

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nikola R. Tatalović

**REDOKS-POSREDOVANI MEHANIZMI
FARMAKOLOŠKIH EFEKATA IBOGAINA NA ŽENKE
PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nikola R. Tatalović

**REDOX-MEDIATED MECHANISMS OF IBOGAIN
PHARMACOLOGICAL EFFECTS ON FEMALE RATS**

doctoral dissertation

Belgrade, 2024

Podaci o mentorima i članovima komisije

Mentor: dr Duško Blagojević, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Komentor: dr Siniša Đurašević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

1. dr Tanja Jevđović, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet
2. dr Zorana Oreščanin Dušić, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
3. dr Teodora Vidonja Uzelac, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane_____

ZAHVALNICA

Ova disertacija je urađena na Univerzitetu u Beogradu, Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru **dr Dušku Blagojeviću** koji je osmislio temu i rukovodio izradom i pisanjem ove doktorske disertacije.

Takođe se zahvaljujem komentoru **prof. Siniši Đuraševiću** i članicama komisije **doc. Tanji Jevđović, dr Zorani Oreščanin Dušić** i **dr Teodori Vidonji Uzelac** na konstruktivnim savetima tokom pisanja i pomoći da doktorska disertacija dobije ovaj oblik.

Zahvaljujem se neposrednim saradnicima iz Odeljenja za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ koji su učestvovali u izradi ove disertacije: **prof. Mihajlu Spasiću, dr Aleksandri Nikolić Kokić, dr Ani Mijušković, Tanji Grahovac**, kao i već pomenutim **dr Zorani Oreščanin Dušić** i **dr Teodori Vidonji Uzelac**.

Zahvaljujem se i ostalim saradnicima koji su pomogli u izradi ili pisanju ove disertacije: **prof. Milici Mijović**, Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici; **prof. Mari Bresjanec**, Institut za patološko fiziologiju, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani; **prof. Gordani Koželj**, Institut za sodno medicinu, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani; **prof. Slobodanu Milovanoviću** i **prof. Dragani Drakul**, Katedra za farmakologiju, Medicinski fakultet Foča, Univerzitet u Istočnom Sarajevu; **dr Jeleni Nestorov** i **dr Đurđici Ignjatović**, Odeljenje za biohemiju, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“; **dr Ivani Guševac Stojanović**, Laboratorija za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Institut za nuklearne nauke Vinča, Univerzitet u Beogradu; **dr Ireni Hribšek**, Odeljenje za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“; **dr Mileni Dimitrijević**, Odsek za nauke o živim sistemima, Institut za multidisciplinarna istraživanja, Univerzitet u Beogradu; **dr Marku Mitroviću**, Katedra za radiologiju i radijacionu higijenu, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; i **dr Marini Ninkov**, Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario.

Takođe se zahvaljujem na pomoći koleginicama i kolegama iz Odeljenja za citologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, pre svih **dr Marku Mileru** i **dr Ivani Jarić**.

Najveću zahvalnost dugujem porodici.

Redoks-posredovani mehanizmi farmakoloških efekata ibogaina na ženke pacova

Rezime

Ibogain je indolni alkaloid izolovan iz korena iboge (*Tabernanthe iboga* Baill.) koji se u alternativnoj medicini koristi kao antiadiktivni agens čija je upotreba povezana sa rizicima koji uključuju aritmije sa smrtnim ishodom. Pored neposrednih farmakoloških efekata koji se ostvaruju interakcijom sa više tipova receptora, ibogain još uvek nepoznatim mehanizmom dovodi do pražnjenja ATP rezervi, povećanja stope energetskog metabolizma i stvaranja ROS, kao i do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima. Cilj ove disertacije je bio da kombinacijom *in vivo* (*per os*) tretmana i *ex vivo* eksperimenata na izolovanim organima utvrdi vrstu i mehanizme fiziološke reaktivnosti ibogaina, i eventualne ROS posredovane efekte. Pošto su biološka dostupnost ibogaina i efekti na nivou CNS veći kod ženki nego kod mužjaka, eksperimenti u ovoj disertaciji su izvedeni na ženkama. Pokazano je da *per os* tretman ima umeren glikogenolitički efekat u jetri. Promene u redoks ravnoteži su izrazito tkivno specifične bez jasne dozne (1 ili 20 mg/kg) ili vremenske (6 ili 24 sata) zavisnosti. Ibogain izaziva akutnu nekrozu kardiomiocita koja bi mogla da bude uzrok potencijalno fatalnih aritmija. Mehanizam delovanja ibogaina na fiziološkom nivou nije direktno povezan sa promenom koncentracije ATP, već uključuje dominantno interakciju sa receptorima: farmakološki efekti na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusu se ostvaruju interakcijom sa 5-HT receptorima, dok su promene u aktivnosti antioksidativnih enzima posredovane β -adrenergičkim receptorima i K_{ATP} kanalima. Njihova blokada sprečava porast aktivnosti antioksidativnih enzima. Iako smatran generalnim pro-antioksidantom, efekti ibogaina su izrazito tkivno specifični i zavise od zastupljenosti receptora preko kojih ibogain ostvaruje svoje efekat.

Ključne reči: noribogain, glikogenoliza, kardiotoksična nekroza, vazodilatacija, ATP, H_2O_2 , katalaza, 5-HT receptori, β -adrenergički receptori, K_{ATP} kanali

Naučna oblast: biologija

Uža naučna oblast: fiziologija

Redox-mediated mechanisms of ibogaine pharmacological effects on female rats

Abstract

Ibogaine is an indole alkaloid isolated from the iboga root (*Tabernanthe iboga* Baill.) and is used in alternative medicine as an anti-addictive drug whose use is associated with risks such as fatal cardiac arrhythmia. In addition to the direct pharmacological effects achieved through interaction with different types of receptors, ibogaine leads to the depletion of ATP reserves, an increase in the rate of energy metabolism and the formation of ROS, and an increase in the activity of antioxidant enzymes via an as yet unknown mechanism. The aim of this dissertation was to determine the nature and mechanisms of the physiological reactivity of ibogaine and possible ROS-mediated effects by a combination of *in vivo* treatment (*per os*) and *ex vivo* experiments on isolated organs. Since the bioavailability of ibogaine and the effects at the CNS level are greater in females than in males, the experiments in this dissertation were performed in females. *Per os* treatment was shown to have a moderate glycogenolytic effect in the liver. The changes in redox balance are highly tissue specific, with no clear dose (1 or 20 mg/kg) or time (6 or 24 hours) dependence. Ibogaine causes acute necrosis of cardiomyocytes, which could be the cause of potentially fatal cardiac arrhythmias. The mechanism of action of ibogaine at the physiological level is not directly related to the change in ATP concentration, but mainly involves interaction with receptors: pharmacological effects on the contractile activity of the isolated uterus are achieved through interaction with 5-HT receptors, while changes in the activity of antioxidant enzymes are mediated by β -adrenergic receptors and K_{ATP} channels. Their blockade prevents the increase in antioxidant enzyme activity. Although it is considered a general pro-antioxidant, the effects of ibogaine are very tissue-specific and depend on the presence of the receptors through which ibogaine achieves its effects.

Key words: noribogain, glycogenolysis, cardiotoxic necrosis, vasodilation, ATP, H_2O_2 , catalase, 5-HT receptors, β -adrenergic receptors, K_{ATP} channels

Scientific field: biology

Specific scientific field: physiology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Energetski metabolizam, reaktivne vrste kiseonika i redoks ravnoteža	1
1.1.1. Nastajanje ROS u živim sistemima.....	1
1.1.2. Uklanjanje viška ROS	3
1.1.3. Oksidativni stres i indikatori oksidativnog oštećenja.....	6
1.2. Ibogain	8
1.2.1. Etnofarmakologija.....	8
1.2.2. Savremena upotreba.....	8
1.2.3. Farmakokinetika	10
1.2.4. Farmakodinamika	11
1.2.5. Efekti na energetski metabolizam i redoks ravnotežu.....	13
1.3. Eksperimentalni modeli	15
1.3.1. <i>In vivo</i>	15
1.3.2. <i>Ex vivo</i>	15
1.3.2.1. Glatki mišići	16
1.3.2.2. Izolovane arterije	21
1.3.2.3. Izolovani uterus	21
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	23
3. MATERIJAL I METODE.....	25
3.1. Laboratorijske životinje	25
3.1.1. Određivanje faze estrusnog ciklusa.....	25
3.2. Hemikalije.....	25
3.3. <i>In vivo</i> eksperiment	25
3.3.1. Dizajn eksperimenta.....	26
3.3.2. Potrošnja vode i hrane.....	27
3.3.3. Izolovanje tkiva	27
3.3.4. Razdvajanje plazme i eritrocita	27
3.3.5. Merenje koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi.....	27
3.3.6. Priprema tkiva za merenje aktivnosti enzima.....	27
3.3.7. Priprema tkiva za merenje koncentracije TBARS i slobodnih –SH grupa	28
3.3.8. Merenje koncentracije proteina u uzorcima tkiva	28
3.3.9. Merenje koncentracije hemoglobina u hemolizatima eritrocita.....	28
3.3.10. Uklanjanje hemoglobina iz hemolizata eritrocita.....	28
3.3.11. Merenje aktivnosti enzima	28

