilo horizontalnu (sa $177,66 \pm 58,62$ na $50,5 \pm 27,88$) i vertikalnu aktivnost (sa $70 \pm 19,07$ na $22 \pm 11,57$) kod netretiranih štakorica, dok na vrijeme čišćenja nije značajno utjecalo. Provjereno je da li BPC 157 utječe na normalnu lokomotornu aktivnost i vrijeme čišćenja štakorica kojima je na 24 h uskraćena hrana. BPC 157 je povećao lokomotornu aktivnost i vrijeme čišćenja kod štakorica, ali razlike među skupinama nisu bile statistički značajne. To odgovara rezultatima istraživanja koji su pokazali da BPC 157 ne mijenja normalno ponašanje zdravih životinja (JELOVAC i sur., 1998.).

Kod skupina tretiranih metamfetaminom lokomotorna aktivnost je bila manja od aktivnosti netretiranih štakorica kojima je samo uskraćena hrana (slika 9.-11.), pa se može zaključiti da je metamfetamin, uz gladovanje, dodatno smanjio lokomotornu aktivnost. Do smanjene aktivnosti životinja moglo je doći i zbog iscrpljenosti nakon višesatnog kretanja odmah nakon aplikacije metamfetamina. Međutim, najmanju lokomotornu aktivnost u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti imale su životinje koje su 24 h prije dobile najveću dozu metamfetamina (40 mg/kg), a tada se nisu više kretale ili imale izraženije stereotipije (tablica 9.) od životinja na manjim dozama, pa se može zaključiti da je deplecija dopamina bila uzrok smanjene lokomotorne aktivnosti i vremena čišćenja 24 h nakon aplikacije metamfetamina.

Lokomotorna aktivnost i stereotipno ponašanje posredovani su dopaminergičkom neurotransmisijom, a 24 h nakon aplikacije neurotoksičnih doza metamfetamina, zbog

deplecije dopamina dolazi i do smanjenja lokomotorne aktivnosti (WALLACE i sur., 1999.). WALLACE i sur. (1999.) dokazali su da je kod štakora tretiranih neurotoksičnom dozom metamfetamina značajno smanjena samo diurnalna lokomotorna aktivnost i da je promatranje i bodovanje aktivnosti štakora tijekom dana točniji pokazatelj funkcionalnih posljedica deplecije dopamina, a to je primjenjeno i u ovom istraživanju. Mjerenje dulje od 30 minuta nije bilo potrebno jer su štakorice bile aktivne u prosjeku samo u prvih nekoliko minuta. Smanjena lokomotorna aktivnost, odnosno bradikinezija i akinezija koje se javljaju kod Parkinsonove bolesti također su posljedice deplecije dopamina u nigrostrijatumu (MARDSEN, 1990.; GERLACH I RIEDERER, 1996.). Tvar koja bi štitila nigrostrijatam od toksičnog djelovanja metamfetamina u modelima parkinsonizama trebala bi osigurati očuvanje funkcija koje regulira nigrostrijatalni dopaminski put, odnosno smanjiti depleciju dopamina u tom dijelu mozga i održati lokomotornu aktivnost na normalnoj razini. Uz lokomotornu aktivnost, 24 h nakon primjene metamfetamina bi trebalo doći i do smanjenja repetitivnog čišćenja krzna koje je najvećim dijelom rezultat pojačane stimulacije D1 receptora za dopamin. Izostanak čišćenja podrazumjeva blokadu ili izostanak aktivacije tih receptora zbog već spomenute deplecije dopamina (TAYLOR i sur., 2010.). Čišćenje krzna upotrebljava se kao parametar za procjenu učinka lijekova na Tourettov sindrom, a dokazano je da haloperidol koji se upotrebljava u terapiji ovog sindroma i djeluje kao antagonist D2 receptora, sprječava stimulaciju D1 receptora sa specifičnim agonistom, SKF38393 (TAYLOR i sur., 2010.).

U ovom se istraživanju vrijeme čišćenja pokazalo kao parametar koji najpravilnije i obrnuto proporcionalno slijedi porast doze metamfetamina, uz negativnu korelaciju doze sa vremenom čišćenja kod kontrolne skupine -0,88, a kod tretirane -0,89. Dakle, taj je parametar najvjernije odražavao depleciju dopamina do kojih su dovele neurotoksične doze metamfetamina. Zanimljivo, najdulje vrijeme čišćenja izmjereno je kod štakorica koje prije 10 mg/kg metamfetamina primile BPC 157. U tom modelu izmjerena je statistički značajna razlika u sva tri parametra između kontrolne i BPC 157 skupine. Svi parametri su bili veći kod BPC 157 skupine, pa se može zaključiti da je BPC 157 spriječio depleciju dopamina koju je kod kontrolne skupine izazvao metamfetamin u dozi od 10 mg/kg. Vrijednosti aktivnosti u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane sa 20 i 40 mg/kg metamfetamina su više varirale unutar skupina pa razlike među skupinama nisu bile statistički značajne, iako su životinje predtretirane BPC-om 157 bile u prosjeku aktivnije od kontrole. Kako je navedeno prije, vrijeme čišćenja je kod životinja tretiranih sa BPC-om 157 pravilno je opadalo sa

dozom metamfetamina, pa se može zaključiti da je BPC 157 primjenjen uvijek u istoj dozi od 10 µg/kg bio manje učinkovit u spriječavanju deplecije dopamina nakon većih doza metamfetamina.

U modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom odmah nakon davanja haloperidola dolazi do blokade dopaminskog sustava i katalepsije, a 24 h nakon toga spontana lokomotorna aktivost životinja je značajno smanjena. Iz slika 12.-14. se ne vidi da se od šest štakorica koje su uz haloperidol primile BPC 157 kretalo i čistilo čak njih 5, a od štakorica iz kontrolne skupine samo dvije od šest. Drugi dan pokusa (48 h nakon davanja haloperidola) aktivnost životinja se povećala ali je i dalje bila značajno manja od aktivnosti netretiranih štakorica koje nisu gladovale (slike 12. i 13.). Ipak, obje skupine životinja koje su primile haloperidol su se čistile dulje od netretiranih štakorica (slika 14.). Ovo ukazuje na to da je već 48 h nakon blokade dopaminskih receptora sa haloperidolom došlo do njihove ponovne aktivacije, pojačanog stvaranja ili povećane osjetljivosti tih receptora na dopamin. Taj je porast aktivnosti dopaminskih receptora bio nešto blaži kod štakorica koje su uz haloperidol primile BPC 157. Nakon davanja metamfetamina dvije su životinje iz kontrolne skupine (fiziološka otopina i haloperidol) uginule, a 24 h poslije lokomotorna aktivnost životinja iz kontrolne skupine nije bila manja od onih u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane sa 10 mg/kg metamfetamina, što znači da izazivanje preosjetljivosti nije dovelo do veće deplecije dopamina 24 h nakon aplikacije metamfetamina. Kod skupine životinja koje je prije haloperidola primila BPC 157 situacija je bila drugačija; lokomotorna aktivnost je bila manja u odnosu na one u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti koje su prije 10 mg/kg metamfetamina primile BPC 157, s time da je vrijeme čišćenja, koje nam je poslužilo kao pouzdaniji pokazatelj razine dopamina ili aktivacije određenih dopaminskih receptora, bilo jednako vremenu čišćenja kod zdravih, netretiranih štakorica (117 ± 94 s). Može se zaključiti da je haloperidol izmjenio način na koji BPC 157 modulira dopaminski sustav ali nije spriječio održavanje razine aktivnosti dopaminskog sustava niti nakon davanja neurotoksične doze metamfetamina.

6.4. Učinak BPC-a 157 na ataksiju uzrokovanu metamfetaminom

Test koji se u ovom istraživanju koristio za procjenu ataktičnog fenotipa (GUYENET i sur., 2010.) uključuje procjenu četiri parametara koja mogu ukazati na oštećenja koja se javljaju kod cerebelarne ataksije ili neurodegenerativnih poremećaja. Primarno je namijenjen za procjenu mišjih modela neurodegenerativnih bolesti; cerebelarnih ataksija, Huntingtonove bolesti i spinobulbarne mišićne atrofije (GUYENET i sur., 2010.). Navedene bolesti uključuju oštećenje strijatuma, no i SN, kore velikog mozga, hipokampusu, hipotalamusu, talamusu, pa i malog mozga (WALKER, 2007.). Budući da su prethodna istraživanja (JENG i WANG, 1998.; FERUCCI i sur.; 2006.) dokazala da metamfetamin utječe i na neurotransmisiju u malom mozgu, očekivano je da metamfetamin uz funkcije posredovane strijatumom, može utjecati i na funkcije posredovane malim mozgom, kao što su održavanje ravnoteže, mišićna koordinacija i kontrola pokreta. Poznato je da su ove funkcije poremećene i kod pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti (MARDSEN, 1990.). To se potvrdilo i u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom u kojem je korelacija doze metamfetamina i učinka na ataktični fenotip bila 0,863 kod kontrolne skupine, dok je kod skupine tretirane BPC-om 157 prije metamfetamina ta korelacija bila manja, 0,614. Kod potonje skupine ataktički fenotip bio je manje izražen, iako ne statistički značajno. U modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom, pa metamfetaminom, ataksija je bila manje izražena kod skupine prethodno tretirane BPC-om 157, no ta razlika opet nije bila statistički značajna.

6.5. Učinak BPC-a 157 na poremećaj funkcije prednjih ekstremiteta uzrokovan metamfetaminom

Zbog sličnosti brahijalnog spleta živaca kod štakora i ljudi, procjena fine motorike prednjih ekstremiteta važan je dio štakorskih modela neurodegenerativnih bolesti koje su karakterizirane poremećajima motorike (BERTELLI I MIRA, 1993.). METZ i WISHAW

(2002.) su već opisali značajna oštećenja fine motorike u vidu nemogućnosti pružanja prednjih ekstremiteta i normalne manipulacije hranom u štakorskom modelu Parkinsonove bolesti. Do ovih oštećenja može doći zbog oštećenja piramidnog trakta i crvene jezgre (WISHAW i sur., 1998.), senzomotorne kore velikog mozga, nigrostrijatuma i CPU (WISHAW i sur., 1986.). U ovom istraživanju korištena je modificirana IBB skala (IRVINE i sur., 2010.) prilagođena pokusu koji uključuje središnja, a ne periferna oštećenja živčanog sustava i poremećaje fine motorike. Prema ovoj skali, veći broj bodova podrazumjeva i teže izvođenje pojedinog parametra, dakle, veći poremećaj fine motorike (IRVINE i sur., 2010.). U modelu dopaminergičke neurotoksičnosti štakorice koje su dobile BPC 157 prije neurotoksične doze metamfetamina (10, 20 i 40 mg/kg) su imale značajno manje znakova, pa i bodova iz poremećene funkcije prednjih ekstremiteta prilikom hranjenja od štakorica koje su prije neurotoksične doze metamfetamina dobile samo fiziološku otopinu (slika 17.). Iz tablice 11 vidljivo je da su štakorice tretirane sa BPC-om 157 lakše prilagođavala prste obliku peleta, držale su pelete mirnije i iznad dna staklenog cilindra prilikom hranjenja, te su češće su koristile površinu dlanova tijekom držanja pelete. Štakorice u kontrolnoj skupini su češće pretjerano namještale pelete u dlanovima, što izgleda kao tremor prilikom hranjenja, a i umjesto dlanova češće su za potporu prilikom hranjenja koristile dno cilindra. Slično je bilo i u modelu dopaminergičke preosjetljivosti u kojem je za većinu parametara funkcije prednjih ekstremiteta manje bodova imala skupina koja je uz haloperidol dobila BPC 157, no te razlike nisu bile statistički značajne.

6.6. Učinak BPC-a 157, haloperidola i metamfetamina na lipidnu peroksidaciju u mozgu

Dosadašnja istraživanja dokazala su povišene razine MDA u mozgovima metamfetaminskih ovisnika i laboratorijskih životinja pokusno tretiranih metamfetaminom (ACIKGOZ i sur., 1998.; YAMAMOTO i ZHU, 1998.; KITA i sur., 2000.), te da metamfetamin povisuje razinu MDA u strijatumu, kori velikog mozga i hipokampusu (HORNER i sur., 2011.). Razine MDA u mozgu i serumu povezuju se i sa patogeneom Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (DIB i sur., 2002.). Zbog pristupačnosti, jednostavnosti

dokazivanja i zbog toga što je u dosadašnjim istraživanjima predstavljao važan pokazatelj neurotoksičnog djelovanja metamfetamina ali i neurodegenerativnih bolesti, MDA se analizirao i u ovom istraživanju. Ovo je ujedno i prvo istraživanje učinka BPC-a 157 na lipidnu peroksidaciju. Budući da BPC 157 modulira NO sustav (GRABAREVIĆ i sur., 1997.; SIKIRIĆ i sur., 1997.b), očekivano je da će utjecati na razvoj oksidacijskog stresa u stanici, pa i lipidnu peroksidaciju. Važno je uzeti u obzir da se razine MDA, kao i razine drugih produkata oksidacijskog stresa, moraju razmatrati u kontekstu dvosjeklog mača, razine niže od fizioloških su povezane sa smanjnjom otpornošću i preživljavanjem organizma (YANG i HEKIMI, 2010.), dok više koncentracije dovode do (ili su rezultat) oštećenja proteina, nukleinskih kiselina i lipidnih struktura stanice (CAI i sur., 2009.).

U ovom istraživanju je razina MDA strijatumu padala proporcionalno s dozom, pa je tako najniža kod životinja dva sata nakon aplikacije metamfetamina u dozi od 40 mg/kg. U dosadašnjim istraživanjima djelovanja metamfetamina na lipidnu peroksidaciju u mozgu razina MDA mjerena je nakon 24 h ili kasnije (ACIKGOZ i sur., 1998.; YAMAMOTO i ZHU, 1998.; KITA i sur., 2000.; HORNER i sur., 2011.), no još nisu objavljeni podaci o tome kako metamfetamin djeluje na lipidnu peroksidaciju u mozgu na vrhuncu učinka na ponašanje, odnosno u prvih par sati nakon jednokratne aplikacije.