3.3.12.	Merenje koncentracije TBARS	29
3.3.13.	Merenje koncentracije neproteinskih i slobodnih proteinskih –SH grupa	29
3.3.14.	Priprema tkiva za histološku analizu	30
3.3.15.	Histohemijska bojenja	30
3.3.16.	Histopatološki pregled jetre, bubrega i srca	30
3.3.17.	Procena količine glikogena u jetri	30
3.3.18.	Merenje koncentracije glukoze u krvi	31
3.3.19.	Analiza urina	31
3.4.	<i>Ex vivo</i> eksperimenti.....	31
3.4.1.	Izolovane arterije	31
3.4.2.	Izolovani uterus	32
3.5.	Statistička obrada rezultata	33
4.	REZULTATI.....	34
4.1.	Sistemske efekte <i>per os</i> tretmana jediničnom dozom ibogaina.....	34
4.1.1.	Biološka raspoloživost u plazmi	34
4.1.2.	Količina konzumirane vode i hrane.....	34
4.1.3.	Koncentracija glukoze u krvi.....	35
4.1.4.	Analiza urina	35
4.1.5.	Eritrociti.....	37
4.1.6.	Jetra	39
4.1.7.	Bubrezi.....	46
4.1.8.	Srce.....	50
4.1.9.	Ileum	55
4.1.10.	Uterus.....	58
4.1.11.	Pluća.....	61
4.1.12.	Slezina	64
4.1.13.	Mozak.....	66
4.2.	Vazoaktivna svojstva ibogaina.....	69
4.2.1.	Efekte ibogaina na tonus izolovanih krvnih sudova	69
4.2.2.	Efekte ATP na tonus izolovanih krvnih sudova.....	73
4.3.	Efekte ibogaina na kontraktilnu aktivnost i ROS/AOS/redoks homeostazu izolovanog uterusa	75
4.3.1.	Stimulacija i inhibicija kontraktilne aktivnosti izolovanog uterusa rastućim koncentracijama ibogaina	75
4.3.2.	Uloga 5-HT receptora, ATP i H ₂ O ₂	75
4.3.3.	Uloga β-adrenergičkih receptora i K _{ATP} kanala u efektima ibogaina na kontraktilnu aktivnost uterusa	82

4.3.4. Uloga β -adrenergičkih receptora i K_{ATP} kanala u efektima ibogaina na aktivnost antioksidativnih enzima	87
5. DISKUSIJA	93
6. ZAKLJUČCI	106
7. LITERATURA	108
Prilog 1	128
Prilog 2	129
Prilog 3	130

1. UVOD

1.1. Energetski metabolizam, reaktivne vrste kiseonika i redoks ravnoteža

Ćelijsko disanje je proces u kom žive ćelije obezbeđuju neophodnu hemijsku energiju putem oksidacije organskih jedinjenja. Organski molekuli, uglavnom ugljeni hidrati i masti, se razlažu nizom enzimski katalizovanih reakcija, a oslobođena energija se prevodi u energiju fosfatnih veza adenzin trifosfata (ATP). ATP je prisutan u svim živim ćelijama i služi kao univerzalni izvor energije za procese u kojima se energija troši. Energija se iz ATP oslobađa defosforilacijom do adenzin difosfata (ADP) koji ponovo može da se fosforiliše do ATP u procesu ćelijskog disanja. U početnim fazama ćelijskog disanja, glikolizi i ciklusu trikarboksilnih kiselina, glukoza i drugi metabolički supstrati se oksiduju što je povezano sa hemijskom redukcijom koenzima (nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+), flavin adenin dinukleotida (FAD) i flavin mononukleotida (FMN)). U završnoj fazi, oksidativnoj fosforilaciji, ATP se sintetiše od ADP i neorganskog fosfata zahvaljujući energiji i redoks potencijalu redukovanih koenzima. Takođe, u ovom procesu dolazi do četvoroelektronske sekvencijalne redukcije molekulskog kiseonika do vode.

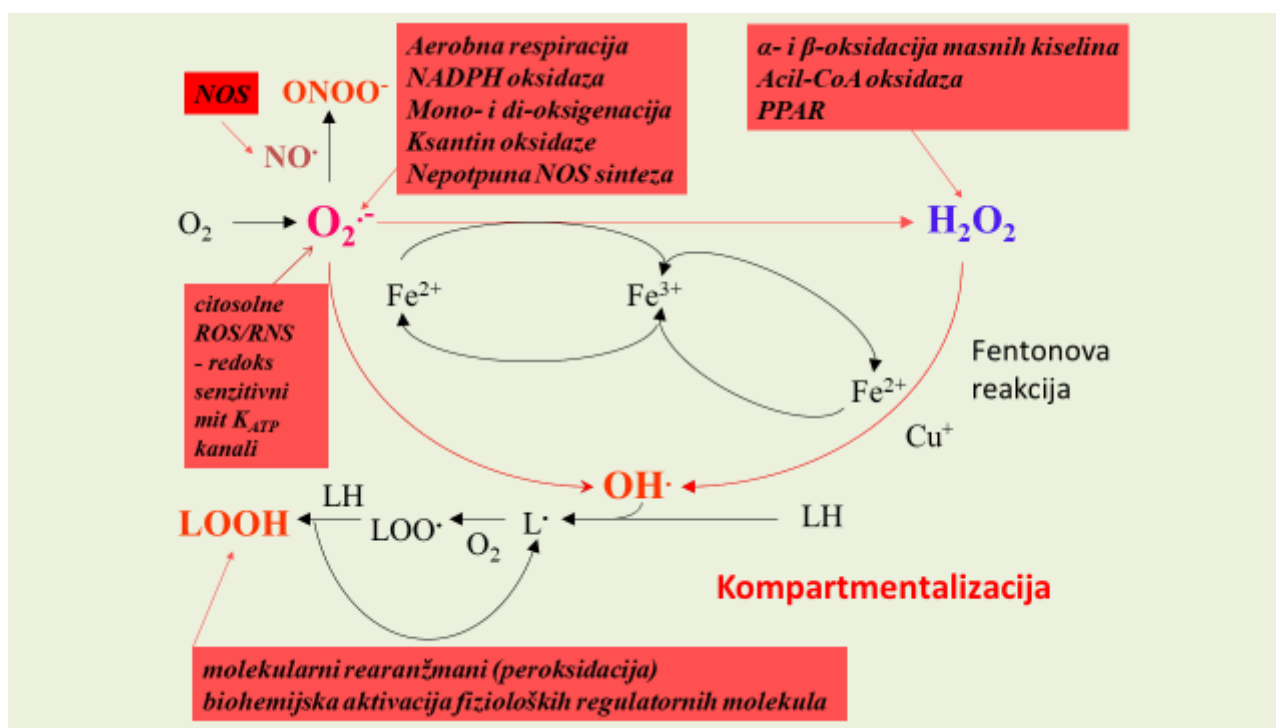
Četvorovalentnom redukcijom jednog molekula kiseonika u lancu transporta elektrona u mitohondrijama nastaju dva molekula vode. Sa druge strane, nepotpunom redukcijom kiseonika nastaju reaktivne vrste kiseonika (ROS, eng. reactive oxygen species) – reaktivna hemijska jedinjenja koja sadrže kiseonik (reaktivnija od triplet kiseonika). Jednovalentnom redukcijom nastaje superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) koji curi u matriks mitohondrija i u citoplazmu (Turrens 2003) zbog čega je aerobni energetski metabolizam neprekidni izvor reaktivnih vrsta kiseonika. Na osnovu hemijskih osobina ROS mogu da se podele na dve klase: slobodno-radikalske i neradikalske ROS. Slobodno-radikalske ROS sadrže nesparesni elektron u spoljašnjoj orbitali i pripadaju jednoelektronskim oksidantima. U ovu klasu spadaju: $\text{O}_2^{\bullet-}$, hidroksil radikal (OH^{\bullet}), azot monoksid (NO^{\bullet}), azot dioksid (NO_2^{\bullet}), karbonatni anjon radikal ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) i alkoksi i alkil peroksi radikali ($\text{RO}^{\bullet}/\text{ROO}^{\bullet}$). Reaktivne vrste kiseonika koje sadrže azot se još nazivaju reaktivnim vrstama azota (RNS). Neradikalske ROS ne sadrže nesparesni elektron i pripadaju dvoelektronskim oksidantima. U ovu klasu spadaju: vodonik peroksid (H_2O_2), peroksinitrit/peroksiiazotasta kiselina ($\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$) i hipohlorna kiselina (HOCl). Zbog prisustva nesparesnog elektrona slobodnoradikalske ROS imaju neke zajedničke osobine. Generalno su nestabilnije i reaktivnije od neradikalnih ROS i imaju tendenciju da pokreću lančane reakcije. Naime, kada slobodni radikal reaguje sa nekim stabilnim molekulom koji ne poseduje nesparesni elektron, taj molekul postaje novi slobodni radikal. Propagacija lančane reakcije traje sve dok slobodni radikal ne reaguje sa drugim slobodnim radikalom ili sa nekim fenolnim antioksidantom, kao što su vitamin E, vitamin C ili flavonoidi (Halliwell i Gutteridge 2015; Zhang i sar. 2019).

1.1.1. Nastajanje ROS u živim sistemima

Postoji pet glavnih puteva nastanka ROS (Slika 1).

Nastajanje $\text{O}_2^{\bullet-}$ — $\text{O}_2^{\bullet-}$ je obično primarna ROS koja nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika. U ovoj reakciji nastaje jon sa jednim nesparesnim elektronom i neto naelektrisanjem -1. Donor elektrona je obično redukovani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) ili redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH). Ovu reakciju katalizuju kompleksi I/II/III/IV lanca transporta elektrona u mitohondrijama, NADPH oksidaze (NOX1/2/3/5), dekuplovana azot oksid sintaza (NOS) i ksantin oksidaza (XO).

$O_2^{\bullet -}$ je slabo reaktivan radikal ($E^0 \sim 0,94$ V). Delimični uzrok takve reaktivnosti je njegovo negativno naelektrisanje koje sprečava pristup delovima molekula sa visokom gustinom negativnog naelektrisanja. Ima relativno kratak poluživot jer može brzo da dismutira do H_2O_2 , spontano ili u reakciji koju katalizuje enzim superoksid dismutaza (SOD). Zbog negativnog naelektrisanja dužina difuzije je relativno kratka (~ 320 nm). Najčešće reaguje sa NO^{\bullet} ili sa prelaznim metalima, naročito Fe-S klasterom. Kada reaguje sa NO^{\bullet} koji ima mnogo duži životni vek i veću daljinu difuzije, reakcija se obično dešava u blizini mesta na kom nastaje $O_2^{\bullet -}$. Kada reaguje sa Fe-S klasterima, dolazi do oksidacije Fe-S klastera u nestabilne klasterne sa visokom valencom koji se raspadaju i oslobađaju slobodni Fe^{2+} (Halliwell i Gutteridge 2015; Zhang i sar. 2019).



Slika 1. Glavni putevi nastanka ROS u živim sistemima (preuzeto iz prezentacije: Blagojević 2015).

Nastajanje H_2O_2 — H_2O_2 nastaje dismutacijom $O_2^{\bullet -}$ koja je pretežno enzimski katalizovana (SOD) dok se u manjoj meri dešava spontano. H_2O_2 može da nastane i u reakciji $O_2^{\bullet -}$ sa $[4Fe-4S]^{2+}$. Neke oksidaze, kao što su NOX4 i dualna oksidaza (DUOX1/2) poseduju dismutaznu aktivnost i mogu direktno da prevedu O_2 u H_2O_2 .

H_2O_2 je relativno slabo reaktivna ROS sa relativno dugim-polu životom i velikom dužinom difuzije ($\sim 1,5$ mm). H_2O_2 može da reaguje sa Fe-S klasterom, slabo vezanim metalima, glutationom, slobodnim ostacima cisteina (Cys) i nešto slabije sa slobodnim ostacima metionina (Met). Brzina reakcije sa ostacima Cys zavisi od njihove jonizacije. H_2O_2 brže reaguje sa tiolatnim anjonom ($Cys-S^-$) nego sa protonovanim oblikom ($Cys-SH$). U fiziološkim uslovima Cys ostaci su uglavnom prisutni u obliku tiolatnog anjona. Niske koncentracije H_2O_2 mogu da oksiduju $Cys-S^-$ do sulfenične kiseline ($Cys-SOH$). $Cys-SOH$ može biti redukovana do $Cys-S^-$ u prisustvu tioredoksina (TRX) i redukovanog glutationa (GSH). Pri visokim koncentracijama H_2O_2 može da ireverzibilno oksiduje $Cys-SOH$ do sulfinske ($Cys-SO_2H$) ili sulfonske kiseline ($Cys-SO_3H$). Ipak, H_2O_2 mnogo brže reaguje sa različitim peroksidazama (tiolne, selenske ili hem peroksidaze) nego sa $Cys-S^-$, tako da je delovanje H_2O_2 obično ograničeno na relativno mali prostor oko mesta njegovog nastanka. Ovakva prostorna ograničenost omogućava da H_2O_2 selektivno reaguje sa tiolnim grupama proteina koji se nalaze u istom odeljku ćelije. Kada H_2O_2 reaguje sa hem

peroksidazama (na primer mijeloperoksidazom, MPO) ili redukovanim prelaznim metalima, nastaju OH• ili neradikalne ROS kao što je HOCl (Halliwell i Gutteridge 2015; Sies 2017; Zhang i sar. 2019).

Nastajanje OH• — OH• pretežno nastaje od O₂^{•-} i H₂O₂ u Haber-Vajsovoj reakciji koja je katalizovana jonom gvožđa ili bakra. U prvom koraku O₂^{•-} oksiduje jon metala, a u drugom koraku koji se naziva Fentonova reakcija, oksidovani jon metala reaguje sa H₂O₂ i nastaju OH• i OH⁻. OH• može da nastane i homolitičkim raskidanjem kovalentne veze u molekulu ONOOH ili u reakciji između HOCl i O₂^{•-} koju katalizuje MPO. Hidroksil radikal ima izuzetno visoku reaktivnost (konstanta brzine reakcije oko 10⁹ M⁻¹s⁻¹), reaguje sa molekulima u neposrednom okruženju izazivajući njihova direktna oksidativna oštećenja.

Nastajanje L•/ LOO• — Lipidni radikali (L•) pretežno nastaju kada OH• oduzme atom vodonika molekulu lipida. L• brzo reaguje sa O₂ i nastaje lipidni peroksil radikal (LOO•) koji je umereni oksidant sposoban da oduzme atom vodonika susednom lipidu i pređe u hidroperoksid (LOOH) uz nastanak novog L•. Lančana reakcija se nastavlja do reakcije sa drugim slobodnim radikalom ili antioksidantom (Zhang i sar. 2019).

Nastajanje RNS — Sve reaktivne vrste azota potiču od NO• koji nastaje od L-arginina (L-Arg) u reakciji koju katalizuje NOS. NO• brzo reaguje sa O₂^{•-} i nastaje ONOO⁻. Brzina ove reakcije je oko 10 puta veća od dismutacije koju katalizuje SOD (Forman i Fridovich 1973; Tomasian i sar. 2000). Sa druge strane, u fiziološkim uslovima koncentracija SOD je 1000 puta veća od koncentracije NO•. Zbog toga se O₂^{•-} eliminiše pre nego što reaguje sa NO• pa ONOO⁻ može da nastane samo u patološkim uslovima (Pacher i sar. 2007).

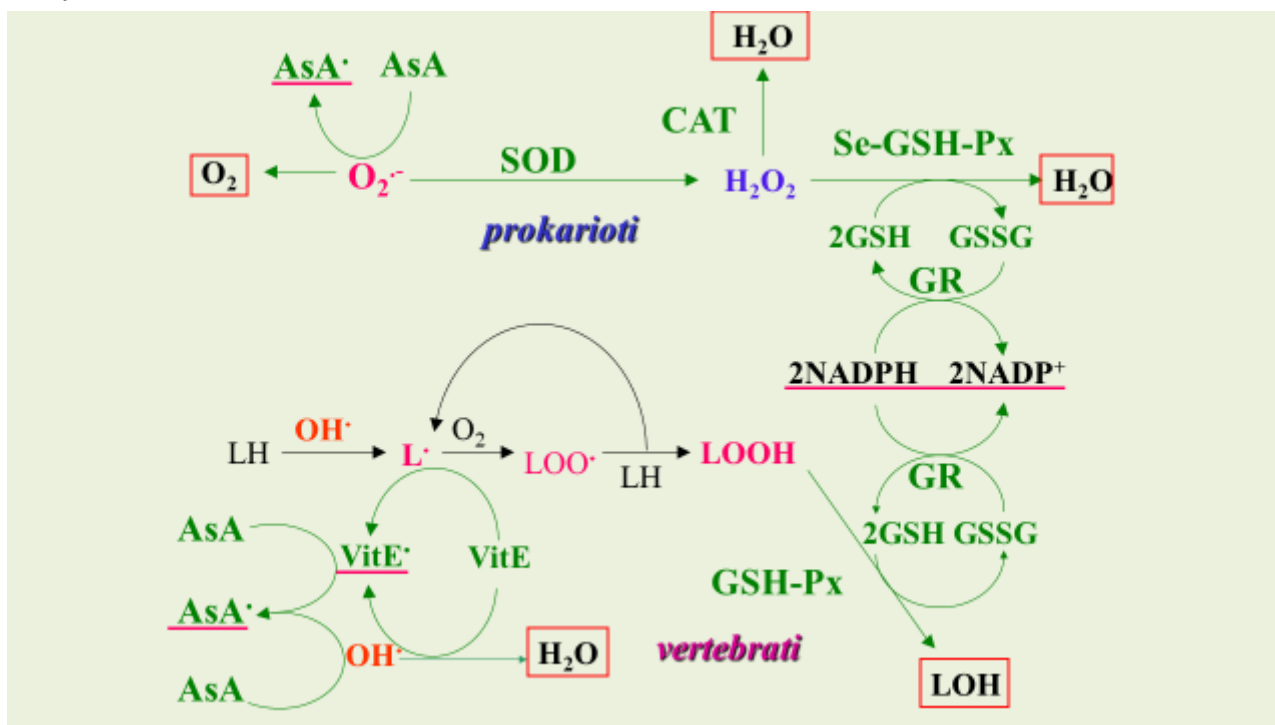
Ksantin oksidaza (XO) — XO je još jedan od izvora ROS i RNS u ćelijama sisara. Sisarska ksantin-oksidaza (XO) i ksantin-dehidrogenaza (XDH) su interkonvertibilni oblici ksantin-oksidoreduktaze (XOR). Glavne aktivnosti XOR su: 1) ksantin dehidrogenazna aktivnost (XDH) odnosno katalizovanje dva poslednja koraka u katabolizmu purina, od hipoksantina preko ksantina do mokraćne kiseline uz redukciju NAD⁺ u NADH; 2) ksantin oksidazna aktivnost (XO) pri kojoj uz katabolizam purina nastaju i ROS, odnosno O₂ se redukuje do O₂^{•-} i H₂O₂; 3) nitrit reduktazna aktivnost kojom se stvara NO•; i 4) NADPH oksidazna aktivnost pri kojoj takođe nastaju ROS. Mokraćna kiselina sa jedne strane ima proinflamatorno dejstvo ali je u isto vreme i važan neenzimski antioksidant u plazmi (Lee i sar. 2000; Halliwell i Gutteridge 2015; Bortolotti i sar. 2021).