U prva dva sata metamfetamin značajno snižava razinu MDA u strijatumu ali i drugim dijelovima mozga, dok ona raste iznad fiziološke razine tek nakon 24 h. Tada se kod skupine štakorice tretirane sa BPC-om 157 javlja statistički značajan porast koncentracije MDA u strijatumu sa dozom metamfetamina ($r=0,998$). Ovo je donekle u skladu sa istraživanjem učinka četiri injekcije metamfetamina (10 mg/kg, svaka 2 h) na lipidnu peroksidaciju u pojedinim dijelovima mozga, u kojem je razina MDA u hipokampusu i strijatumu 24 h nakon posljednje injekcije bila statistički značajno veća od one izmjerene tek 4 h nakon posljednje injekcije (GLUCK i sur., 2001.).

BPC 157 je sniženu razinu MDA u strijatumu 2 h nakon davanja najmanje (10 mg/kg) i najveće doze (40 mg/kg) metamfetamina povisio, ali je ona i dalje bila niža od fiziološke razine (slika 19.). Razina MDA u strijatumu digla se do fiziološke razine tek 24 h nakon 20 mg/kg metamfetamina kod kontrolne skupine, dok je kod skupine koja je primila BPC 157 prije iste doze ta razina bila još uvijek malo niža (slika 20.). Kod obje je skupine životinja 24 h nakon davanja 40 mg/kg metamfetamina u strijatumu izmjerena razina MDA viša od fiziološke. Sličan je trend uočen u hipokampusima (slike 21. i 22.) i frontalnoj kori štakorica

(slike 25. i 26.); 2 h nakon davanja metamfetamina MDA je bio niži od fiziološkog, a 24 h nakon sve tri doze metamfetamina razine MDA bile su malo više. Kod tretirane (BPC 157) skupine životinja razina MDA u hipokampusu nije značajno rasla 24 h nakon aplikacije 10 i 20 mg/kg metamfetamina, dok je nakon 40 mg/kg razina MDA u hipokampusu tretiranih štakorica bila značajno viša od one kod kontrolne skupine. Razine MDA u diencefalonu bile su niže od fizioloških kod svih životinja 2 i 24 h nakon sve tri doze metamfetamina (slike 23. i 24.). Ipak, u prva dva sata korelacija između doze metamfetamina i koncentracije MDA kod tretirane je skupine bila statistički značajna, dakle, rasla je sa dozom ($r=0,998$), iako nije dostigla fiziološku razinu. U kori velikog mozga razine MDA nisu se značajno mijenjale s vremenom, ali jesu sa dozom metamfetamina u prva dva sata; kod kontrolne skupine je korelacija između doze metamfetamina i koncentracije MDA bila 0,984, a kod tretirane skupine je bila 1,0 i statistički značajna. No, iako su rasle sa dozom, razine MDA bile su vrlo slične fiziološkim vrijednostima (slike 27. i 28.). U malom mozgu su razine MDA bile uglavnom niže od fizioloških, a malo su porasle 24 h nakon 40 mg/kg metamfetamina kod skupine koja je prethodno dobila BPC 157 (slike 29. i 30.). Kod te skupine je tada korelacija između doze i učinka bila statistički značajna, 0,999.

Uloga MDA u mozgu je višestruka; ta molekula sudjeluje u prijenosu signala i u regulaciji unutarstaničnog Ca^{2+} i oštećenju živčanih stanica (CAI i sur., 2009.). Na ravnotežu Ca^{2+} u stanici djeluje i metamfetamin (KRASNOVA i CADET, 2009.) tako što, između ostalog, uzrokuje smrt stanica pojačavajući aktivaciju kalpaina u neuronima (SAMANTARAY i sur., 2006.). Moguće je da visoke doze metamfetamina potiču taj prijenos signala u kojem sudjeluje MDA, trošeći samu molekulu i remeteći regulaciju unutarstaničnog Ca^{2+} , te kasnije dovodeći do oštećenja stanica, dok BPC 157 na neki način smanjuje to trošenje. Ipak, BPC 157 nije spriječio porast MDA nakon prva dva sata, dapače, u hipokampusu tretiranih štakorica 24 h nakon 40 mg/kg metamfetamina izmjerena je značajno veća razina MDA nego kod kontrole.

U modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom obje skupine životinja imale su statistički značajno veću razinu od fiziološke hipokampusu 24 h nakon davanja metamfetamina, a jedino im je u malom mozgu izmjerena niža razina MDA od fiziološke. Štakorice prethodno tretirane BPC-om 157 imale su manje razine MDA u strijatumu, hipokampusu i diencefalonu u odnosu na kontrolnu skupinu, a veću i sličniju fiziološkoj razinu MDA u malom mozgu (slika 31.), iako ove razlike nisu bile statistički značajne.

U ovom istraživanju izmjerene razine MDA nisu značajno korelirale sa poremećajima motorike i ravnoteže. Suprotno očekivanom, izraženost ataktičnog fenotipa (broj bodova) nije bila u viskoj korelaciji sa lipidnom peroksidacijom u malom mozgu (kod kontrolne skupine je iznosila 0,519, a kod tretirane 0,609). U većoj je korelaciji sa razinom MDA u malom mozgu bilo oštećenje funkcije prednjih ekstremiteta (iznad 0,9 kod obje skupine životinja) što upućuje na ulogu malog mozga u regulaciji fine motorike. Kod kontrolne skupine javila se veća korelacija izraženosti ataktičnog fenotipa sa lipidnom peroksidacijom u strijatumu (0,883), diencefalonu (0,978) i kori velikog mozga (0,739), a kod skupine prethodno tretirane sa BPC-om 157 samo sa lipidnom peroksidacijom u kori velikog mozga (0,904). Kod tretirane (BPC 157) skupine korelacija razine MDA u strijatumu sa poremećenom funkcijom prednjih ekstremiteta bila je 0,904.

6.7. Učinak BPC-a 157, haloperidola i metamfetamina na broj zdravih i promijenjenih neuorna u strijatumu

Kako je osnovno patomorfološko obilježje Parkinsonove bolesti gubitak nigrostrijatalnih dopaminergičkih neurona, smanjen broj zdravih i pojava oštećenih neurona u nigrostrijatumu bio je očekivan nalaz i u ovom istraživanju. Naravno, u ovim modelima nije se mogao očekivati nalaz Lewyevih tjelešaca, eozinofilnih citoplazmatskih inkluzija u neuronima SN karakterističnih za Parkinsonovu bolest zbog drugačije etiologije oštećenja. Što se etiologije tiče, patomorfološke promjene neurona u strijatumu opisane su i kod neurotoksičnog djelovanja metamfetamina (KITA i sur., 2003.; WANG i sur., 2012.).

LARSEN i sur. (2002.) su zaključili da metamfetamin ne uzokuje direktnu apoptozu neurona, već posredno, putem oštećenja neurita dovodi do neurodegeneracije. U ovom istraživanju, u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane sa 10 mg/kg metamfetamina potvrđena je promjena u izgledu neurona, a ne gubitak ukupnog broja neurona, no zanimljivo je da ta promjena nije bila ovisna od dozi, jer kod štakorica kojima je dana četiri puta veća doza metamfetamina broj patološki promjenjenih neurona bio je manji, baš kao i broj zdravih neurona. Dakle, došlo je do gubitka ukupnog broja neurona, i on je bio prisutan i statistički značajan kod obje skupine; kod kontrolne skupine je pao sa $69,08 \pm 8,37$

na $56,93 \pm 3,32$, a kod tretirane skupine sa $80,38 \pm 9,31$ na $58,80 \pm 1,75$. To potvrđuju i druga istraživanja neurotoksičnog djelovanja metamfetamina (KITA i sur., 2003.).

Kod svih kontrolnih skupina je izbrojan manji broj neurona zdravog izgleda nego kod skupina tretiranih sa BPC-om 157, dok je broj neurona nezdravog izgleda, crvenih neurona i neurona nalik oligodendrocitima bio veći. Crvene neurone karakteriziraju piknotična jezgra i intenzivna eozinofilna citoplazma, a iako su uobičajeni u mozgu u stanju ishemije i anoksije prilikom moždanog udara, svaki proces koji dovodi do smrti neurona rezultirati će pojavom crvenih neurona (hipoksija, epilepsija, trovanje ugljičnim monoksidom) (PATIL I PERRY, 2008.), pa tako nisu neuobičajen nalaz niti u modelima dopaminergičke neurotoksičnosti i preosjetljivosti. Slične su promjene već opisane; nekrotične stanice sa skupljenom citoplazmom, kromatolizom (oštećena Nisslova tjelešca), kariolizom i karioreksom na HE rezovima produžene moždine štakora koji su intravenski primili 48 mg/kg metamfetamina (LI i sur., 2012.). Broj crvenih neurona bio je najveći kod kontrolne skupine u modelu dopaminergičke preosjetljivosti (slika 41.), što potvrđuje pretpostavku da će se, ukoliko se tri dana prije neurotoksične doze metamfetamina štakoricama da haloperidol, razviti preosjetljivost na dopamin i time veća oštećenja strijatuma nakon davanja samog metamfetamina. Crveni neuroni nisu pronađeni na presjecima strijatuma štakorica kojima je prije haloperidola dan BPC 157, pa se može zaključiti da je BPC 157 spriječio odumiranje neurona u modelu dopaminergičke preosjetljivosti. Daljnjim istraživanjima trebalo bi se provjeriti koliko sam haloperidol uzrokuje promjene u izgledu neurona u strijatumu.

Neuroni nalik oligodendrocitima opisani su kod raznih tumora; ependimoma (KAWANO i sur., 1983.), disembrioplastičnih neuroepitelnih tumora (PATIL I PERRY, 2008.), glijalnih tumora koji se povezuju sa epilepsijom (nađeni su u eplipetičnim žarištima) (MORENO i sur., 2001.), ali ne kod parkinsonizama ili u metamfetaminskim modelima neurotoksičnosti. Riječ je o malim, okruglim stanicama sa tamnom, kompaktnom jezgrom i perinuklearnim halom umjesto citoplazme (slika 42.). Moguće je da su to oštećeni oligodendrociti, koji su već opisani u modelim dopaminergične neurotoksičnosti uzrokovane sa MPTP-om (TAKAGI i sur., 2007.), što se može provjeriti imunohistokemijski. Ovih je neurona bilo više kod kontrolnih skupina štakorica koje su primile fiziološku otopinu i 10 mg/kg metamfetamina nego kod štakorica koje su umjesto fiziološke otopine dobile BPC 157, no ta razlika nije bila statistički značajna; $21,33 \pm 7,03$ u odnosu na $18,23 \pm 10,87$.

Nije bilo statistički značajnih korelacija broja zdravih i promijenjenih neurona sa poremećenom funkcijom prednjih ekstremiteta i ataktičnim fenotipom, čak i kada su pojedinačni rezultati uspoređivani zajedno za sve skupine životinja.

Mozgovi štakorica su se koristili ili u kromatografskoj analizi koncentracije MDA ili u patohistološkoj analizi broja neurona, pa se povezanost broja neurona sa koncentracijama MDA u strijatumu nije se mogla provjeriti uspoređujući pojedinačne vrijednosti, već aritmetičke sredine i standardne devijacije za svaku skupinu životinja. Nije bilo značajne korelacije broja neurona sa koncentracijama MDA u strijatumu s obzirom na dozu metamfetamina. Ipak, iznenađuje visoka negativna korelacija broja neurona promijenjenog izgleda sa razinom MDA koja je kod obje skupine životinja bila veća od -0,9.

Na manjem broju mozgova životinja u modelu dopaminergičke preosjetljivosti i dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane sa 10 mg/kg metamfetamina uspješno je napravljen rez kroz ventralno tegmentalno područje i supstanciju nigru. U oba područja mozga i oba modela kod štakorica koje su prije metamfetamina dobile BPC 157 izbrojan je veći broj zdravih neurona, a manji broj patološki promijenjenih neurona (slike 35.-39.). Međutim, riječ je o jako malom broju uzoraka pa je za sada riječ o ilustrativnim rezultatima koji mogu poslužiti kao smjernica za daljnja detaljnija istraživanja ovih područja.

6.8. Smjernice za daljnja istraživanja neuroprotektivnog učinka BPC-a 157 u modelima dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom

Osim što potiče cijeljenje ozljeda različitih tkiva bez formacije ožiljaka (ŠEBEČIĆ i sur., 1999.; STAREŠINIĆ i sur., 2003.; KRIVIĆ i sur., 2006.; NOVINŠČAK i sur., 2008.; GJURAŠIN i sur., 2010.; PEVEC i sur., 2010.), cijeljenje lezija sluznice probavnog trakta u različitim pokusnim modelima (SIKIRIĆ i sur., 1994.; SIKIRIĆ i sur., 1996.a, b), BPC 157 djeluje i neuroprotektivno, što je dokazano u brojnim modelima mehaničkih i neurotoksičnih oštećenja živčanog sustava (SIKIRIĆ i sur., 1996.a; JELOVAC i sur., 1998.; JELOVAC i sur., 1999.; SIKIRIĆ i sur., 1999.b; ILIĆ i sur., 2010., GJURAŠIN i sur., 2010.; TUDOR i sur., 2010.; ILIĆ i sur., 2011.a, b).

U ovom istraživanju dokazan je potencijal BPC 157 u neuroprotekciji strijatuma u modelima dopaminergičke neurotoksičnosti uzrokovane metamfetaminom i potencirane haloperidolom. Međutim, to se još mora potvrditi daljnjim istraživanjima na većem broju životinja i sa više doza BPC-a 157 (10 ng/kg, 10 pg/kg) te provjerom terapijskog potencijala ovog peptida nakon izazivanja oštećenja strijatuma, dakle, davanjem BPC-a 157 nakon neurotoksične doze metamfetamina.

Iako su podaci o kretanjima razina dopamina, 5-HT-a i noradrenalina nakon aplikacije neurotoksičnih doza metamfetamina već poznati (KRASNOVA i CADET, 2009.), bilo bi zanimljivo vidjeti kako BPC 157 utječe na promjene razina neurotransmitera koje izaziva metamfetamin ali i kod zdravih životinja. Do sada je samo istražen utjecaj BPC-a 157 na razine serotonina u mozgu (TOHYAMA i sur., 2004.), a podataka o utjecaju na sintezu drugih neurotransmitera nema.