1.1.2. Uklanjanje viška ROS

Postoji pet glavnih puteva uklanjanja viška ROS (Slika 2): 1) dismutacija O₂^{•-} do H₂O₂ koju katalizuje SOD; 2) razlaganje H₂O₂ do H₂O i O₂ koje katalizuje katalaza (CAT); 3) redoks ciklus glutaciona u kom se razlažu H₂O₂ i LOOH u reakciji koju katalizuje enzim glutation peroksidaza (GSH-Px) koji koristi GSH kao donor elektrona; 4) redoks ciklus peroksiredoksina i tioredoksina u kom se H₂O₂ redukuje do H₂O; 5) detoksikacija ksenobiotika koju katalizuje enzim glutation S-transferaza (GST) (Zhang i sar. 2019).

Superoksid dismutaze (SOD) — Ovi enzimi katalizuju reakciju dismutacije u kojoj se jedan molekul O₂^{•-} oksiduje a drugi redukuje (2O₂^{•-} + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂). Postoje tri klase SOD sa različitim tercijskim strukturama i jonima različitih metala u katalitičkom centru: CuZnSOD, MnSOD/FeSOD i NiSOD. Sve tri klase deluju po sličnom mehanizmu u kom se metal u aktivnom centru prvo redukuje pa zatim reoksiduje. Kod ljudi i ostalih sisara postoje tri tipa SOD: SOD1, SOD2 i SOD3. SOD1 se uglavnom nalazi u citosolu, endoplazmatičnom retikulumu i međumembranskom prostoru mitohondrija i osetljiva je na dejstvo cijanida. U pitanju je homodimer i spada u klasu CuZnSOD. Ekspresija SOD1 je pod kontrolom mnogih redoks zavisnih transkripcionih faktora, uključujući AP-1 i NF-κB. SOD2 se nalazi u matriksu mitohondrija,

organelama u kojima nastaje 90% ćelijskih ROS. Za razliku od SOD1 nije osetljiva na cijanid. Ima heterotetramernu građu i spada u klasu MnSOD. Ekspresija SOD2 je pod kontrolom redoks zavisnih transkripcionih faktora kao što su NF- κ B, C/EBP i NF-1. Takođe, proinflamatorni citokini kao što su interleukin-1 (IL-1), IL-4, IL-6 i THF- α povećavaju ekspresiju SOD2. Aktivnost SOD1 i SOD2 može biti inhibirana proizvodom reakcije koju katalizuju, odnosno H₂O₂. SOD3 je enzim koji se nalazi u plazmi, limfi, likvoru i tečnosti zglobova, i pruža zaštitu od vanćelijskog O₂⁻ poreklom, na primer, od membranske NAD(P)H oksidaze ili inflamatornih ćelija. To je tetramerni protein izgrađen od dimera sličnih SOD1 (Fridovich 1986; Silverman i Nick 2002; Halliwell i Gutteridge 2015).



Slika 2. Glavni putevi uklanjanja viška ROS u živim sistemima (preuzeto iz prezentacije: Blagojević 2015).

Katalaza (CAT) — CAT spada među enzime sa najvećom konstantom brzine. Ovaj enzim katalizuje dismutaciju H₂O₂ tako što redukuje jedan molekul H₂O₂ do H₂O, a drugi oksiduje do O₂ (2H₂O₂ → O₂ + 2H₂O). Reakcija se odvija u dva koraka, u prvom koraku nastaje H₂O, a u drugom O₂. Pri nižim koncentracijama H₂O₂ i povećanim koncentracijama donora vodonika kao što su alkoholi, aldehidi i acetaldehidi, CAT može da katalizuje oksidaciju donora vodonika uz utrošak H₂O₂. Ovakva peroksidazna reakcija je mnogo sporija od dismutacije. CAT se sastoji od 4 subjedinice od kojih svaka u aktivnom centru sadrži hem (Fe-III protoporfirin), kao i molekul NADPH koji stabilizuje enzim. Joni teških metala, na primer Cu²⁺ deluju kao nekompetitivni inhibitori CAT, a CN⁻ je kompetitivni inhibitor. CAT je najprisutnija i najaktivnija u peroksisomima, ali je aktivna i u mitohondrijama i endoplazmatičnom retikulumu. U peroksisomima postoji stalna proizvodnja H₂O₂ zbog prisustva enzima kao što su glikolat oksidaza, urat oksidaza i flavoprotein dehidrogenaza. Uloga CAT upravo i jeste eliminisanje visokih koncentracija H₂O₂. U poređenju sa GSH-Px, CAT ima mali afinitet za H₂O₂. Takođe, za katalitičku aktivnost CAT potrebna je interakcija dva molekula H₂O₂ sa jednim aktivnim centrom, što je pri niskim koncentracijama H₂O₂ manje verovatno. Dakle, CAT efikasno razgrađuje H₂O₂ pri visokim koncentracijama, dok pri nižim koncentracijama GSH-Px ima veći značaj (Fridovich 1978; Halliwell i Gutteridge 2015).

Glutation peroksidaze (GSH-Px) — GSH-Px katalizuje redukciju H₂O₂ do H₂O i organskih hidroperoksida (ROOH) do odgovarajućih alkohola (ROH). U toj reakciji GSH se oksiduje uz

formiranje disulfidne veze i nastaje njegov oksidovani oblik (GSSG) ($\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$; $\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$). Kao što je već navedeno, GSH-Px ima veći afinitet za H_2O_2 od CAT pa samim tim i važnu ulogu pri nižim koncentracijama H_2O_2 . Postoji više izoformi koje se razlikuju po afinitetu za supstrat i/ili distribuciji u organizmu. Kod sisara postoji sedam tipova GSH-Px. GSH-Px1, 2 i 3 su tetrameri, a GSH-Px4 je monomer i sva četiri tipa su selen-zavisna. GSH-Px1 je najzastupljenija i nalazi se u citosolu, jedru i mitohondrijama skoro svih ćelija. GSH-Px2 se nalazi u citosolu i jedru ćelija gastrointestinalnog trakta, kao i u vanćelijskom prostoru. GSH-Px3 se nalazi u krvnoj plazmi i u citosolu u raznim tkivima. GSH-Px4 je vezana za unutrašnju stranu plazma membrane, kao i membrane jedra i mitohondrija. Dok sve glutation peroksidaze mogu da razlažu H_2O_2 , alkil perokside i hidroperokside masnih kiselina, jedino GSH-Px4 može da razlaže hidroperokside koji se nalaze u sastavu lipoproteina ili hidroperokside složenih lipida, kao što su hidroperoksidi holesterola, estara holesterola i fosfolipida. Njihovom redukcijom u prisustvu vitamina E, GSH-Px4 inhibira procese lipidne peroksidacije. Razgradnjom lipidnih hidroperoksida nastaju brojni aldehidi. Pošto su manje reaktivni od slobodnih radikala, imaju dug životni vek, mogu da difunduju i stupaju u interakcije sa udaljenim ciljnim molekulima (Brigelius-Flohé 1999; Masoro i Austad 2006; Halliwell i Gutteridge 2015).