Detaljnije patohistološke i imunohistokemijske analize VMAT2 i DAT receptora i kretanja razine unutarstaničnog Ca^{2+} dale bi uvid u mehanizme metamfetaminske neurotoksičnosti i njeno potenciranje haloperidolom, a možda i u neke mehanizme neuroprotektivnog djelovanja BPC-a 157. Uz takve detaljnije analize trebala bi se provjeriti povezanost oštećenja ostalih dijelova mozga (hipokampus, kora, malog mozga) sa poremećajima motorike i držanja te može li BPC 157 spriječiti oštećenje i gubitak neurona u navedenim dijelovima središnjeg živčanog sustava.

7. Zaključci

1. Prosječan broj bodova iz stereotipija je bio manji kod skupine štakorica tretiranih sa BPC-om 157 u odnosu na kontrolnu skupinu u svim pokusima u modelu dopaminergičke neurotoksičnosti i u modelu dopaminergičke preosjetljivosti, no to smanjenje nije bilo statistički značajno.
2. Najveći broj bodova iz stereotipija (naročito iz diskinezija) i najizraženiji ataktični fenotip imale su životinje koje su tri dana prije 10 mg/kg metamfetamina dobile haloperidol, što ukazuje na to da se kod tih životinja razvila preosjetljivost na metamfetamin.
3. Metamfetamin je uzrokovao hipertermiju kod svih skupina životinja u pokusima, a BPC 157 ju nije smanjio ni spriječio. To ne umanjuje potencijalno neuroprotektivno djelovanje, jer smanjenje hipertermije nije preduvjet neuroprotektivnog djelovanja.
4. Štakorice koje su prije 10 mg/kg metamfetamina dobile BPC 157 bile su značajno aktivnije od kontrolnih štakorica 24 h nakon aplikacije metamfetamina, što znači da je BPC 157 kod ovi životinja umanjio depleciju dopamina. Vrijednosti lokomotorne aktivnosti 24 h nakon 20 i 40 mg/kg metamfetamina su više varirale unutar skupina pa razlike među skupinama nisu bile statistički značajne, iako su životinje predtretirane BPC-om 157 bile u prosjeku aktivnije od kontrole.
5. 24 h nakon davanja haloperidola u BPC 157 skupini su sve štakorice bile aktivne dok su u kontrolnoj skupini bile aktivne samo dvije. 24 h nakon davanja metamfetamina, sve BPC 157 štakorice su preživjele, dok su 2 kontrolne životinje uginule.
6. Štakorice koje su prije metamfetamina dobile BPC 157, imale su manje izražen ataktični fenotip i statistički značajno manje poremećenu funkciju prednjih ekstremiteta od štakorica koje su prije metamfetamina dobile samo fiziološku otopinu i/ili haloperidol.
7. Dva sata nakon aplikacije metamfetamina razina MDA u strijatumu ali i drugim dijelovima mozga bila je značajno niža od fiziološke, a nakon 24 h se malo povisila. Kod štakorica tretiranih BPC-om 157 razina MDA u strijatumu bila je bliža fiziološkoj

2 h nakon aplikacije metamfetamina. U istom je slučaju u hipokampusu tretiranih štakorica izmjerena statistički značajno veća razina MDA nego kod kontrole.

8. U modelu dopaminergičke preosjetljivosti uzrokovane haloperidolom i metamfetaminom štakorice prethodno tretirane BPC-om 157 imale su manje razine MDA u strijatumu, hipokampusu i diencefalonu u odnosu na kontrolnu skupinu, a veću i sličniju fiziološkoj razinu MDA u malom mozgu.
9. Štakorice koje su prije metamfetamina ili haloperidola primile BPC-157 imale su veći broj zdravih, a manji broj patološki promijenjenih neurona u strijatumu, SNc i VTA u odnosu na štakorice kontrolnih skupina.
10. Izmjerene razine MDA u dijelovima mozgova nisu značajno korelirale sa poremećajem funkcije prednjih ekstremiteta i izraženosti ataktičnog fenotipa, a nije bilo ni statistički značajnih korelacija broja zdravih i promijenjenih neurona sa lipidnom peroksidacijom, poremećenom funkcijom prednjih ekstremiteta i ataktičnim fenotipom.

8. Popis literature

- ACIKGOZ, S., B. M. KAYATEKIN, O. UYSA, L. GONENC, C. PEKCETIN, I. SEMIN, A. GURE (1998): Methamphetamine causes lipid peroxidation and an increase in superoxide dismutase activity in the rat striatum. *Brain Res.* 813, 200–202.
- ALBERS, D.S., SONSALLA, P.K. (1995): Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: pharmacological profile of protective and nonprotective agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 1104-1114.
- ALBERTSON, T. E., R. W. DERLET, B. E. VAN HOOZEN (1991): Methamphetamine and the expanding complications of amphetamines. *West. J. Med.* 170, 214–219.
- ALBIN, R. L., A. B. YOUNG, J. B. PENNEY (1989): The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366-375.
- ALEXANDER, G. E., M. D. CRUTCHER, M. R. DELONG (1990): Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and „limbic“ functions. *Prog. Brain Res.* 85, 119-146.
- ARMSTRONG, B. D., K. K. NOGUCHI (2004): The neurotoxic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and methamphetamine on serotonin, dopamine, and GABA-ergic terminals: an in-vitro autoradiographic study in rats. *Neurotoxicology* 25, 905–914.
- BAKHIT, C., M. E. MORGAN, M. A. PEAT, J. W. GIBB (1981): Long-term effects of methamphetamine on the synthesis and metabolism of 5-hydroxytryptamine in various regions of the rat brain. *Neuropharmacology* 20, 1135–1140.
- BALOGH, B., E. MOLNAR, R. JAKUS, L. QUATE, H. J. OLVERMAN, P. A. T. KELLY (2004): Effects of single dose of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine on circadian patterns, motor activity and sleep in drug-naive rats and rats previously exposed to MDMA. *Psychopharmacology* 173, 296-309.
- BARR, A. M., W. J. PANENKA, G. W. MACEWAN, A. E. THORNTON, D. J. LANG, W. G. HONER, T. LECOMTE (2006): The need for speed: an update on methamphetamine addiction. *J. Psychiatry Neurosci.* 31, 301–313.
- BASTIANETTO, S., L. ROUQUIER, G. PERRAULT, D. J. SANGER (1995): DTG-induced circling behaviour in rats may involve the interaction between sigma sites and nigro-striatal dopaminergic pathways. *Neuropharmacology* 34, 281-287.

- BERTELLI, J. A., J. C. MIRA (1993): Behavioral evaluating methods in the objective clinical assessment of motor function after experimental brachial plexus reconstruction in the rat. *J. Neurosci. Methods* 46, 203-208.
- BILIĆ I., I. ZORIČIĆ, T. ANIĆ, J. ŠEPAROVIĆ, D. STANČIĆ-ROKOTOV, D. MIKUŠ, G. BULJAT, D. IVANKOVIĆ, G. ARALICA, I. PRKAČIN, D. PEROVIĆ, S. MIŠE, I. ROTKVIĆ, M. PETEK, R. RUČMAN, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2001): Haloperidol- stomach lesions attenuation by pentadecapeptide BPC157, omeprazole, bromocriptine, but not atropine, lansoprazole, pantoprazole, ranitidine, cimetidine and misoprostol in mice. *Life Sci.* 68, 1905-1912.
- BITTNER, S.E. , G.C. WAGNER, T.G. AIGNER, L.S. SEIDEN (1981): Effects of a high dose treatment of methamphetamine on caudate dopamine and anorexia in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 14, 481–486.
- BOBAN BLAGAIĆ, A., P. TURČIĆ, V. BLAGAIĆ, M. DUBOVEČAK, N. JELOVAC, M. ZEMBA, B. RADIĆ, T. BEČEJAC, D. STANČIĆ ROKOTOV, P. SIKIRIĆ (2009): Gastric pentadecapeptide BPC 157 counteracts morphine-induced analgesia in mice. *J. Physiol. Pharmacol.* 60, 177-181.
- BOBAN BLAGAIĆ, A, V. BLAGAIĆ, Z. ROMIĆ, P. SIKIRIĆ (2004): The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 499, 285-290.
- BOBAN BLAGAIĆ, A, V. BLAGAIĆ, Z. ROMIĆ, N. JELOVAC, G. DODIG, R. RUČMAN, M. PETEK, B. TURKOVIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2006): The influence of gastric pentadecapeptide BPC 157 on acute and chronic ethanol administration in mice. The effect of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester and L-arginine. *Med. Sci. Monit.* 12, 36-45.
- BOBAN BLAGAIĆ, A., V. BLAGAIĆ, M. MIRT, N. JELOVAC, G. DODIG, R. RUČMAN, M. PETEK, B. TURKOVIĆ, T. ANIĆ, M. DUBOVEČAK, M. STAREŠINIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2005): Gastric pentadecapeptide BPC 157 effective against serotonin syndrome in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 512, 173-179.
- BOOTH, R. G., R. J. BALDESSARINI (1991): (+)-6,7-benzomorphan sigma ligands stimulate dopamine synthesis in rat corpus striatum tissue. *Brain Res.* 557, 349-352.

- BOUHUYS A. L., R. H. VAN DEN HOOFDAKKER (1977): Effects of midbrain raphe destruction on sleep and locomotor activity in rats. *Physiol. Behav.* 19, 535–541.
- BOWYER, J. F., D. L. DAVIES, L. SCHMUED, H. W. BROENING, G. D. NEWPORT, W. JR. SLIKKER, R. R. HOLSON (1994): Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 1571-1580.
- BOWYER, J.F., R.R. HOLSON (1995): Methamphetamine and amphetamine neurotoxicity. U: *Handbook of Neurotoxicology*.(Chang, L.W., R.S. Dyer, ur.) Marcel Dekker, New York, pp. 845–870.
- BOWYER, J. F., A.W. TANK, G.D. NEWPORT, W. SLIKKER JR., S.F. ALI, R. R. HOLSON, R. R. (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, 817–824.
- BOWYER, J. F., S. ALI (2006): High doses of methamphetamine that cause disruption of the blood-brain barrier in limbic regions produce extensive neuronal degeneration in mouse hippocampus. *Synapse* 60,521–532.
- BRAAK, H., E. BRAAK, D. YILMAZER, C. SCHULTZ, R. DE VOS, E. JANSEN (1995): Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 46, 15-31.
- BRAUN, A. R., M. LARUELLE, M. M. MOURADIAN (1997): Interactions between D1 and D2 dopamine receptor family agonists and antagonists: the effects of chronic exposure on behavior and receptor binding in rats and their clinical implications. *J. Neural. Transm.* 104, 341-62.
- BRČIĆ, L., I. BRČIĆ, M. STAREŠINIĆ, T. NOVINŠČAK, P. SIKIRIĆ, S. SEIWERTH (2009): Modulatory effect of gastric pentadecapeptide BPC 157 on angiogenesis in muscle and tendon healing. *J. Physiol. Pharmacol.* 60, 191-196.
- BUFFUM, J.C., A.T. SHULGIN (2001): Overdose of 2.3 grams of intravenous methamphetamine: case, analysis and patient perspective. *J Psychoactive Drugs* 33, 409-12.
- CAI, J., J. CHEN, H. HE, Z. YIN, Z. ZHU, D. YIN (2009): Carbonyl stress: malondialdehyde induces damage on rat hippocampal neurons by disturbance of Ca(2+) homeostasis. *Cell Biol. Toxicol.* 25 435-45.

- CALIGIURI, M. P., C. BUITENHUYS (2005): Do preclinical findings of Methamphetamine-Induced Motor Abnormalities Translate to an Observable Clinical Phenotype? *Neuropsychopharmacology* 30, 2125-2134.
- CANNON, B., J. NEDERGAARD (2004): Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359.
- CAPPON, G. D., C. PU, C. V. VORHEES (2000): Time-course of methamphetamine-induced neurotoxicity in rat caudate-putamen after single-dose treatment. *Brain Res.* 863, 106–111.
- CAPPON, G. D., H. W. BROENING, C. PU, L. MORFORD, C. V. VORHEES (1996): alpha-Phenyl-N-tert-butyl nitron attenuates methamphetamine-induced depletion of striatal dopamine without altering hyperthermia. *Synapse* 24, 173-181.
- CARLSSON, A., M. LUNDQVIST, T. MAGNUSSON (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5- hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180, 1200.
- CARLSSON, M., A. CARLSSON (1989): Marked locomotor stimulation in monoamine-depleted mice following treatment with atropine in combination with clonidine. *J. Neural. Transm.* 1, 317-322.
- CARLSSON, M., A. CARLSSON (1990): Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia—implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 13, 272–276.
- CARMICHAEL, S. W., R. J. WILSON, W. S. BRIMIJOIN, L. J. MELTON III, H. OKAZAKI, T. L. YAKSH, J. E. AHLKOG, S. L. STODDARD, G. M. TYCE (1988): Decreased catecholamines in the adrenal medulla of patients with parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* 318,254.
- CESPUGLIO, R., H. FARADJI, M. E. GOMEZ, M. JOUVET (1981): Single unit recordings in the nuclei raphe dorsalis and magnus during the sleep-waking cycle of semi-chronic prepared cats. *Neurosci. Lett.* 24, 133–138.
- CHAN, P., J. H. CHEN, M. H. LEE, J.F. DENG (1994): Fatal and nonfatal methamphetamine intoxication in the intensive care unit. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 32, 147–155.
- CHAPMAN, D. E., G. R. HANSON, R. P. KESNER, K. A. KEEFE (2001): Long-term changes in basal ganglia function after a neurotoxic regimen of methamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 520–527.