Glutation reduktaza (GR) — GR je homodimerni flavoprotein, odnosno svaka proteinska subjedinica sadrži FAD u svom aktivnom centru. Pripada familiji NADPH zavisnih oksidoreduktaza. Katalizuje redukciju GSSG u GSH u citosolu i mitohondrijama eukariotskih ćelija ($\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$). Katalitički ciklus se sastoji od dve faze. U prvoj, NADPH redukuje FAD pri čemu se redukujući ekvivalent prenosi na redoks aktivni disulfid u aktivnom centru. U drugoj fazi se redukuje GSSG. Glavna metabolička funkcija GR je održavanje ravnoteže GSH/GSSG, glavnog redoks pufera u ćelijama. U uslovima homeostaze odnos GSH/GSSG je oko 100 ili više dok u uslovima oksidativnog stresa može da padne i ispod 10. U prisustvu visoke koncentracije NAD(P)H i niske koncentracije GSSG aktivnost GR je inhibirana, dok sa porastom koncentracije GSSG raste i aktivnost GR. Sa aspekta antioksidativne zaštite GR je značajan jer obezbeđuje neophodnu količinu redukovanog glutationa za funkcionisanje GSH-Px i GST (Heffner i Repine 1989; Cardoso i sar. 2008; Aoyama i Nakaki 2015). Glavni izvor NADPH je put pentozna fosfata (Kilanczyk i sar. 2016).

Glutation S-transferaza (GST) — Glutation S-transferaze ili glutacione transferaze su velika superfamilija proteina sa brojnim katalitičkim i nekatalitičkim funkcijama. Kod ljudi postoji najmanje 18 različitih GST. Njihovu ekspresiju i aktivnost karakteriše visoka tkivna specifičnost. GST su prisutne u citosolu, jedru, mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu, mikrozomima. Neki izotipovi GST su solubilni, a neki su membranski proteini. Glavna funkcija im je detoksikacija različitih ksenobiotika i detoksikacija mnogih endogenih supstanci i metabolita koji najčešće nastaju delovanjem ROS, kao što su endogeni nezasićeni aldehidi. Reakcija koju GST katalizuju se zasniva na nukleofilnom napadu GSH na elektrofilni atom nepolarnog supstrata. Ovakva konjugacija ima dve važne posledice. Prvo, onemogućava potencijalno štetnu interakciju supstrata sa ciljnim molekulskim strukturama u ćeliji, i drugo, povećava rastvorljivost i olakšava transport supstrata, odnosno konjugata, van ćelije. Konjugati supstrata i glutaciona se prevode u merkapturnu kiselinu i izlučuju. Osim detoksikacije, GST ima ulogu i u transportu različitih nepolarnih jedinjenja kao što su endogeni steroidi ili neki lekovi. Neke izoforme GST su uključene u sintezu leukotrijena, prostaglandina i polnih hormona, kao i u degradaciju tirozina. Pokazano je da GST inhibira pojedine kinaze uključene u MAPK signalni put. Funkcija GST je osetljiva na koncentraciju H_2O_2 , odnosno H_2O_2 povećava aktivnost i ekspresiju GST, a sa druge strane GST eliminiše relativno reaktivna jedinjenja koja nastaju kao posledica interakcije lipida sa ROS, kao što su aldehidi nastali peroksidacijom hidroperoksida (Hayes i Pulford 1995; Bolt 1996; Yin i sar. 2000; Sheehan i sar. 2001; Hayes i sar. 2005; Atkinson i Babbitt 2009; Laborde 2010).

1.1.3. Oksidativni stres i indikatori oksidativnog oštećenja

U normalnim okolnostima, u aerobnim organizmima proizvodnja ROS je u relativnoj ravnoteži sa aktivnošću antioksidativnog sistema (AOS). Ipak ova ravnoteža nije savršena, tako da konstantno nastaju oštećenja izazvana ROS-om (Halliwell i Whiteman 2004). Dakle AOS funkcionira tako da održava nivo ROS u odgovarajućem opsegu zbog uloge koju ROS imaju u funkcionisanju aerobnih organizama. Oksidacija i redukcija enzima i transkripcionih faktora (redoks regulacija) je uz fosforilaciju i defosforilaciju najvažniji mehanizam regulacije ćelijskih procesa. Šta više, ova dva mehanizma su međusobno zavisna. Redoks stanje u ćeliji utiče na fosforilaciju i obrnuto. Kada se ravnoteže između ROS i AOS naruši tako da je u živom sistemu prisutno više ROS u odnosu na kapacitet AOS, nastaje stanje koje se naziva oksidativni stres. Iako se ovaj izraz često koristi u literaturi teško ga je precizno definisati (Halliwell i Gutteridge 2015). Sveobuhvatna definicija bi mogla da glasi da je oksidativni stres disbalans između oksidanata i antioksidanata u korist oksidanata koji dovodi do narušavanja redoks signalizacije i kontrole, i/ili do oštećenja molekula (Sies i Jones 2007). Ova oštećenja biomolekula izazvana napadom ROS se nazivaju oksidativna oštećenja. Povećan nivo oksidativnih oštećenja može da nastane kao posledica oksidativnog stresa, ali i kao posledica lošeg funkcionisanja reparativnih mehanizama (Halliwell i Gutteridge 2015).

Zbog visoke reaktivnosti ROS i njihovog kratkog životnog veka, teško je direktno meriti njihove koncentracije. Zbog toga se procena ROS statusa uglavnom zasniva na merenju aktivnosti antioksidativnih enzima, koncentracije neenzimskih antioksidanata (glutation, vitamin C, vitamin E) i na merenju koncentracije pojedinih jedinjenja koja nastaju kao posledica oksidativnih oštećenja. Prilikom oksidativnog oštećenja nukleinskih kiselina nastaju oksidovane, nitrovane, hlorovane i bromovane purinske i pirimidinske baze, kao i proizvodi razlaganja 2-deoksi riboze. Najčešće se kao indikatori oksidativnog oštećenja nukleinskih kiselina koriste 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) i timidin glikol (TG) (Halliwell i Gutteridge 2015; Katerji i sar. 2019). Prilikom oksidativnog oštećenja proteina dolazi do oksidacije -SH grupa, nastajanja proteinskih karbonila i proizvoda oksidacije raznih aminokiselina, zatim do nitrovanja, hlorovanja i bromovanja aminokiselina tirozin, triptofan i fenilalanin, kao i do nastajanja peroksida i hidroksida proteina. Najčešće korišćeni indikatori oksidativnog oštećenja proteina su koncentracija slobodnih proteinskih -SH grupa, proteinski karbonili (PC, eng. protein carbonyls) i proizvodi uznapredovale oksidacije proteina (AOPP, eng. advanced oxidation protein products,) (Halliwell i Gutteridge 2015; Katerji i sar. 2019). Prilikom oksidativnog oštećenja lipida nastaju peroksidi, malondialdehid (MDA), 4-hidroksil-2-nonenal (HNE) i drugi aldehidi, izoprostani i slična jedinjenja, proizvodi oksidacije holesterola, halogenovani i nitrovani lipidi.

Najčešće se kao indikatori oksidativnog oštećenja koriste jedinjenja koja reaguju sa tiobarbituratnom kiselinom (TBARS, eng. thiobarbituric acid reactive substances), HNE, 8-izoprostaglandin F₂α (8-iso-PGF₂α), konjugovani dieni (CD, eng. conjugated dienes) i lipidni hidroperoksidi (LOOH) (Halliwell i Gutteridge 2015; Katerji i sar. 2019; Morrow i Roberts 1996).

TBARS — Lipidna peroksidacija se često koristi kao parametar za procenu oksidativnih oštećenja ćelijskih membrana i oksidativnog stresa uopšte, a najbrži i najjednostavniji način za procenu nivoa lipidne peroksidacije je TBARS esej. Dva molekula tiobarbituratne kiseline (TBA, eng. thiobarbituric acid) pod odgovarajućim uslovima stupaju u reakciju nukleofilne adicije sa jednim molekulom MDA. MDA je jedan od krajnjih proizvoda razlaganja određenih lipidnih peroksida. Treba imati u vidu da samo neki lipidni peroksidi daju MDA, da MDA nije jedini proizvod peroksidacije masnih kiselina, i takođe da MDA može da nastane i nezavisno od lipidne peroksidacije. MDA je u niskoj koncentraciji prisutan u živim sistemima, pa samo mali deo ukupne MDA u TBARS eseju čini MDA poreklom iz uzorka. Veliku većinu čini MDA koji tokom samog eseja nastaje od lipidnih peroksida koji su prisutni u uzorku. U TBARS eseju TBA reaguje i sa raznim

drugim aldehidima, od kojih neki potiču od oksidativnog oštećenja lipida. U ovim reakcijama nastaje obojeni proizvod čija koncentracija može biti izmerena spektrofotometrijski ili fluorimetrijski. Treba imati u vidu i neke mane ovog eseja. Pošto skoro sav MDA (oko 98% u nekim uzorcima) koji reaguje sa TBA nastaje tokom samog eseja, ishod u velikoj meri zavisi od eksperimentalnih uslova. Treba uzeti u obzir i lažne hromogene, kao što su biliverdin, salicilna kiselina i streptomycin, koji apsorbuju na istoj talasnoj dužini kao proizvod TBARS eseja. Takođe, tokom eseja može da nastane MDA poreklom od ugljenih hidrata (npr. 2-deoksi riboze), amino kiselina (npr. prolin) ili propenala azotnih baza koji nastaju kao posledica oksidativnog oštećenja DNK (Halliwell i Gutteridge 2015; Katerji i sar. 2019; Janero 1990).