- CHRISTEN, Y. (2000): Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, S621–S629.
- COHEN, G. (1984): Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 5, 77-82.
- COBOS, E. J., E. DEL POZO, J. M. BAEYENS (2007): Irreversible blockade of sigma-1 receptors by haloperidol and its metabolites in guinea pig brain and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 102, 812–825.
- COLABUFO, N. A., F. BERARDI, M. A. CONTINO, M. NISO, C. ABATE, R. PERRONE, V. TORTORELLA (2004): Antiproliferative and cytotoxic effects of some σ_2 agonists and σ_1 antagonists in tumour cell lines. *N.-S. Arch. Pharmacol.* 370, 106–113.
- COMMINS, D. L., L. S. SEIDEN (1986): alpha-Methyltyrosine blocks methylamphetamine-induced degeneration in the rat somatosensory cortex. *Brain Res.* 365, 15–20.
- CREESE, I., S. D. IVERSEN (1974): A role of forebrain dopamine systems in amphetamine induced stereotyped behaviour in the rat. *Psychopharmacology* 39, 345–357.
- CUBELLS J. F., S. RAYPORT, G. RAJENDRAN, D. SULZER (1994) Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J. Neurosci.* 14, 2260–2271.
- CURZON, G., J.C.R. FERNANDO, A.J. LEES (1979): Backward walking and circling: behavioural responses induced by drug treatments which cause simultaneous release of catecholamines and 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmac.* 66, 573-579.
- DANYSZ, W., M. GOSSEL, W. ZAJACZKOWSKI, D. DILL, G. QUACK (1994): Are NMDA antagonistic properties relevant for antiparkinsonian-like activity in rats? Case of amantadine and memantine. *J. Neural. Transm.* 7, 155-166.
- DARKE, S., S. KAYE, R. MCKETIN, J. DUFLOU (2008): Major physical and psychological harms of methamphetamine use. *Drug Alcohol Rev.* 27, 253–262.
- DAUER, W., S. PRZEDBORSKI (2003): Parkinson`s disease: Mechanism and Models. *Neuron* 39, 889-909.
- DE GROTTA, D., L.D. SANTA MARIA, S. BOEIRA , J. VALENTINI, M. F. CHARÃO, A.M. MORO, P. C. NASCIMENTO, V. J. POMBLUM, S. C. GARCIA (2007): Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection. *J. Pharmaceut. Biomed.* 43, 619-624.

- DELONG, M. R. (1990): Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281-285.
- DIB, M., C. GARREL, A. FAVIER, V. ROBIN, C. DESNULLE (2002): Can malondialdehyde be used as a biological marker of progression in neurodegenerative disease? *J. Neurol.* 249, 367-374.
- DIETZ, V. (1997): Neurophysiology of gait disorders: present and future applications. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 103, 333–355.
- EBERSBACH, G., M. SOJER, F. VALLDEORIOLA, J. WISSEL, J. MÜLLER, E. TOLOSA, W. POEWE (1999): Comparative analysis of gait in Parkinson's disease, cerebellar ataxia and subcortical arteriosclerotic encephalopathy. *Brain* 122, 1349-1355.
- ELLISON, G., M. S. EISON, H. S. HUBERMAN, F. DANIEL (1978): Long-term changes in dopaminergic innervation of caudate nucleus after continuous amphetamine administration. *Science.* 201, 276–278.
- ERIKSEN, J. L., Z. WSZOLEK, L. PETRUCCELLI (2005): Molecular pathogenesis of Parkinson Disease. *Arch. Neurol.*, 62, 353-357.
- FERRUCI, M., C. L. BUSCETI, A. FALLENI, F.S. GIORGI, S. RUGGIERI, F. FORNAI (2006): Effects of Methamphetamine on the Cerebellar Cortex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074, 149-153.
- FITZMAURICE, P. S., J. TONG, M. YAZDANPANA, P. P. LIU, K. S. KALASINSKY, S. J. KISH (2006): Levels of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde are increased in brain of human chronic users of methamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 703–709.
- FLOYD, R. A. (1999) Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 236–245.
- FOG, R. (1972): On stereotypy and catalepsy: studies on the effect of amphetamines and neuroleptics in rats. *Acta Neurol. Scand.* 50, 1-66.

- FRIEDMAN, S. D., E. CASTANEDA, G. K. HODGE (1998): Long-term monoamine depletion, differential recovery, and subtle behavioral impairment following methamphetamine-induced neurotoxicity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 61, 35–44.
- FUKUMURA, M., G. D. CAPPON, C. PU, H. W. BROENING, C. V. VORHEES (1998): A single dose model of methamphetamine-induced neurotoxicity in rats: effects on neostriatal monoamines and glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.* 806, 1-7.
- FUXE, K., P. MANAGER, S. GENEDANI, L. AGNATI (2006): The nigrostriatal DA pathway and Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 71-83.
- GARTHWAITE, J. (1991): Glutamate, nitric oxide, and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14, 60–67.
- GERLACH, M., P. RIEDERER (1993): The pathophysiological basis of Parkinson's disease. U: Inhibitors of monoamine oxidase. (Szelenyi, I. B., ur.) Birkhiuser, Basel Boston Berlin, pp. 25-50.
- GERLACH, M., P. RIEDERER (1996): Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of Neural Transmission.* 103, 987-1041.
- GEYER, M. A., A. PUERTO, D. B. MENKES, D. S. SEGAL, A. J. MANDELL (1976): Behavioural studies following lesions of the mesolimbic and mesostriatal serotonergic pathways. *Brain Res.* 106, 257–270.
- GILL S., N. PATEL, K. O'SULLIVAN, D. BROOKS (2002): Intraparenchymal putaminal administration of glial- derived neurotrophic factor in the treatment of advanced Parkinson's disease. *Neurology* 58, A241.
- GJURAŠIN, M., P. MIKLIĆ, B. ŽUPANČIĆ, D. PEROVIĆ, K. ŽARKOVIĆ, L. BRČIĆ, D. KOLENC, B. RADIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2010): Peptide therapy with pentadecapeptide BPC 157 in traumatic nerve injury. *Regul. Pept.* 160, 33-41.
- GLUCK, M.R., L. Y. MOY, E. JAYATILLEKE, K. A. HOGAN, L. MAZINO, P. K. SONSALLA (2001): Parallel increases in lipid and protein oxidative markers in several mouse brain regions after methamphetamine treatment. *J. Neurochem.* 79, 152-160.
- GONÇALVES, J., S. BAPTISTA, T. MARTINS, N. MILHAZES, F. BORGES, C. F. RIBEIRO, J. O. MALVA, A. P. SILVA (2010): Methamphetamine-induced

- neuroinflammation and neuronal dysfunction in the mice hippocampus: preventive effect of indomethacin. *Eur. J. Neurosci.* 31, 315-326.
- GRABAREVIĆ, Z., M. TIŠLJAR, B. ARTUKOVIĆ, M. BRATULIĆ, P. DŽAJA, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ, J. PERIĆ, D. GEREŠ, J. KOS (1997): The influence of BPC 157 on nitric oxide agonist and antagonist induced lesions in broiler chicks. *J Physiol Paris.* 91, 139-49.
- GRAHAM, D. L., P. A. NOAILLES, J. L. CADET (2008): Differential neurochemical consequences of an escalating dose-binge regimen followed by single-day multiple-dose methamphetamine challenges. *J. Neurochem.* 105, 1873–1885.
- GREEN, A. R., R. J. DE SOUZA, J. L. WILLIAMS, T. K. MURRAY, A. J. CROSS (1992): The neurotoxic effects of methamphetamine on 5-hydroxytryptamine and dopamine in brain: evidence for the protective effect of chlormethiazole. *Neuropharmacology* 31, 315–321.
- GROSS, R. E., R. L. WATTS, R. A. HAUSER, R. A. BAKAY, H. REICHMANN, R. VON KUMMER, W. G. ONDO, E. REISSIG, W. EISNER, H. STEINER-SCHULZE, H. SIEDENTOP, K. FICHTE, W. HONG, M. CORNFELDT, K. BEEBE, R. SANDBRINK (2011): Intrastratial transplantation of microcarrier-bound human retinal pigment epithelial cells versus sham surgery in patients with advanced Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* 10, 509-19.
- GROTTO, D., L. D. SANTA MARIA, S. BOEIRA, J. VALENTINI, M. F. CHAR, A. M. MORO, P. C. NASCIMENTO, V. J. POMBLUM, S. C. GARCIA (2007) Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography – visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research*, 43, 619-624.
- GUILARTE, T. R., M. K. NIHEI, J. L. MCGLOTHAN, A. S. HOWARD (2003): Methamphetamine-induced deficits of brain monoaminergic neuronal markers: distal axotomy or neuronal plasticity. *Neuroscience* 122, 499–513.
- GUNDLACH, A. L., B. L. LARGENT, S. H. SNYDER (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, 1757-1770.

- GUYENET, S. J., S. A. FURRER, V. M. DAMIAN, T. D. BAUGHAN, A. R. LA SPADA, G. A. GARDEN (2010): A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *J. Vis. Exp.* 39, doi: 10.3791/1787.
- GYRIES, K., A. Z. RONAI (2001): Supraspinal delta- and mu- opioid receptors mediate gastric mucosal protection in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 1010 – 1015.
- GYRIES, K., Z. S. ZADORI, A. Z. RONAI, K. TEKES, J. NEMETH (2011): Role of central nervous system regulation of gastrointestinal functions: experimental evidence on the significant role of endomorphin-2 in gastric mucosal defence. *Acta Physiol.* 202, 37- 38.
- HAEFELY, W. (1978): *Pharmakologische Modelle zur Wirkung von Antiparkinsonmitteln. U: Langzeitbehandlung des Parkinson-Syndroms.* (Fischer, P. A. Schattauer, ur.) Stuttgart, New York, pp. 53-64.
- HARNOIS, C., T. DIAPOLO (1990): Decreased dopamine in the retinas of patients with Parkinson's disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 2473-2475.
- HESS, A., C. DESIDERIO, W. G. MCAULIFFE (1990): Acute neuropathological changes in the caudate nucleus caused by MPTP and METH: immunohistochemical studies. *J Neurocytol.* 19, 338–342.
- HOEHN, M., M. YAHR (1967): Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17, 427–42.
- HOMER, B. D., T. M. SOLOMON, R. W. MOELLER, A. MASCIA, L. DERALEAU, P. N. HALKITIS (2008): Methamphetamine abuse and impairment of social functioning: a review of the underlying neurophysiological causes and behavioral implications. *Psychol. Bull.* 134, 301–310.
- HORNER, K. A., Y. E. GILBERT, S. D. CLINE (2011): Widespread increases in malondialdehyde immunoreactivity in dopamine-rich and dopamine-poor regions of the rat brain following multiple, high doses of methamphetamine. *Neurosci.* 5, 1-11.
- HOTCHKISS, A. J., J.W. GIBB (1980): The long term effects of multiple doses of methamphetamine on tryptophan hydroxylase and tyrosine hydroxylase activity in rat brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 257–262.
- HOTCHKISS, A. J., M. E. MORGAN, J.W. GIBB (1979): The long-term effects of multiple doses of methamphetamine on neostriatal tryptophan hydroxylase, tyrosine

- hydroxylase, choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase activities, *Life Sci.* 25, 1373–1378.
- HRUBY, V.J. (2002): Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 847–858.
- ILIĆ, S., I. BRČIĆ, M. MEŠTER, M. FILIPOVIĆ, M. SEVER, R. KLIČEK, I. BARIŠIĆ, B. RADIĆ, Z. ZORIČIĆ, V. BILIĆ, L. BERKOPIĆ, L. BRČIĆ, D. KOLENC, Z. ROMIĆ, L. PAZANIN, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2009): Over-dose insulin and stable gastric pentadecapeptide BPC 157. Attenuated gastric ulcers, seizures, brain lesions, hepatomegaly, fatty liver, breakdown of liver glycogen, profound hypoglycemia and calcification in rats. *J. Phys. Pharm.* 60 (Suppl 7), 107-114.
- ILIĆ, S., D. DRMIĆ, K. ŽARKOVIĆ, D. KOLENC, M. ČORIĆ, L. BRČIĆ, R. KLIČEK, B. RADIĆ, M. SEVER, V. DJUZEL, M. IVICA, A. BOBAN - BLAGAIĆ, Z. ZORIČIĆ, T. ANIĆ, I. ZORIČIĆ, S. ĐIDIĆ, Z. ROMIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2010): High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with The stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (pl 14736). *J. Phys. Pharm.* 61, 241-250.
- ILIĆ, S., D. DRMIĆ, K. ŽARKOVIĆ, D. KOLENC, L. BRČIĆ, B. RADIĆ, V. DJUZEL, A. B. BLAGAIĆ, Z. ROMIĆ, S. DŽIDIĆ, L. KALOGJERA, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2011a): Ibuprofen hepatic encephalopathy, hepatomegaly, gastric lesion and gastric pentadecapeptide BPC 157 in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 667, 322-329.
- ILIĆ, S., D. DRMIĆ, S. FRANJIĆ, D. KOLENC, M. ČORIĆ, L. BRČIĆ, R. KLIČEK, B. RADIĆ, M. SEVER, V. DJUZEL, M. FILIPOVIĆ, Z. DJAKOVIĆ, V. STAMBOLIJA, A. B. BLAGAIĆ, I. ZORIČIĆ, M. GJURAŠIN, M. STUPNIŠEK, Z. ROMIĆ, K. ŽARKOVIĆ, S. DŽIDIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2011b): Pentadecapeptide BPC 157 and its effects on a NSAID toxicity model: diclofenac-induced gastrointestinal, liver, and encephalopathy lesions. *Life Sci.* 88, 535-542.

- INOUE, H., N. IKEDA, K. KUDO, T. ISHIDA, M. TERADA, R. MATODA (2006): Methamphetamine-related sudden death with a concentration which was of a 'toxic level'. *Leg. Med. (Tokyo)* 8, 150–155.
- IRVINE, K. A., A. R. FERGUSON, K. D. MITCHELL, S. B. BEATTIE, M. S. BEATTIE, J. C. BRESNAHAN (2010): A novel method for assessing proximal and distal forelimb function in the rat: the Irvine, Beatties and Bresnahan (IBB) forelimb scale. *J. Vis. Exp.* 46, doi: 10.3791/2246.
- ISHIZAWA, T., P. MATILLA, P. DAVIES, D. WANG, D. DICKSON (2003): Colocalization of Tau and Alpha-Synuclein Epitopes in Lewy Bodies "Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 389–397.
- INSTITUT ZA BIOMEDICINSKA ISTRAŽIVANJA "A. MARXER" (1996a): 3H-PL-10.1.AK-15. Pharmacokinetics in the rat after single oral administration.
- INSTITUT ZA BIOMEDICINSKA ISTRAŽIVANJA "A. MARXER" (1996b): 3H-PL-10.1.AK-15. Pharmacokinetics in the rat after single intravenous administration.
- INSTITUT ZA BIOMEDICINSKA ISTRAŽIVANJA "A. MARXER" (1996c): 41-PL-10.1.AK-15. Whole-body autoradiography in the rat after single oral administration.
- INSTITUT ZA BIOMEDICINSKA ISTRAŽIVANJA "A. MARXER" (1995a): Pharmacological receptor binding affinity of PL-10.1. *RBM Exp.* 950020.
- INSTITUT ZA BIOMEDICINSKA ISTRAŽIVANJA "A. MARXER" (1995b): In vitro microsomal enzyme activity in mouse liver after repeated intravenous administration. *RBM Exp.* 950021.
- ITZHAK, Y., S. F. ALI (2006): Role of nitric system in behavioral and neurotoxic effects of amphetamine analogs. *Pharmacol. Ther.* 109, 246-62.
- ITZHAK, Y., J. L. MARTIN, S. F. ALI (2000): nNOS inhibitors attenuate methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity but not hyperthermia in mice. *Neuroreport* 11, 2943–2946.
- JACOBS, B. L., E. C. AZMITIA (1992): Structure and function of the brainserotonin system. *Physiol. Rev.* 72, 165–229.

- JAYANTHI, S., X. DENG, P. A. NOAILLES, B. LADENHEIM, J. L. CADET (2004): Methamphetamine induces neuronal apoptosis via cross-talks between endoplasmic reticulum and mitochondria-dependent death cascades. *Faseb J.* 18, 238–251.
- JAYANTHI, S., X. DENG, B. LADENHEIM, M. T. MCCOY, A. CLUSTER, N. S. CAI, J. L. CADET (2005): Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 868–873.
- JELLINGER, K. A. (1991): Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol. Chem. Neuropathol.* 14, 153-197.
- JELOVAC, N., P. SIKIRIĆ, R. RUCMAN, M. PETEK, D. PEROVIĆ, P. KONJEVODA, A. MAROVIĆ, S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, J. SUMAJSTORČIĆ, G. DODIG, J. PERIĆ (1998): A novel pentadecapeptide, BPC 157, blocks the stereotypy produced acutely by amphetamine and the development of haloperidol-induced supersensitivity to amphetamine. *Biol. Psychiatry* 1, 511-519.
- JELOVAC, N., P. SIKIRIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, A. MAROVIĆ, D. PEROVIĆ, S. SEIWERTH, S. MIŠE, B. TURKOVIC, G. DODIG, P. MIKLIĆ, G. BULJAT, I. PRKAČIN (1999a): Pentadecapeptide BPC 157 attenuates disturbances induced by neuroleptics: the effect on catalepsy and gastric ulcers in mice and rats. *Eur. J. Pharmacol.* 379, 19-31.
- JELOVAC, N., P. SIKIRIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, D. PEROVIĆ, A. MAROVIĆ, T. ANIĆ, S. SEIWERTH, S. MIŠE, B. PIGAC, B. DUPLANČIĆ, B. TURKOVIĆ, G. DODIG, I. PRKAČIN, D. STANČIĆ-ROKOTOV, I. ZORIČIĆ, G. ARALICA, B. SEBEČIĆ, T. ŽIGER, Z. SLOBODNJAK (1999b): The effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on development of tolerance and physical dependence following repeated administration of diazepam. *Chin J Physiol.* 30, 171-9.
- JENG, C. H., Y. WANG (1998): Methamphetamine modulates GABA-induced electrophysiological depression by alternating noradrenergic actions in cerebellar Purkinje neurons. *Psychopharmacol. (Berl)* 136, 132-138.
- JINSMAA, Y., V. R. FLORANG, J. N. REES, D. G. ANDERSON, S. STRACK, J. A. DOORN (2009): Products of oxidative stress inhibit aldehyde oxidation and reduction pathways in dopamine catabolism yielding elevated levels of a reactive intermediate. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 835–841.

- JOHNSON-DAVIS, K. L., A. E. FLECKENSTEIN, D. G. WILKINS (2003): The role of hyperthermia and metabolism as mechanisms of tolerance to methamphetamine neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 482, 151–154
- JOHNSON-DAVIS, K. L., J. G. TRUONG, A. E. FLECKENSTEIN, D. G. WILKINS (2004): Alterations in vesicular dopamine uptake contribute to tolerance to the neurotoxic effects of methamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 578–586.
- JONSSON, G., E. NWANZE (1982): Selective (+)-amphetamine neurotoxicity on striatal dopamine nerve terminals in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 77, 335–345.
- KADOTA, T., K. KADOTA (2004): Neurotoxic morphological changes induced in the medial prefrontal cortex of rats behaviorally sensitized to methamphetamine. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 241–251.
- KAWANO, N., K. YADA, M. AIHARA, S. YAGISHITA (1983): Oligodendroglia-like cells (clear cells) in ependymoma. 62, 141-144.
- KAUSHAL, N., R. R. MATSUMOTO (2011) Role of Sigma Receptors in Methamphetamine-Induced Neurotoxicity. *Current. Neuropharmacology* 9, 54-57.
- KELLY, M. A., M. RUBINSTEIN, T. J. PHILLIPS, C. N. LESSOV, S. BURKHART-KASCH, G. ZHANG, J. R. BUNZOW, Y. FANG, G. A. GERHARDT, D. K. GRANDY, M. J. LOW (1998): Locomotor activity in D2 in dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *J. Neurosci.* 18, 3470-3479.
- KELLY P. H. , S. D. IVERSEN (1976): Selective 6-OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: abolition of psychostimulant induced locomotor activity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 40, 45–56.
- KELLY, P. H., P. W. SAVIOUR, S. D. IVERSEN (1975): Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res.* 94, 507.
- KITA, T., G. C. WAGNER, T. NAKASHIMA (2003): Current research on methamphetamine-induced neurotoxicity: animal models of monoamine disruption. *J. Pharmacol. Sci.* 92, 178-95.

- KITA, T., K. SHIMADA, Y. MASTUNARI, G. C. WAGNER, K. KUBO, T. NAKASHIMA (2000): Methamphetamine-induced striatal dopamine neurotoxicity and cyclooxygenase-2 protein expression in BALB/c mice. *Neuropharmacology* 39, 399–406.
- KITADA, T., S. ASAKAWA, N. HATTORI, H. MATSUMINE, Y. YAMAMURA, S. MINOSHIMA, M. YOKOCHI, Y. MIZUNO, N. SHIMIZU (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605–608.
- KITAMURA, O., I. TOKUNAGA, T. GOTOHDA, S. KUBO (2007): Immunohistochemical investigation of dopaminergic terminal markers and caspase-3 activation in the striatum of human methamphetamine users. *Int. J. Legal. Med.* 121, 163–168.
- KIYATKIN, E. A., P. L. BROWN, H. S. SHARMA (2007): Brain edema and breakdown of the blood-brain barrier during methamphetamine intoxication: critical role of brain hyperthermia. *Eur. J. Neurosci.* 26, 1242-1253.
- KISH, S. J., P. S. FITZMAURICE, I. BOILEAU, G. A. SCHMUNK, L. C. ANG, Y. FURUKAWA, L. J. CHANG, D. J. WICKHAM, A. SHERWIN, J. TONG (2009) Brain serotonin transporter in human methamphetamine users. *Psychopharmacol. (Berl)*. 202, 649-661.
- KOGAN, F. J., W. K. NICHOLS, J. W. GIBB (1976): Influence of methamphetamine on nigral and striatal tyrosine hydroxylase activity and on striatal dopamine levels. *Eur. J. Pharmacol.* 36, 363–371.
- KRASNOVA, I. N., J. L. CADET (2009): Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain. Res. Rev.* 60, 379-407.
- KRIVIĆ, A., T. ANIĆ, S. SEIWERTH, D. HULJEV, P. SIKIRIĆ (2006): Achilles detachment in rat and stable gastric pentadecapeptide BPC 157: Promoted tendon-to-bone healing and opposed corticosteroid aggravation. *J. Orthop. Res.* 24, 982-988.
- KROEZE, W. K., S. J. HUFEISEN, B. A. POPADAK, S. M. RENOCK, S. STEINBERG, P. ERNSBERGER, K. JAYATHILAKE, H. Y. MELTZER, B. L. ROTH (2003): H1-Histamine Receptor Affinity Predicts Short-Term Weight Gain for Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. *Neuropsychopharmacology* 28, 519–26.

- KRUSTRUP, P., R. A. FERGUSON, M. KJAER, J. BANGSBO (2003): ATP and heat production in human skeletal muscle during dynamic exercise: higher efficiency of anaerobic than aerobic ATP resynthesis. *J. Physiol.* 549, 255–269.
- KUCZENSKI, R., D. S. SEGAL (1999): Sensitization of amphetamine-induced stereotyped behaviors during the acute response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 699-709.
- KUCZENSKI, R., I. P. EVERALL, L. CREWS, A. ADAME, I. GRANT, E. MASLIAH (2007): Escalating dose-multiple binge methamphetamine exposure results in degeneration of the neocortex and limbic system in the rat. *Exp. Neurol.* 207, 42–51.
- KURIAN, M.A., P. GISSEN, M. SMITH, S. J. R. HEALES, P. T. CLAYTON (2011): The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *Lancet Neurol.* 10, 721-733.
- LADENHEIM, B., I. N. KRASNOVA, X. DENG, J. M. OYLER, A. POLETTINI, T. H. MORAN, M. A. HUESTIS, J. L. CADET (2000): Methamphetamine-induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6. *Mol. Pharmacol.* 58, 1247–1256.
- LADNER, R.C., A. K. SATO, J. GORZELANY, M. DE SOUZA (2004) Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov. Today* 9, 525–529.
- LANG, A. E., S. GILL, N. K. PATEL, A. LOZANO, J. G. NUTT, R. PENN, D. J. BROOKS, G. HOTTON, E. MORO, P. HEYWOOD, M. A. BRODSKY, K. BURCHIEL, P. KELLY, A. DALVI, B. SCOTT, M. STACY, D. TURNER, V. G. WOOTEN, W. J. ELIAS, E. R. LAWS, V. DHAWAN, A. J. STOESSL, J. MATCHAM, R. J. COFFEY, M. TRAUB (2006): Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol.* 59, 459-66.
- LARSEN, K. E., E. A. FON, T. G. HASTINGS, R. H. EDWARDS, D. SULZER (2002): Methamphetamine-Induced Degeneration of Dopaminergic Neurons Involves Autophagy and Upregulation of Dopamine Synthesis. *J. Neurosci.* 22, 8951–8960.
- LEWITT, P. A., A. R. REZAI, M. A. LEEHEY, S. G. OJEMANN, A. W. FLAHERTY, E. N. ESKANDAR, S. K. KOSTYK, K. THOMAS, A. SARKAR, M. S. SIDDIQUI, S. B. TATTER, J. M. SCHWALB, K. L. POSTON, J. M. HENDERSON, R. M. KURLAN, I. H. RICHARD, L. VAN METER, C. V. SAPAN, M. J. DURING, M. G. KAPLITT, A.

- FEIGIN (2011): AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol.* 10, 309-319.
- LEYSEN, J.E., P. M. JANSSEN, A. A. MEGENS, A. SCHOTTE (1994): Risperidone: A novel antipsychotic with balanced serotonin-dopamine antagonism, receptor occupancy profile, and pharmacologic activity. *J. Clin. Psych.* 55, 5–12.
- LEYSEN, JE; JANSSEN, PM; GOMMEREN, W; WYNANTS, J; PAUWELS, PJ; JANSSEN, PA (1992). "In vitro and in vivo receptor binding and effects on monoamine turnover in rat brain regions of the novel antipsychotics risperidone and ocapерidone". *Molecular Pharmacology* 41 (3): 494–508.
- LIANG, N., C. RUTLEDGE (1982): Evidence for carrier-mediated efflux of dopamine from corpus striatum. *Biochem. Pharmacol.* 302, 479–484.
- LI, F. C. H., J.-C. YEN, S. H. H. CHAN, A. Y. W. CHANG (2012): Bioenergetics failure and oxidative stress in brain stem mediates cardiovascular collapse associated with fatal methamphetamine intoxication. *PloS One* 7, e30589. Doi: 10.1371/journal.pone.0030589.
- LIEN, S., H. B. LOWMAN (2003) Therapeutic peptides. *Trends Biotechnol.* 21, 556–562.
- LOFFET, A. (2002): Peptides as drugs: is there a market? *J. Pept. Sci.* 8, 1–7.
- LONG, J., C. LIU, L. SUN, H. GAO, J. LIU (2009): Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria. *Neurochem. Res.* 34, 786–794.
- LOREZ, H. (1981): Fluorescence histochemistry indicates damage of striatal dopamine nerve terminals in rats after multiple doses of methamphetamine. *Life Sci.* 28, 911–916.
- LUCOT, J. B., G.C. WAGNER, C. R. SCHUSTER, L. S. SEIDEN (1980): The effects of dopaminergic agents on the locomotor activity of rats after high doses of methamphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 409-413.
- LUCKING, C. B., A. DURR, V. BONIFATI, J. VAUGHAN, G. DE MICHELE, T. GASSER, B. S. HARHANGI, G. MECO, P. DENEFFLE, N. W. WOOD, Y. AGID, A. BRICE (2000): Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N. Engl. J. Med.* 342, 1560–1567.