Količina slobodnih -SH grupe — Naziv slobodne -SH (tiolne, sulfhidrilne) grupe potiče iz ranih istraživanja kada je pokazano da je u tkivima moguće razlikovati tri klase -SH grupa: 1) -SH grupe na malim molekulima koji se lako ekstrahuju; 2) slobodne -SH grupe na velikim „nerastvorljivim” molekulima (proteini) koje reaguju sa Elmanovim reagensom (5,5'-ditiobis (2-nitrobenzeva kiselina), skraćeno DTNB; i 3) sakrivene -SH grupe koje su takođe deo velikih „nerastvorljivih” molekula (proteina) ali ne reaguju sa Elmanovim reagensom, tj. reaguju tek nakon denaturacije proteina (Szent-Györgyi 1976; Pohl 1976). U uslovima oksidativnog stresa mnoge komponente ćelija podležu oksidaciji. I proteinski tioli i tioli male molekulske mase su važne mete za ROS i druge reaktivne vrste. -SH grupe mogu biti oksidovane u reakciji sa ROS dajući uglavnom disulfide, pa u uslovima oksidativnog stresa dolazi do promena u redoks statusu, odnosno do povećanja količine oksidovanih tiola i smanjenja količine redukovanih tiola, tj. slobodnih -SH grupa (Banne i sar. 2003; Imlay 2003; Avery 2011; Koning i sar. 2016; Abdulle i sar. 2020). Pošto ROS i druge reaktivne vrste lako oksiduju redukovane tiolne, na pojednostavljen način, promena nivoa ukupnih slobodnih -SH grupa u nekom kompartmentu može da se interpretira kao direktni odraz promena u balansu između oksidanata i antioksidativnog kapaciteta, odnosno kao odraz promena u redoks ravnoteži. Osim što odražavaju redoks status, slobodni tioli su ključne komponente antioksidativnog kapaciteta jer učestvuju u uklanjanju viška ROS (Koning i sar. 2016; Cortese-Krott i sar. 2017; Abdulle i sar. 2020).

Izraz neproteinske -SH grupe se odnosi na sve redukovane tiolne grupe koje nisu u sastavu proteina. Uglavnom se nalaze u sastavu malih aminotiola kao što su GSH, cistein i homocistein (Koning i sar. 2016). Elektrohemijski redoks potencijal (npr. GSH/GSSG) je posledica brzih enzimskih procesa povezanih sa transportom, degradacijom i regeneracijom tiola (Flohé 2013). GSH je uključen u mnoge funkcije u ćelijama pa održavanje ovog i drugih redoks odnosa na odgovarajućem nivou ima veliki značaj. Merenje odnosa redukovanih i oksidovanih oblika malih aminotiola, ili prosto merenje koncentracije neproteinskih -SH grupa ima veći značaj od merenja koncentracije pojedinačnih indikatora oksidativnog oštećenja, jer nam daje sveobuhvatniji uvid u promene redoks statusa. Sa druge strane, ova merenja odražavaju samo mali deo ukupne tiolske redoks mreže jer nam ne govore ništa o velikom pulu proteinskih tiola (Cortese-Krott i sar. 2017).

U ćelijama, a naročito u mitohondrijama, proteinski tioli mogu da čine najveći deo redoks aktivnih tiola, tj. njihova koncentracija je veća od GSH i drugih malih tiola (Hansen i sar. 2009; Cortese-Krott i sar. 2017). Takođe u plazmi, albumini čine najveći deo slobodnih -SH grupa. Neki autori smatraju da su proteinske -SH grupe važan redoks pufer, odnosno jedan od najvećih antioksidanata u ćelijama. Ipak -SH grupe često imaju ključni značaj za funkcionisanje proteina pa je za žive sisteme veoma važno održavanje ravnoteže između sposobnosti proteinskih -SH grupa da uklanjaju ROS i izbegavanja poremećaja u funkciji proteina zbog njihove oksidacije (Halliwell i Gutteridge 2015; Cortese-Krott i sar. 2017).

Neki proteini su direktno redoks regulisani (npr. neki jonski kanali, p53, kaspaze, akonitaze) dok su koncentracije nekih drugih proteina kontrolisane promenama u transkripciji gena pomoću redoks-osetljivih transkripcionih faktora (Halliwell i Gutteridge 2015). Postoje bar

dva tipa direktne redoks regulacije. Jedan je oksidacija i redukcija specifičnih –SH grupa (redoks senzori, redoks prekidači, proteinski tiolni prekidači), pojedinačnih ili u paru uz formiranje disulfida, što dovodi do promene konformacije i funkcionalnog stanja proteina (Halliwell i Gutteridge 2015; Cortese-Krott i sar. 2017). U modifikacije tiola spadaju i glutationilacija i nitrozilacija. Drugi tip, koji ima mnogo veći značaj za biljke nego za životinje, je oksidacija i redukcija jona gvožđa, obično u [Fe–S] klasterima. ROS mogu da inhibiraju vezivanje NRF2 za DNK, verovatno oksidacijom određenih –SH grupa. H₂O₂ može direktno da deaktivira nekoliko enzima, obično oksidacijom –SH grupa neophodnih za katalizu. Kod miševa, H₂O₂ može da oksiduje -SH grupe u protein kinazi G uz formiranje disulfidnog mosta i tako je aktivira što dovodi do vazodilatacije, verovatno putem fosforilacije jonskih kanala. Osim H₂O₂, i proteinski peroksidi mogu da oštete proteine sa osetljivim –SH grupama, kao što su kaspaze, gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenaza i neki katepsini (Halliwell i Gutteridge 2015).

Dakle proteinske –SH grupe su deo redoks sistema koji ima ulogu u održavanju redoks ravnoteže i ulogu u podešavanju strukture i funkcije proteina u skladu sa redoks stanjem (Go i Jones 2013). Merenje koncentracije slobodnih proteinskih –SH grupa, za razliku od PC, može da pruži uvid u rana oksidativna oštećenja proteina ili ključnih –SH grupa (Halliwell i Gutteridge 2015). Takođe, za razliku od formiranja PC, oksidacija proteinskih –SH grupa je reverzibilna i pretežno ima prolazni uticaj na funkciju proteina (Avery 2011) tako da praćenje promena koncentracije slobodnih proteinskih –SH grupa ima veći funkcionalni karakter u smislu sagledavanja promena u redoks ravnoteži i redoks regulaciji.

1.2. Ibogain

Ibogain (12-metoksiibogamin) je psihoaktivno organsko heteropentaciklično jedinjenje, monoterpenoidni indolni alkaloid, i aromatični etar (PubChem CID: 197060). Molekulska formula ibogaina je C₂₀H₂₆N₂O, molekulska masa 310,4 g/mol, a tačka topljenja 153°C. Skoro je potpuno nerastvorljiv u vodi, ali se rastvara u nepolarnim rastvaračima, etanolu, etru, hloroformu, acetonu i benzenu. Ibogain je foto i termosenzitivan. Najpoznatiji prirodni izvor ibogaina je žbunasta biljka iboga (*Tabernanthe iboga* Baill.) koja raste u kišnim šumama zapadne Afrike. U ekstraktu kore korena iboge u najvećoj meri je prisutan ibogain (80%), a prisutni su i drugi alkaloidi kao što su ibogalin (15%) i ibogamin (do 5%) i u manjoj količini tabernantin i voakangin (Mačiulaitis i sar. 2008).

1.2.1. Etnofarmakologija

Na području basena reke Kongo, kora korena iboge se vekovima koristi u tradicionalnoj medicini ili kao stimulans, a u velikim dozama se koristi u obredne svrhe u cilju izazivanja halucinacija (Alper 2001; Popik i sar. 1995; Fernandez i Fernandez 2001). Naime, biljka iboga je okosnica Bwiti religije koju uglavnom praktikuju narodi koji žive na prostoru sadašnjih država Gabon, Kamerun i Republika Kongo. Oni u brojnim ceremonijama koriste ovaj prirodni alkaloid zbog njegovih psihoaktivnih osobina. Na primer, iboga se koristi prilikom ceremonija inicijacije u zrelo doba, jer konzumenta dovodi u stanje transa i smatra se da konzument otkriva svrhu života i svoju ulogu u društvu (Fernandez 1982). U malim dozama ga domorodački narodi upotrebljavaju u cilju prevazilaženja osećaja umora, gladi ili žeđi i održavanja budnog stanja tokom napornih aktivnosti kao što su noćni lov ili dugačka putovanja kanuom (Mash i sar. 1998). Ibogain je takođe korišćen u Evropi zbog svojih stimulativnih i afrodizijačkih svojstava, i kao tonik za oporavak bolesnika (Naranjo 1969; Schultes 1970).