- LYDIC, R., R. W. MCCARLEY, J.A. HOBSON (1983): The time course of dorsal raphe discharge, PGO waves and muscle tone averaged across multiple sleep cycles. *Brain Res.* 274, 365–370.
- LYNCH, J., M.A. HOUSE (1992): Cardiovascular effects of methamphetamine. *J. Cardiovasc. Nurs.* 6, 12–18.
- MACKENZIE, R. G., B.G. HOEBEL, C. NORDELLI, M. TRULSON (1978) Increased tilt-cage activity after serotonin depletion by 5,7-dihydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 17, 957–963.
- MALMBERG, Å., Å. MIKAELS, N. MOHELL (1998): Agonist and Inverse Agonist Activity at the Dopamine D3 Receptor Measured by Guanosine 5'-[γ -Thio]Triphosphate-[35S] Binding. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 285, 119–126.
- MARDSSEN, C. D. (1990): Parkinson's disease. *Lancet* 1, 948–952.
- MARIN, C., S.A. PARASHOS, V. KAPITZOGLOU-LOGOTHETIS, A. PEPPE, T. N. CHASE (1993): D1 and D2 dopamine receptor-mediated mechanisms and behavioral supersensitivity. *Pharmacol Biochem Behav.* 45, 195-200.
- MARKS, W. J., R. T. BARTUS, J. SIFFERT, C. S. DAVIS, A. LOZANO, N. BOULIS, J. VITEK, M. STACY, D. TURNER, L. VERHAGEN, R. BAKAY, R. WATTS, B. GUTHRIE, J. JANKOVIC, R. SIMPSON, M. TAGLIATI, R. ALTERMAN, M. STERN, G. BALTUCH, P. A. STARR, P. S. LARSON, J. L. OSTREM, J. NUTT, K. KIEBURTZ, J. H. KORDOWER, C. W. OLANOW (2010): Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol.* 9, 1164-1172.
- MATSUMOTO, R.R., Y. LIU, M. LERNER, E. W. HOWARD, D. J. BRACKETT (2003): Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur. J. Pharmacol.* 469, 1-12.
- MCGREGOR, D.P. (2008) Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 616–619.
- MCGINTY, D., R. M. HARPER (1976): Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* 101, 569.

- MEREDITH, C. W., C. JAFFE, K. ANG-LEE, A. J. SAXON (2005): Implications of chronic methamphetamine use: a literature review. *Harv. Rev. Psychiatry* 13, 141–154.
- METZ, G. A., I. Q. WHISHAW (2002): Drug-Induced rotation in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end-point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. *Neuroscience* 111, 325-336.
- MIRECKI, A., P. FITZMAURICE, L. ANG, K. S. KALASINSKY, F. J. PERETTI, S. S. AIKEN, D. J. WICKHAM, A. SHERWIN, J. N. NOBREGA, H. J. FORMAN, S. J. KISH (2004): Brain antioxidant systems in human methamphetamine users. *J. Neurochem.* 89, 1396–1408.
- MORENO, A., J. DE FELIPE, R. GARCÍA SOLA, A. NAVARRO, S. RAMÓN Y CAJAL (2001): Neuronal and mixed neuronal glial tumors associated to epilepsy. A heterogeneous and related group of tumours. *Histol. Histopathol.* 16, 613-622.
- MORGAN M. E., J. W. GIBB (1980): Short-term and long-term effects of methamphetamine on biogenic amine metabolism in extra-striatal dopaminergic nuclei. *Neuropharmacology* 19, 989–995.
- MOSZCZYNSKA, A., P. FITZMAURICE, L. ANG, K. S. KALASINSKY, G. A. SCHMUNK, F. J. PERETTI, S. S. AIKEN, D. J. WICKHAM, S. J. KISH (2004) Why is parkinsonism not a feature of human methamphetamine users? *Brain* 127, 363–370.
- MUSTOE, T. A., G. F. PIERCE, A. THOMASON, P. GRAMATES, M.B. SPORN, T. F. DUEL (1987): Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- β . *Science* 237, 1333-1336.
- MURRAY, J. B. (1998): Psychophysiological aspects of amphetamine-methamphetamine abuse. *J. Psychol.* 132, 227–237.
- NACIONALNI CENTAR ZA KRONIČNE BOLESTI (2006). Symptomatic pharmacological therapy in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*. Royal College of Physicians, London, pp. 59–100.
- NAKAGAWA, T., J. YUAN (2000): Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell. Biol.* 150, 887–894

- NIDA RESEARCH REPORT (2006): Methamphetamine Abuse and Addiction. NIH Publication No. 06-4210, 1–8.
- NOVINŠČAK, T., L. BRČIĆ, M. STAREŠINIĆ, I. JUKIĆ, B. RADIĆ, D. PEVEC, S. MISE, S. TOMAŠOVIĆ, I. BRČIĆ, T. BANIĆ, A. JAKIR, G. BULJAT, T. ANIĆ, I. ZORIČIĆ, Ž. ROMIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2008): Gastric pentadecapeptide BPC 157 as an effective therapy for muscle crush injury in the rat. *Surg. Today* 38, 716-725.
- O'DELL, S. J., F. B. WEIHMULLER, J. F. MARSHALL (1991): Multiple methamphetamine injections induce marked increases in extracellular striatal dopamine which correlates with subsequent neurotoxicity. *Brain Res.* 564, 256–260.
- PALKOVITS, M. (1999): Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. *Front. Neuroendocrinol.* 20, 270-295.
- PARASHOS, S. A., P. BARONE, C. A. MARIN, A. J. PARASCHOS, V. KAPITZOGLOU-LOGOTHETIS, T. N. CHASE (1989): Haloperidol- and SCH23390-induced dopaminergic supersensitivities are not additive in the rat. *Psychopharmacol. (Berl)* 98, 189-92.
- PATIL, S., A. PERRY (2008): Central nervous system: Brain, spinal cord, and meninges. U: *The Washington Manual of Surgical Pathology* (Humphrey, P. A., L. P. Dehner, J. D. Pfeifer, ur.). Lippincott Williams & Wilkins, Washington University, St. Louis, pp. 513.
- PEREZ JA JR, ARSURA EL, STRATEGOS S. (1999): Methamphetamine-related stroke: four cases. *J. Emerg. Med.* 17, 469–471.
- PEVEC, D., T. NOVINŠČAK, L. BRČIĆ, K. ŠIPOŠ, I. JUKIĆ, M. STAREŠINIĆ, S. MIŠE, I. BRČIĆ, D. KOLENC, R. KLIČEK, T. BANIĆ, M. SEVER, A. KOCIJAN, L. BERKOPIC, B. RADIĆ, G. BULJAT, T. ANIĆ, I. ZORIČIĆ, I. BOJANIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2010): Impact of pentadecapeptide BPC 157 on muscle healing impaired by systemic corticosteroid application. *Med. Sci. Monit.* 16, 81-88.

- PHELPS, G., H. A. SPEAKER, K. E. SABOL (2010): Relationship between methamphetamine-induced behavioral activation and hyperthermia. *Brain Res.* 1357, 41-52.
- PORTAS, C. M., B. BJORVATN, R. URSIN (2000): Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog. Neurobiol.* 60, 13–35.
- PRKAČIN, I, J. ŠEPAROVIĆ, G. ARALICA, D. PEROVIĆ, M. GJURAŠIN, M. LOVRIĆ-BENČIĆ, D. STANČIĆ-ROKOTOV, M. STAREŠINIĆ, T. ANIĆ, D. MIKUŠ, P. SIKIRIĆ, S. SEIWERTH, S. MIŠE, I. ROTKVIĆ, V. JAGIĆ, R. RUCMAN, M. PETEK, B. TURKOVIC, A. MAROVIC, B. SEBEČIĆ, A. BOBAN-BLAGAIĆ, N. KOKIĆ (2001): Portal hypertension and liver lesions in chronically alcohol drinking rats prevented and reversed by stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL-10, PLD-116), and propranolol, but not ranitidine. *J Physiol Paris*; 95, 315-24.
- PUNTEL, R. L., D. H. ROOS, D. GROTTO, S. C. GARCIA, C. W. NOGUEIRA, J. B. T. ROCHA (2007): Antioxidant properties of Krebs cycle intermediates against malonate pro-oxidant activity in vitro: A comparative study using the colorimetric method and HPLC analysis to determine malondialdehyde in rat brain homogenates. *Life Sci.* 81, 51-62.
- RAMAKER, C., J. MARINUS, A. M. STIGGELBOUT, ANNE MARGARETHE, B. J. VAN HILTEN (2002): Systematic evaluation of rating scales for impairment and disability in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 17, 867–876.
- RAWLS, S. M.; D. A. BARON, E. B. GELLER, M. W. ADLER (2002): Sigma sites mediate DTG-evoked hypothermia in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 779-786.
- RICAURTE, G. A. C.R. SCHUSTER, L. S. SEIDEN (1980): Long-term effects of repeated methylamphetamine administration on dopamine and serotonin neurons in the rat brain: a regional study. *Brain Res.* 193, 153–163.
- RICAURTE, G. A. , R. W. GUILLERY, L. S. SEIDEN, R. Y. MOORE (1982): Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methamphetamine in the rat brain, *Brain Res.* 235, 93–103.

- RICHARDS, J. B., M. J. BAGGOTT, K. E. SABOL, L. S. SEIDEN (1993): A high-dose methamphetamine regimen results in longlasting deficits on performance of a reaction-time task. *Brain Res.* 627, 254–260.
- RIDDLE, E. L., A. E. FLECKENSTEIN, G. R. HANSON (2006): Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *AAPS J.* 8, 413-418.
- ROBERT, A. (1979): Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77, 761-767.
- ROBERT, A., J. E. NEZAMIS, C. LANCASTER, J. P. DAVIS, S. O. FIELD, A. J. HANCHAR (1983): Mild irritants prevent gastric necrosis through “adaptive cytoprotection” mediated by prostaglandins. *Am. J. Physiol.* 245, 113-121.
- ROBERT, A. (1985): Cytoprotection and adaptive cytoprotection. U: *Peptic ulcer disease: Basic and clinical aspects* (Nelis, G. F., J. Boeve, J.J. Misiewicz, ur.). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 297-316.
- RUENZI, M., M. STOLTE, M. VELJAČA, K. OREŠKOVIĆ, J. PETERSON (2005): Ulcerative Colitis Study Group. A multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled phase II study of PL 14736 enema in the treatment of mild-to-moderate ulcerative colitis. *Gastroenterology* 128, A584.
- RUSYNIAK, D. E., Y. OOTSUKA, W. W. BLESSING (2008): When administered to rats in a cold environment, 3, 4-methylenedioxymethamphetamine reduces brown adipose tissue thermogenesis and increases tail blood flow: effects of pretreatment with 5-HT1A and dopamine D2 antagonists. *Neuroscience* 154, 1619–1626.
- SANCHEZ, V., M. ZEINI, J. CAMARERO, E. O'SHEA, L. BOSCA, A. R. GREEN, M. I. COLADO (2003): The nNOS inhibitor, ARR17477AR, prevents the loss of NF68 immunoreactivity induced by methamphetamine in the mouse striatum. *J. Neurochem* 85, 515–524.
- SALMI, P., S. AHLENIUS (1998): Evidence for functional interactions between 5-HT1A and 5-HT2A receptors in rat thermoregulatory mechanisms. *Pharmacol. Toxicol.* 82, 122–127.

- SALMI, P., P. JIMENEZ, S. AHLENIUS, (1993): Evidence for specific involvement of dopamine D1 and D2 receptors in the regulation of body temperature in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 236, 395–400.
- SAMANTARAY, S., S. K. RAY, S. F. ALI, N. L. BANIK (2006): Calpain activation in apoptosis of motoneurons in cell culture models of experimental parkinsonism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074, 349–356.
- SCOTT, J. C., S. P. WOODS, G. E. MATT, R. A. MEYER, R. K. HEATON, J. H. ATKINSON, I. GRANT (2007): Neurocognitive effects of methamphetamine: a critical review and meta-analysis. *Neuropsychol. Rev.* 17, 275–297.
- SCHEPERS, R. J., J. M. OYLER, R. E. JOSEPH JR., E. J. CONE, E. T. MOOLCHAN, M. A. HUESTIS (2003): Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clin. Chem.* 49, 121–132.
- SCHMIDT, C. J., J. W. GIBB (1985a): Role of dopamine uptake carrier in the neurochemical response to methamphetamine and effects of amfonelic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 109, 73–80.
- SCHMIDT, C. J., P. K. SONSALLA, G. R. HANSON, M. A. PEAT, J. W. GIBB (1985b): Methamphetamine-induced depression of monoamine synthesis in the rat: development of tolerance. *J. Neurochem.* 44, 852–855.
- SCHMIDT, W. J., M. BUBSER, W. HAUBER (1992): Behavioural pharmacology of glutamate in the basal ganglia. *J. Neural. Transm.* 38, 65-89.
- SEGAL, D. S., R. KUCZENSKI, M. L. O'NEIL, W. P. MELEGA, A. K. CHO (2003): Escalating dose methamphetamine pretreatment alters the behavioral and neurochemical profiles associated with exposure to a highdose methamphetamine binge. *Neuropsychopharmacology* 28, 1730–1740.
- SEGAL, D. S., R. KUCZENSKI, M. L. O'NEIL, W. P. MELEGA, A. K. CHO (2005): Prolonged exposure of rats to intravenous methamphetamine: behavioral and neurochemical characterization. *Psychopharmacology (Berl.)* 180, 501–512.

- SEIDEN, L. S., M. W. FISCHMAN, C. R. SCHUSTER (1975): Long-term methamphetamine induced changes in brain catecholamines in tolerant rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.* 1, 215–219.
- SEIDEN, L. S., G. VOSMER (1984): Formation of 6-hydroxydopamine in caudate nucleus of the rat brain after a single large dose of methylamphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 21, 29–31.
- SEKINE, Y., Y. OUCHI, G. SUGIHARA, N. TAKEI, E. YOSHIKAWA, K. NAKAMURA, Y. IWATA, K. J. TSUCHIYA, S. SUDA, K. SUZUKI, M. KAWAI, K. TAKEBAYASHI, S. YAMAMOTO, H. MATSUZAKI, T. UEKI, N. MORI, M. S. GOLD, J. L. CADET (2008): Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. *J. Neurosci.* 28, 5756-5761.
- SEIWERTH, S., P. SIKIRIĆ, Ž. GRABAREVIĆ, I. ZORIČIĆ, M. HANŽEVAČKI, D. LJUBANOVIĆ, V. ČORIĆ, P. KONJEVODA, M. PETEK, R. RUČMAN, B. TURKOVIĆ, D. PEROVIĆ, D. MIKUŠ, S. JANDRIJEVIĆ, M. MEDVIDOVIĆ, T. TADIĆ, B. ROMAC, J. KOS, J. PERIĆ, Z. KOLEGA (1997): BPC 157's effect on healing. *J Physiol Paris.* 91, 173-178.
- SHARMA, H. S., E. A. KIYATKIN (2009): Rapid morphological brain abnormalities during acute methamphetamine intoxication in the rat: An experimental study using light and electron microscopy. *J. Chem. Neuroanat.* 37, 18–32.
- SHARMA, H. S., P. O. SJOQUIST, S. F. ALI (2007): Drugs of abuse-induced hyperthermia, blood-brain barrier dysfunction and neurotoxicity: neuroprotective effects of a new antioxidant compound H-290/51. *Curr. Pharm. Des.* 13,1903–1923.
- SHIMA, K., H. NAKAHAMA, M. YAMAMOTO (1986): Firing properties of two types of nucleus raphe dorsalis neurons during the sleepwaking cycle and their response to sensory stimuli. *Brain Res.* 399, 317–326.
- SHIMURA, H., N. HATTORI, S. KUBO, Y. MIZUNO, S. ASAKAWA, S. MINOSHIMA, N. SHIMIZU, K. IWAI, T. CHIBA, K. TANAKA, T. SUZUKI (2000): Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302-305.

- SIKIRIĆ, P., M. PETEK, R. RUČMAN, S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, I. ROTKVIĆ, V. JAGIĆ B. TURKOVIĆ, B. MILDNER, M. DUVNJAK (1992): The significance of the gastroprotective effect of body protection compound (BPC): modulation by different procedures. *Acta Physiol Hung.* 80, 89-98.
- SIKIRIĆ, P., M. PETEK, R. RUČMAN, S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, I. ROTKVIĆ, B. TURKOVIĆ, V. JAGIĆ, B. MILDNER, M. DUVNJAK, N. LANG (1993a): A new gastric juice peptide BPC. An overview of stomach/stress/organoprotection hypothesis and BPC beneficial effects, *J. Physiol.* 87, 313–327.
- SIKIRIĆ, P., K. GYIRES, S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, I. ROTKVIĆ, B. TURKOVIĆ, I. UDOVIČIĆ, V. JAGIĆ, B. MILDNER, M. DUVNJAK, Z. DANILOVIĆ (1993b): The effect of pentadecapeptide BPC 157 on inflammatory, non-inflammatory, direct and indirect pain and capsaicin neurotoxicity. *Inflammopharmacol.* 2, 121–127.
- SIKIRIĆ, P., S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, I. ROTKVIĆ, B. TURKOVIĆ, V. JAGIĆ, B. MILDNER, M. DUVNJAK, Ž. DANILOVIĆ, M. KOLEGA, A. SALLMANI, S. ĐAČIĆ, M. DODIG, N. LANG, J. ŠEPAROVIĆ, V. ČORIĆ, V. ŠIMIČEVIĆ, K. BULIĆ, M. VELJAČA, N. SKROZA, M. BANIĆ, T. BRKIĆ, G. BULJAT, S. MIŠE, D. LUČINGER, M. BURA (1993c): Hepatoprotective effect of BPC 157, a 15-amino acid peptide, on liver lesions induced by either restraint stress or bile duct and hepatic artery ligation or CCl₄ administration. A comparative study with dopamine agonists and somatostatin. *Life Sci.* 53, 291-296.
- SIKIRIĆ, P., A. MAROVIĆ, W. MATOZ, T. ANIĆ, G. BULJAT, D. MIKUŠ, D. STANČIĆ-ROKOTOV, J. ŠEPAROVIĆ, S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, T. ŽIGER, B. SEBEČIĆ, I. ZORIČIĆ, B. TURKOVIĆ, G. ARALICA, D. PEROVIĆ, B. DUPLANČIĆ, M. LOVRIĆ-BENČIĆ, I. ROTKVIĆ, S. MIŠE, V. JAGIĆ, V. HAHN (1993d): A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Physiol. (Paris)* 93, 505-512.
- SIKIRIĆ, P., S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, M. PETEK, R. RUČMAN, B. TURKOVIĆ, I. ROTKVIĆ, V. JAGIĆ, M. DUVNJAK, S. MIŠE, S. DJAČIĆ, J. ŠEPAROVIĆ, M. VELJAČA, A. SALLMANI, M. BANIĆ, T. BRKIĆ (1994): The beneficial effect of

- BPC 157, a 15 aminoacid peptide BPC fragment, on gastric and duodenal lesions induced by restraint stress, cysteamine and 96% ethanol in rats. A comparative study with H2 receptor antagonists, dopamine promoters and gut peptides. *Life Sci.* 54, 63–68.
- SIKIRIĆ, P., M. DUVNJAK, J. JUKIĆ, S. KRIŽANAC, S. MIŠE, M. PETEK, I. ROTKVIĆ, E. SUCHANEK, I. UDOVIČIĆ (1995): Pharmacologically active substance BPC, the process for its preparation and its use in the therapy. EP0432400 B1.
- SIKIRIĆ, P., S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, V. JAGIĆ, B. TURKOVIĆ, I. ROTKVIĆ, S. MIŠE, I. ZORIČIĆ, M. GJURAŠIN, P. KONJEVODA, J. ŠEPAROVIĆ, D. LJUBANOVIĆ, B. ARTUKOVIĆ, M. BRATULIĆ, M. TIŠLJAR, L. J. JURINA, G. BULJAT, P. MIKLIĆ, A. MAROVIĆ (1996a): The beneficial effect of a novel pentadecapeptide BPC 157 on gastric lesions induced by restraint stress, ethanol, indomethacin and capsaicin neurotoxicity. *Dig. Dis. Sci.* 41, 1604–1614.
- SIKIRIĆ, P., S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, V. JAGIĆ, B. TURKOVIĆ, I. ROTKVIĆ, S. MIŠE, I. ZORIČIĆ, J. JURINA, P. KONJEVODA, M. HANŽEVAČKI, D. LJUBANOVIĆ, J. ŠEPAROVIĆ, M. GJURAŠIN, M. BRATULIĆ, B. ARTUKOVIĆ, N. JELOVAC, G. BULJAT (1996b): Salutary and prophylactic effect of pentadecapeptide BPC 157 on acute pancreatitis and concomitant gastroduodenal lesions in rats. *Dig. Dis. Sci.* 41, 1518–1526.
- SIKIRIĆ, P., S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, V. JAGIĆ, B. TURKOVIĆ, I. ROTKVIĆ, S. MIŠE, I. ZORIČIĆ, P. KONJEVODA, D. PEROVIĆ, V. ŠIMIČEVIĆ, J. ŠEPAROVIĆ, M. HANŽEVAČKI, D. LJUBANOVIĆ, B. ARTUKOVIĆ, M. BRATULIĆ, M. TIŠLJAR, B. REKIĆ, M. GJURAŠIN, P. MIKLIĆ, G. BULJAT (1997a): Pentadecapeptide BPC 157 positively affects both nonsteroidal anti-inflammatory agent induced gastrointestinal lesions and adjuvant arthritis in rats. *J Physiol Paris* 91, 113-122.
- SIKIRIĆ, P., S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, V. JAGIĆ, B. TURKOVIĆ, I. ROTKVIĆ, S. MIŠE, I. ZORIČIĆ, P. KONJEVODA, D. PEROVIĆ, L. JURINA L, J. ŠEPAROVIĆ, M. HANŽEVAČKI, B. ARTUKOVIĆ, M.

- BRATULIĆ, M. TIŠLJAR, M. GJURAŠIN, P. MIKLIĆ, D. STANČIĆ-ROKOTOV, Z. SLOBODNJAK, N. JELOVAC, A. MAROVIĆ (1997b): The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. *Eur. J. Pharmacol.* 332, 23-33.
- SIKIRIĆ, P., M. DUVNJAK, Ž. GRABAREVIĆ, B. MILDNER, S. MIŠE, M. PETEK, I. ROTKVIĆ, S. SEIWERTH, E. SUCHANEK, B. TURKOVIĆ, I. UDOVIČIĆ (1997c): Peptides with organo-protective activity, the process for preparing them and their use in therapy. EP0572688 B1.
- SIKIRIĆ, P. (1999a) The pharmacological properties of the novel peptide BPC 157 (PL-10). *Inflammopharmacology* 7, 1-14.
- SIKIRIĆ, P., A. MAROVIĆ, W. MATOZ, T. ANIĆ, G. BULJAT, D. MIKUŠ, D. STANČIĆ-ROKOTOV, J. ŠEPAROVIĆ, S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, T. ŽIGER, B. SEBEČIĆ, I. ZORIČIĆ, B. TURKOVIĆ, G. ARALICA, D. PEROVIĆ, B. DUPLANČIĆ, M. LOVRIĆ-BENČIĆ, I. ROTKVIĆ, S. MIŠE, V. JAGIĆ, V. HAHN (1999b): A behavioural study of the effect of pentadecapeptide BPC 157 in Parkinson's disease models in mice and gastric lesions induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Physiol. (Paris)* 93, 505-512.
- SIKIRIĆ, P., J. ŠEPAROVIĆ, T. ANIĆ, G. BULJAT, D. MIKUŠ, S. SEIWERTH, Ž. GRABAREVIĆ, D. STANČIĆ-ROKOTOV, B. PIGAC, M. HANŽEVAČKI, A. MAROVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, I. ZORIČIĆ, T. ŽIGER, G. ARALICA, P. KONJEVODA, I. PRKAČIN, M. GJURAŠIN, P. MIKLIĆ, B. ARTUKOVIĆ, M. TIŠLJAR, M. BRATULIĆ, S. MIŠE, I. ROTKVIĆ (1999c): The effect of pentadecapeptide BPC 157, H2-blockers, omeprazole and sucralfate on new vessels and new granulation tissue formation. *J Physiol Paris.* 93, 479-485.
- SIKIRIĆ, P., J. ŠEPAROVIĆ, G. BULJAT, T. ANIĆ, D. STANČIĆ-ROKOTOV, D. MIKUŠ, A. MAROVIĆ, I. PRKAČIN, B. DUPLANČIĆ, I. ZORIČIĆ, G. ARALICA, M. LOVRIĆ-BENČIĆ, T. ŽIGER, D. PEROVIĆ, I. ROTKVIĆ, S. MIŠE, M. HANŽEVAČKI, V. HAHN, S. SEIWERTH, B. TURKOVIĆ, Ž. GRABAREVIĆ, M. PETEK, R. RUČMAN (2000): The antidepressant effect of an antiulcer

- pentadecapeptide BPC 157 in Porsolt's test and chronic unpredictable stress in rats. A comparison with antidepressants. *J. Physiol. (Paris)* 94, 99-104.
- SIKIRIĆ, P., N. JELOVAC, A. JELOVAC-GJELDUM, G. DODIG, M. STAREŠINIĆ, T. ANIĆ, I. ZORIČIĆ, D. PEROVIĆ, G. ARALICA, G. BULJAT, I. PRKAČIN, M. LOVRIĆ-BENČIĆ, J. ŠEPAROVIĆ, S. SEIWERTH, R. RUČMAN, M. PETEK, B. TURKOVIĆ, T. ŽIGER (2001): Anxiolytic effect of BPC-157, a gastric pentadecapeptide: shock probe/burying test and light/dark test. *Acta Pharmacol Sin.* 22, 225-30.
- SIKIRIĆ, P., N. JELOVAC, A. JELOVAC-GJELDUM, G. DODIG, M. STAREŠINIĆ, T. ANIĆ, I. ZORIČIĆ, D. RAK, D. PEROVIĆ, G. ARALICA, G. BULJAT, I. PRKAČIN, M. LOVRIĆ-BENČIĆ, J. ŠEPAROVIĆ, S. SEIWERTH, R. RUČMAN, M. PETEK, B. TURKOVIĆ, T. ŽIGER, A. BOBAN-BLAGAIĆ, V. BEDEKOVIĆ, A. TONKIĆ, S. BABIĆ (2002): Pentadecapeptide BPC 157 attenuates chronic amphetamine-induced behavior disturbances. *Acta. Pharmacol. Sin.* 23, 412-422.
- SIKIRIĆ, P., S. SEIWERTH, L. BRČIĆ, M. SEVER, R. KLIČEK, B. RADIĆ, D. DRMIĆ, S. ILIĆ, D. KOLENC (2010) Revised Robert's Cytoprotection and Adaptive Cytoprotection and Stable Gastric Pentadecapeptide BPC 157. Possible Significance and Implications for Novel Mediator. *Curr. Pharm. Des.* 16, 1-11.
- SIKIRIĆ, P, S. SEIWERTH, R. RUČMAN, B. TURKOVIĆ, D.S. ROKOTOV, L. BRČIĆ, M. SEVER, R. KLIČEK, B. RADIĆ, D. DRMIĆ, S. ILIĆ, D. KOLENC, H. VRČIĆ, B. SEBEČIĆ (2011): Stable gastric pentadecapeptide BPC 157: novel therapy in gastrointestinal tract. *Curr. Pharm. Des.* 17, 1612-32.
- SNYDER, S. H. (1992): Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science.* 257, 494-496.
- SONSALLA, P. K., R. E. HEIKKILA (1988): Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine - MPTP. and methamphetamine in several strains of mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 12, 345-354.
- SONSALLA, P. K., N. D. JOCHNOWITZ, G. D. ZEEVALK, J. A. OOSTVEEN, E. D. HALL (1996): Treatment of mice with METH produces cell loss in the substantia nigra. *Brain Res.* 738, 172-175.