1.2.2. Savremena upotreba

U alternativnoj medicini, u takozvanoj „ibogainskoj medicinskoj subkulturii” korisnici mnogih uobičajenih sredstava zavisnosti kao što su: kokain, heroin, metadon, alkohol i drugi,

koriste ibogain kao antiadiktivni agens zbog njegove navodne efikasnosti u ublažavanju simptoma apstinencijalnog sindroma i suzbijanju potrebe za korišćenjem sredstava zavisnosti (Alper 2001; Brown 2013). Ovo je učinilo ibogain interesantnim za savremenu farmakologiju pa se u drugoj polovini dvadesetog veka pojavilo više stotina radova na temu hemije i farmakologije ibogaina.

Prvi rad o etnofarmakologiji iboge objavljen je još 1885. godine. Ibogain je prvi put izolovan i kristalizovan 1901. a njegova hemijska struktura je opisana 1957. godine. Od 1939. do 1970. godine u Francuskoj se prodavao preparat Lambarène, kao neuromuskularni stimulans, u formi tableta koje su sadržale 8 mg ibogaina. Njegova upotreba je bila preporučena za borbu protiv umora, depresije i prilikom oporavka od infektivnih bolesti (Goutarel i sar. 1993). U Sjedinjenim Američkim Državama je 1957. godine registrovan patent za upotrebu ibogaina u cilju smanjivanja tolerancije na opioidne analgetike (Schneider i Sigg 1957). U Francuskoj, 1969. godine je registrovan patent za upotrebu ibogaina u psihoterapiji (Bocher i Naranjo 1969). Međutim, u periodu od 1967. do 1970. godine, Svetska zdravstvena organizacija (WHO, eng. World health organization) je klasifikovala ibogain u halucinogene i stimulanse kao „supstancu koja verovatno izaziva zavisnost ili ugrožava ljudsko zdravlje”, dok je Međunarodni olimpijski komitet zabranio upotrebu ibogaina kao potencijalnog doping sredstva (Goutarel i sar. 1993). Ipak kasnija istraživanja su pokazala da ibogain nema ni nagrađujuće ni odbojno dejstvo, kao ni značajan potencijal za zloupotrebu (Alper 2001; Brown 2013). Naprotiv, prepoznata su antiadiktivna svojstva ibogaina pa je u Sjedinjenim Američkim Državama 1985. godine registrovan patent za upotrebu ibogaina u lečenju zavisnosti od heroína, kokaina, amfetamina, nikotina i alkohola jer tretman ibogainom navodno prekida zavisnost na period od 6-36 meseci (Mačiulaitis i sar. 2008). Na osnovu dostupnih podataka o potencijalnoj efikasnosti ibogaina iz objavljenih studija slučaja i eksperimenata na životinjama, 1991. godine američki Nacionalni institut za zloupotrebu droga (NIDA, eng. The National Institute on Drug Abuse) započeo je svoje prvo istraživanje ibogaina čiji su glavni ciljevi bili predklinička toksikološka procena i razvoj protokola za primenu na ljudima (Alper 2001). U 21. veku dostupnost i neformalna upotreba ibogaina u antiadiktivne, halucinogene ili introspektivne svrhe postaje sve masovnija širom sveta. Na međunarodnom nivou pravni status ibogaina nije regulisan. Naime ibogain se ne nalazi na „zelenoj listi” Međunarodnog borda za kontrolu narkotika Ujedinjenih nacija, niti na spisku psihoaktivnih supstanci pod međunarodnom kontrolom. Proizvodnja, transport, prodaja i posedovanje ibogaina su protivzakoniti u mnogim državama (npr. u Švajcarskoj, Francuskoj, Sjedinjenim Američkim Državama) ili na neki način ograničeni i kontrolisani (npr. u Izraelu, Kanadi i Australiji), dok u nekim državama ne podležu zakonskim ograničenjima (npr. u Holandiji, Brazilu, Gabonu i Južnoafričkoj republici). U Srbiji upotreba ibogaina nije dozvoljena. U Pravilniku o utvrđivanju Spiska psihoaktivnih kontrolisanih supstanci ("Sl. glasnik RS", br. 38/19) ibogain se nalazi na Listi 4: Psihoaktivne supstance koje mogu prouzrokovati teško oštećenje zdravlja ljudi.

Uobičajeno je da se ibogain primenjuje u rasponu od 1 do 25 mg/kg telesne mase kao jedna oralna doza (Popik i sar. 1995; Alper i sar. 2008; Sheppard 1994; Donnelly 2011; Mačiulaitis i sar. 2008). U „kliničkom uputstvu za detoksikaciju potpomognutu ibogainom” koje je objavila „Globalna alijansa za terapiju ibogainom” (GITA) preporučeno je da doza ibogaina ne sme da prelazi 24 mg/kg telesne mase u 24 sata (Global ibogaine therapy alliance [Internet]). Takođe je preporučena primena početne doze, uglavnom između 1 i 5 mg/kg, koja se daje najmanje 2 do 3 a najviše 24 do 36 sati pre velike doze. Na osnovu istraživanja na zdravim volonterima muškog pola zaključeno je da je doza od 20 mg/kg telesne mase bezbedna za primenu (Glue i sar. 2015). Jedno starije retrospektivno istraživanje na uzorku od 33 osobe koje su koristile ibogain u cilju suzbijanja apstinencijalnog sindroma je pokazalo da je prosečna korišćena doza bila 19,3 mg/kg telesne mase (Alper i sar. 1999). Savetodavni panel američke Uprave za hranu i lekove (FDA, eng. Food and drug administration) je 1995. godine odobrio prvu fazu kliničkog ispitivanja farmakokinetike i bezbednosti ibogaina na muškim volonterima u dozama od 1, 2 i 5 mg/kg (Mash

i sar. 1998; Alper i sar. 2008). Sa druge strane, na osnovu dostupnih rezultata predkliničkih ispitivanja grupa autora je ukazala na neophodan oprez pri primeni ibogaina, kao i da maksimalna oralna doza ne bi trebalo da bude veća od 1 mg/kg (Schep i sar. 2016). Raniji izveštaji o korisnim efektima ibogaina na ljudsko zdravlje su se pokazali kao dvosmisleni i oprečni (Alper 2001; Litjens i Brunt 2016). U literaturi su opisani brojni smrtni slučajevi povezani sa upotrebom ibogaina (Alper 2001; Aćimović i sar. 2021) što ukazuje na potrebu za boljim razumevanjem kompleksne farmakodinamike i bezbednijeg načina doziranja i primene ibogaina. Trenutno je u toku nekoliko kliničkih ispitivanja koja se bave upotrebom ibogaina u lečenju zavisnosti: *EU Clinical Trials Register* 2014-000354-11; *ClinicalTrials.gov Identifier*: NCT03380728, NCT04003948 i NCT05029401.

1.2.3. Farmakokinetika

U eksperimentima na pacovima je pokazano da je apsorpcija ibogaina nelinearna, dozno zavisna, kao i da postoje razlike u biološkoj raspoloživosti i kinetici eliminacije među polovima. Takođe, opisane su razlike u farmakokinetici u zavisnosti od načina primene ibogaina (oralna suspenzija, oralni rastvor, intravenska, intraperitonealna ili subkutana primena). Prilikom istraživanja distribucije ibogaina, pokazano je da je koncentracija u ciljnim tkivima (mozak, jetra, bubreg, adipozno tkivo, plazma) veća prilikom subkutane, nego prilikom intraperitonealne administracije. Sat vremena nakon primene, koncentracija ibogaina je bila 100 puta veća u adipoznom tkivu i 30 puta veća u mozgu nego u plazmi. Ovakva distribucija se pripisuje lipofilnoj prirodi ibogaina, jer on kao lipofilni molekul lako prodire u ćelije, ne utičući na fluidnost ćelijske membrane, a adipozno tkivo bi moglo da ima ulogu rezervoara ibogaina, sa odloženim otpuštanjem i metabolizmom (Hough i sar. 1996; Kontrimaviciūte i sar. 2006; Paškulin i sar. 2012; Kubiliene i sar. 2017).