- SREBRO, B., S. A. LORENS (1975): Behavioural effects of selective midbrain raphe lesions in the rat. *Brain Res.* 89, 303–325.
- STEPHANS, S. E., B. K. YAMAMOTO (1994): Methamphetamine-induced neurotoxicity: roles for glutamate and dopamine efflux. *Synapse* 17, 203-209.
- STANČIĆ - ROKOTOV, D., Z. SLOBODNJAK, J. ARALICA, G. ARALICA, D. PEROVIĆ, M. STAREŠINIĆ, M. GJURAŠIN, T. ANIĆ, I. ZORIČIĆ, G. BULJAT, I. PRKAČIN, P. SIKIRIĆ, S. SEIWERTH, R. RUČMAN, M. PETEK, B. TURKOVIĆ, N. KOKIĆ, V. JAGIĆ, A. BOBAN -BLAGAIĆ (2001): Lung lesions and anti-ulcer agents beneficial effect: Anti-ulcer agents pentadecapeptide BPC 157, ranitidine, omeprazole and atropine ameliorate lung lesion in rats. *J. Phys.* 95, 303–308.
- STAREŠINIĆ, M., B. SEBEČIĆ, L. PATRLJ, S. JADRIJEVIĆ, S. SUKANIĆ, D. PEROVIĆ, G. ARALICA, N. ŽARKOVIĆ, S. BOROVIĆ, M SRDJAK, K. HAJDAREVIĆ, M. KOPLJAR, L. BATELJA, A. BOBAN - BLAGAIĆ, I. TURČIĆ, . ANIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2003): Gastric pentadecapeptide BPC 157 accelerates healing of transected rat Achilles tendon and in vitro stimulates tendocytes growth. *J. Orthop. Res.* 21, 976-983.
- STEPHANS, S. E., B. K. YAMAMOTO (1994): Methamphetamine-induced neurotoxicity: roles for glutamate and dopamine efflux. *Synapse* 17, 203–209.
- SZABO, S., J. L. NEUMEYER (1983). Dopamine agonists and antagonists in duodenal ulcer disease, U: Kaiser C., Keabian W. (Eds.), ACS Symposium Series, American Chemical Society Publications, Washington, 175–196.
- ŠEBEČIĆ, B., V. NIKOLIĆ, P. SIKIRIĆ, S. SEIWERTH, T. ŠOŠA, L. PATRLJ, Ž. GRABAREVIĆ, R. RUČMAN, M. PETEK, P. KONJEVODA, S. JADRIJEVIĆ, D. PEROVIĆ, M. ŠLAJ (1999): Osteogenic effect of a gastric pentadecapeptide, BPC 157, on the healing of segmental banded defect in rabbits: A comparison with bone marrow and autologous cortical bone implantation. *Bone* 24, 195-202.
- ŠKORJANEC, S., Z. DOLOVSKI, I. KOČMAN, L. BRČIĆ, A. BLAGAIĆ BOBAN, L. BATELJA I SUR. (2009): Therapy for unhealed gastrocutaneous fistulas in rats as a model for analogous healing of persistent skin wounds and persistent gastric ulcers:

- stable gastric pentadecapeptide BPC 157, atropine, ranitidine, and omeprazole. *Dig. Dis. Sci.* 54, 46-56.
- TAKAGI, S., N. HAYAKAWA, H. KIMOTO, H. KATO, T. ARAKI (2007): Damage to oligodendrocytes in the striatum after MPTP neurotoxicity in mice. *J. Neural. Transm.* 114, 1553-1557.
- TAYLOR, J. L., A. K. RAJBHANDARI, K. C. BERRIDGE, J. W. ALDRIDGE (2010): Dopamine receptor modulation of repetitive grooming actions in the rat: potential relevance for Tourette syndrome. *Brain Res.* 1322, 92-101.
- THOMAS, D. M., P. D. WALKER, J. A. BENJAMINS, T. J. GEDDES, D. M. KUHN (2004): Methamphetamine neurotoxicity in dopamine nerve endings of the striatum is associated with microglial activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 311, 1-7.
- TKALČEVIĆ, V. I., S. CUZIĆ, K. BRAJŠA, B. MILDNER, A. BOKULIĆ, K. ŠITUM, D. PEROVIĆ, I. GLOJNARIĆ, M. J. PARNHAM (2007): Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. *Eur. J. Pharmacol.* 570, 212-221.
- TRULSON, M. E., B. L. JACOBS (1979): Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioural arousal. *Brain Res.* 163, 135.
- TRUONG, J. G., D. G. WILKINS, J. BAUDYS, D. J. CROUCH, K. L. JOHNSON-DAVIS, J. W. GIBB, G. R. HANSON, A. E. FLECKENSTEIN (2005): Age-dependent methamphetamine-induced alterations in vesicular monoamine transporter-2 function: implications for neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1087–1092.
- TUDOR, M., I. JANDRIĆ, A. MAROVIĆ, M. GJURASIN, D. PEROVIĆ, B. RADIĆ, A. BOBAN BLAGAIĆ, D. KOLENC, L. BRČIĆ, K. ŽARKOVIĆ, S. SEIWERTH, P. SIKIRIĆ (2010): Traumatic brain injury in mice and pentadecapeptide BPC 157 effect. *Regul. Pept.* 160, 26-32.
- TOHYAMA, Y., P. SIKIRIC, M. DIKSIC (2004): Effects of pentadecapeptide BPC157 on regional serotonin synthesis in the rat brain: α -methyl-L-tryptophan autoradiographic measurements. *Life Sci.* 76, 345-357.

- UHL, G. R., D. WALTHER, D. MASH, B. FAUCHEUX, F. JAVOY-AGID (1994): Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson`s disease and control substantia nigra neurons. *Ann. Neurol.* 35, 494 – 498.
- URED UJEDINJENIH NARODA ZA DROGU I KRIMINAL (2007): World drug report. Analysis. Vol. 1. Vienna: United Nations Office on Drugs and Crime.
- URIST, M. R. (1996): The first three decades of bone morphogenetic protein. *Osteologie* 4, 207-33.
- VELJAČA, M., K. CHAN, A. GUGLIETTA (1995): Digestion of h-EGF, h-TGF alpha and BPC-15 in human gastric juice. *Gastroenterology* 108, A761.
- VELJAČA, M, KRNIC Z, BRAJSA K, MILDNER B, PAVIC-SLADOJEV D, SEVELJEVIC-JARAN D, KOLEGA M, ERCEG D, KRZNNARIC Z. (2002): The development of PL 14736 for treatment of inflammatory bowel disease. IUPHAR-GI Section Symposium, Honolulu, Hawaii, pp. 13-15, O-32.
- VITEK, J. L. (2002): Deep brain stimulation for Parkinson's disease. A critical re-evaluation of STN versus GPi DBS. *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 78, 119-31.
- VLIEGHE, P., V. LISOWSKI, J. MARTINEZ, M. KHRESTCHATISKY (2010): Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today* 15, 40-56.
- WAGNER, G.C., G. A. RICAURTE, L. S. SEIDEN, C. R. SCHUSTER, R. J.MILLER, J. WESTLEY (1980): Long-lasting depletions of striatal dopamine and loss of dopamine uptake sites following repeated administration of methamphetamine, *Brain Res.* 181, 151–160.
- WAGNER, G.C. , L.S. SEIDEN, C.R. SCHUSTER (1979): Methamphetamine induced changes in brain catecholamines in rats and guinea pigs, *Drug Alcohol. Depend.* 4, 435–438.
- WALKER, F.O. (2007): Huntington's disease. *Lancet* 369, 218–228.
- WALLACE, T. L., G. A. GUDELSKY, C. V . VORHEES (2001): Neurotoxic regimen of methamphetamine produces evidence of behavioral sensitization in the rat. *Synapse* 39, 1-7.

- WALLACE, T. L., G. A. GUDELSKY, C. V. VORHEES (1999): Methamphetamine-Induced Neurotoxicity Alters Locomotor Activity, Stereotypic Behavior, and Stimulated Dopamine Release in the Rat. *J. Neurosci.* 19, 9141–9148.
- WANG, Q., E. J. SHIN, X. K. NGUYEN, Q. LI, J. H. BACH, G. BING, W. K. KIM, H. C. KIM, J. S. HONG (2012): Endogenous dynorphin protects against neurotoxin-elicited nigrostriatal dopaminergic neuron damage and motor deficits in mice. *J. Neuroinflammation* 9, 124. Doi: 10.1186/1742-2094-9-124.
- WARREN, M. W., F. H. KOBEISSY, M. C. LIU, R. L. HAYES, M. S. GOLD, K. K. WANG (2005): Concurrent calpain and caspase-3 mediated proteolysis of alpha II-spectrin and tau in rat brain after methamphetamine exposure: a similar profile to traumatic brain injury. *Life Sci.* 78, 301–309.
- WARREN, M. W., S. F. LARNER, F. H. KOBEISSY, C. A. BREZING, J. A. JEUNG, R. L. HAYES, M. S. GOLD, K. K. WANG (2007): Calpain and caspase proteolytic markers co-localize with rat cortical neurons after exposure to methamphetamine and MDMA. *Acta Neuropathol.* 114, 277–286.
- WEIHMULLER, F. B., M. HADJICONSTANTINOPOULOS, J.P. BRUNO (1989): Dissociation between biochemical and behavioral recovery in MPTP-treated mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34, 113-117.
- WEISER, S. D., S. L. PATRICK, S. W. MASCARELLA, J. DOWNING-PARK, X. BAI, F. I. CARROLL, J. M. WALKER, R. L. PATRICK (1995): Stimulation of rat striatal tyrosine hydroxylase activity following intranigral administration of sigma receptor ligands. *Eur. J. Pharmacol.* 275, 1-7.
- WELLS, P.G., G.P. MCCALLUM, K.C. LAM, J.T. HENDERSON, S.L. ONDOVCIK (2010): Oxidative DNA damage and repair in teratogenesis and neurodevelopmental deficits. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 90, 103-9.
- WHISHAW, I. Q., B. GORNY, J. SARNA (1998): Paw and limb use in skilled and spontaneous reaching after pyramidal tract, red nucleus and combined lesions in the rat: behavioral and anatomical dissociations. *Behav. Brain Res.* 93, 167-183.

- WHISHAW, I. Q., B. KOLB (1987): Sparing of skilled forelimb reaching and corticospinal projections after neonatal motor cortex removal or hemidecortication in the rat: Support for the Kennard doctrine. *Brain Res.* 541, 97-114.
- WHISHAW, I. Q., W. T. O'CONNOR, S. B. DUNNETT (1986): The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putmen to skilled forelimb use in rat. *Brain* 109, 805-843.
- WILLIAMS, J. H., E. C. AZMITIA (1981): Hippocampal serotonin re-uptake and nocturnal locomotor activity after microinjections of 5,7-DHT in the fornix-fimbria. *Brain Res.* 207, 95–107.
- YAMAMOTO, B. K., W. ZHU (1998): The effects of methamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 107–114.
- YANG, W., S. HEKIMI (2010): A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Biology* 8(12): e1000556. doi:10.1371/journal.pbio.1000556.

9. Životopis autorice s popisom objavljenih radova

Jelena Šuran je rođena 13. lipnja 1983. u Puli gdje je završila osnovnu školu i maturirala u Općoj gimnaziji. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2001. godine, a diplomirala je u veljači 2008. godine sa temom „Dušik (II) oksid – pleotropna molekula“. Iste godine u ožujku zaposlila se kao znanstveni novak na projektu MZOS-a „Imunomodulacijsko djelovanje levamisola kod svinja“ voditelja prof. dr. sc. Frane Božića na Zavodu za farmakologiju i toksikologiju. Nedugo nakon toga, u kolovozu iste godine, izabrana je u zvanje asistenta na istom Zavodu. U travnju 2011. godine započela je suradnju sa prof.dr. sc. Predragom Sikirićem na projektu „Pentadekapeptid BPC 157 – daljnja istraživanja“ i u sklopu tog projekta provela pokuse opisane u ovoj disertaciji.

Popis izvornih radova objavljenih u CC časopisima:

ŠURAN, J., D. FLAJS, M. PERAICA, A. PREVENDAR CRNIĆ, M. ŠPERANDA, F. BOŽIĆ (2013): Pharmacokinetics of an immunomodulating dose of levamisole in weaned pigs. *Acta Vet. Hung.* Doi: 10.1556/AVet.2013.020

SIKIRIĆ, P., S. SEIWERTH, R. RUČMAN, B. TURKOVIĆ, D. S. ROKOTOV, L. BRČIĆ, M. SEVER, R. KLIČEK, B. RADIĆ, D. DRMIĆ, S. ILIĆ, D. KOLENC, G. ARALICA, H. SAFIC, J. ŠURAN, D. RAK, S. DŽIDIĆ, H. VRČIĆ, B. SEBEČIĆ (2013): Toxicity by NSAIDs. Counteraction by stable gastric pentadecapeptide BPC 157. *Curr. Pharm. Des.* 19, 76-83.

ŠURAN, J., M. PRIŠĆ, D. RAŠIĆ, E. SREBOČAN, A. PREVENDAR CRNIĆ (2013): Malondialdehyde and heavy metal concentrations in tissues of wild boar (*Sus scrofa* L.) from central Croatia. *J. Environ. Sci. Health B* 48, 147-152.

RELJIĆ, S., E. SREBOČAN, Đ. HUBER, J. KUSAK, J. ŠURAN, S. BRZICA, S. CUKROV, A. PREVENDAR CRNIĆ (2012): A case of a brown bear poisoning with carbofuran in Croatia. *Ursus.* 1, 86-90.

ŠUŠNIĆ, V., D. SAKAR, J. ŠURAN, J. POMPE-GOTAL, S. ŠUŠNIĆ, M. ČOKLO, M. TELEŽAR, D. TOMIĆ LINŠAK, V. MIĆOVIĆ, A. PREVENDAR CRNIĆ (2012): Residues of Lindane in Adipose Tissue of Lambs and Sheep from Islands Krk and Cres. *Coll. Antropol.* 36, 647 -650.

VALPOTIĆ, H., J. ŠURAN, A. PREVENDAR CRNIĆ, M. ŠPERANDA, M. ĐIDARA, I. I. VALPOTIĆ, F. BOŽIĆ, (2009): Stimulation by levamisole of cell-mediated immunity in weaned pigs. Italian journal of animal science 8, Suppl. 3; 122-124.

Popis radova objavljenih u drugim časopisima:

ŠURAN, J., M. SINDIČIĆ (2012): Homeopatija u veterinarskoj medicini. Veterinaria 61, 1-2, 93-101.

BOŽIĆ, F., F. BANOVIĆ, J. ŠURAN, A. PREVENDAR CRNIĆ (2011): Adjuvant activity of levamisole for experimental F18ac+ Escherichia coli oral vaccine against porcine post-weaning colibacillosis. Vet. arhiv 81, 2, 199-209.

PREVENDAR CRNIĆ, A., J. POMPE-GOTAL, F. BOŽIĆ, J. ŠURAN, R. VELEV, D. SAKAR (2009): The effect of chloramphenicol on hepatic biotransformation enzyme activity and on the duration of pentobarbital or ketamine/xylazine anesthesia in guinea pigs (*Cavia porcellus*). Vet. arhiv 79, 385-396.