U organizmu sisara ibogain se konvertuje u svoj takođe aktivni metabolit noribogain (12-hidroksi ibogamin) koji se eliminiše iz organizma znatno sporije od ibogaina (Glue i sar. 2016). Farmakokinetički profil ove konverzije je kompleksan i tkivno specifičan. Zasniva se na demetilaciji koju katalizuje citohrom P450 2D6 (Obach i sar. 1998; Baumann i sar. 2001) koji je najviše eksprimiran u jetri, mozgu, crevima i limfoidnim ćelijama (Gopisankar 2017; Dutheil i sar. 2009; Taylor i sar. 2020). Noribogain se detektuje u moždanom tkivu 15 minuta nakon oralne primene doze od 50mg/kg (Staley i sar. 1996). U krvi ljudi tretiranih jednom oralnom dozom ibogaina od 20 mg/kg, koncentracije ibogaina i noribogaina 4 sata nakon primene su bile 0,91 i 0,67 mg/l, nakon 12 sati 0,27 i 1,0 mg/l, i nakon 19 sati 0,15 i 0,80 mg/l (Borgusz i sar. 1998, kako je preneto u Corkery 2018). Farmakokinetika ibogaina kod pacova je nešto drugačija u odnosu na ljude. Procenjeno je da je poluživot ibogaina kod pacova jedan sat, a kod čoveka 7,5 sati (Alper 2001). Eliminacija ibogaina putem urina i fecesa 24 sata nakon oralne primene je oko 65% kod pacova (Jeffcoat i sar. 1994) i oko 90% kod ljudi (doza 20mg/kg) (Mash i sar. 1998). U krvi ibogain biva zamenjen noribogainom i relativno brzo biva potpuno eliminisan dok je eliminacija noribogaina dosta sporija (Mash i sar. 2000; Alper 2001; Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Vidonja Uzelac 2019). Prilikom intravenske primene, nakon 24 sata više nije moguće detektovati ibogain u krvi ali je noribogain i dalje prisutan (Baumann i sar. 2001). Znatno sporija eliminacija noribogaina i prisustvo relativno visoke koncentracije 24 sata nakon primene je jedno od objašnjenje dugotrajnih efekata ibogaina (Alper 2001).

Biološka raspoloživost nakon oralne primene je oko 2 do 3 puta veća kod ženki nego kod mužjaka pacova (Jeffcoat i sar. 1994). Veća biološka raspoloživost kod ženki je pokazana i nakon intraperitonealne primene (Pearl i sar. 1997). U našim prethodnim istraživanjima (Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Vidonja Uzelac 2019) je pokazano da su koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi mužjaka pacova slične koncentracijama izmerenim u plazmi miševa (Kubiliene i sar. 2017). Ipak svi dostupni podaci o uporednoj farmakokinetici ibogaina kod mužjaka i ženki pacova nisu

dovoljno detaljni i sveobuhvatni razlikuju bilo u soju pacova, načinu primene, dozi ili vremenskom intervalu.

1.2.4. Farmakodinamika

Ibogain svoje farmakološke efekte ostvaruje vezivanjem za različite tipove receptora (Alper 2001; Glick i sar. 2001; Glick i sar. 2002; Leal i sar. 2003) i njegovi efekti zavise od primenjene doze i tkivne distribucije najosetljivijih receptora i efektora. Istraživanje na pacovima je pokazalo da su efekti ibogaina na nivou CNS polno specifični, tj. izraženiji kod ženki nego kod mužjaka (Pearl i sar. 1997). Zbog psihoaktivnog dejstva ibogaina, njegova farmakodinamika je najbolje proučena na nivou CNS. Ibogain se pokazao interesantnim zbog svog mehanizma delovanja, koji se razlikuje od mehanizama drugih antiadiktivnih farmakoterapeutika i halucinogena. Smatra se da bi taj drugačiji mehanizam delovanja ibogaina mogao pomoći u razumevanju neurobiologije zavisnosti i razvoju novih tretmana. Pokazano je da bi efekti ibogaina mogli biti rezultat kompleksnih interakcija između većeg broja neurotransmiterskih sistema, pre nego rezultat dominantne aktivnosti jednog sistema (Popik i Skolnick 1999; Sweetnam i sar. 1995; Sershen i sar. 1997; Glick i Maisonneuve 1998; Alper 2001; Mash 2023). Prikaz afiniteta ibogaina i noribogaina za različita mesta vezivanja dat je u Tabeli 1. Treba imati u vidu da funkcionalni karakter interakcije ibogaina sa ovim ciljnim molekulima nije dovoljno dobro okarakterisan jer istraživanja na različitim eksperimentalnim modelima često daju različite, ponekad i oprečne rezultate.

Ibogain deluje kao nekompetitivni antagonist N-metil-D-aspartat (NMDA) glutamatnih receptora. Takođe, ibogain stimuliše hipotalamo-hipofizno-adrenalnu osovinu, tj. stimuliše sekreciju kortikosteroida iz kore nadbubrežne žlezde i prolaktina iz prednjeg režnja hipofize. Noribogain se vezuje za NMDA sa nižim afinitetom i slabije stimuliše hipotalamo-hipofizno-adrenalnu osovinu (Bauman i sar. 2001; Bauman i sar. 2000; Leal i sar. 2000).

Izmenjena serotoninska transmisija bi mogla da bude uključena u halucinogeni efekat ibogaina (Glick i Maisonneuve 1998; Wei i sar. 1998; Baumann i sar. 2001). Ibogain, kao i serotonin, sadrži u svojoj strukturi indolni prsten i pokazano je da se ibogain vezuje za serotoninske (5-hidroksitriptaminske, 5-HT) receptore. Tradicionalni halucinogeni, kao što je LSD, su agonisti 5-HT₂ receptora i interaguju sa njima u nanomolarnom opsegu koncentracija. Za razliku od njih ibogain sa 5-HT₂ receptorima interaguje u mikromolarnom opsegu (González i sar. 2018). Ibogain bi mogao da bude agonista 5-HT₂ (Helsley i sar. 1998) ali funkcionalni smisao interakcije ibogaina sa 5-HT₂ receptorima nije dovoljno jasan. Ibogain se vezuje i za serotoninski transporter (SERT) i nekompetitivno inhibira preuzimanje serotonina (Bulling i sar. 2012; Coleman i sar. 2019). Ovo bi mogao da bude jedan od mehanizama netipičnog halucinogenog delovanja ibogaina. Pokazano je da ibogain povećava nivo serotonina u *nucleus accumbens*-u (Sershen i sar. 1997; Mash i sar. 1995; Wei i sar. 1998), jedru odgovornom za kognitivno obrađivanje motivacije, zadovoljstva, nagrade, pa stoga ima i značajnu ulogu u bolestima zavisnosti.

Ibogain se ne vezuje značajano za dopaminske receptore ali se sa relativno niskim afinitetom vezuje za dopaminski transporter i kompetitivno i/ili nekompetitivno inhibira preuzimanje dopamina. Eksperimenti na miševima i pacovima su pokazali da efekti ibogaina na vanćelijsku koncentraciju dopamina, a to može biti i smanjenje i povećanje, u velikoj meri zavise od primenjene doze, vremena proteklog od tretmana i regiona mozga. Relativno visoke doze ibogaina trebalo bi da povećavaju koncentraciju dopamina, baš kao i serotonina, zbog inhibicije transportera. Smanjenje koncentracije dopamina bi moglo da bude još jedan od uzroka povećanog lučenja prolaktina, uz antagonizam NMDA receptora, nakon primene ibogaina (Ali i sar. 1996; Baumann i sar. 1998; Wells i sar. 1999; Baumann i sar. 2000; Bulling i sar. 2012).

Tabela 1. Afiniteti ibogaina i noribogaina za različita mesta vezivanja.

Ciljni molekul	Ibogain Ki; IC50 (μM)	Noribogain Ki; IC50 (μM)	Farmakodinamika
Monoamini			
SERT (preuzimanje [³ H]5-HT; pacov)	0,5	0,3	blokator preuzimanja serotonina
SERT (vezivanje paroksetina; čovek)	2,0	0,9	blokator preuzimanja serotonina
SERT (vezivanje analoga kokaina RTI-55; čovek)	0,5	0,04	blokator preuzimanja serotonina
SERT (vezivanje analoga kokaina RTI-55; pacov)	0,2	0,2	blokator preuzimanja serotonina
SERT (vezivanje analoga kokaina RTI-55; Hela ćelije)	2,5		blokator preuzimanja serotonina, nekompetitivni
5-HT₂ (vezivanje ketanserina; korteks pacova)	4,8; >100	neaktivan	nepoznato
5-HT₃ (GR65630; N1 E-115 ćelije; area postrema)	3,8; >100	neaktivan	nepoznato
DAT (analog kokaina RTI-55; čovek; pacov)	1,5 – 4	3,4	blokator preuzimanja dopamina
Opioidni receptori			
MU (vezivanje naloksona; prednji mozak miša; talamus pacova)	0,13 – 3,6	5,8	agonista; parcijalni agonista; mešoviti agonista-antagonista
MU (vezivanje DAMGO, pacov; DAGO korteks teleta; korteks čoveka)	5,6 – 11,0	1,5	antagonista
HEK-MOR ćelije; DAMGO	19	1,1; 0,2	
KAPPA (vezivanje U69,593, čovek)	2,0 – 4,0	0,7	parcijalni agonista; funkcionalno selektivni agonista
DELTA (DPDPE, nucleus caudatus teleta)	>100	24,7	nepoznato
Sigma receptori			
Sigma-1 (membrane mozga zamorca; vezivanje pentazocina, cerebelum čoveka)	10	neaktivan	nepoznato
Sigma-2 (membrane jetre pacova; membrane mozga zamorca)	0,10; 0,2 – 0,3	neaktivan	nepoznato
Nikotinski jonotropni receptori			
Ganglijski (PC-12 ćelijska line; influx Na ⁺)	0,02	1,5	inhibitor, nekompetitivni
α3β4 nAChR (HEK ćelije, čovek; 0,22 – 1,0; 3,7; 5,2; SH-SY5Y ćelije)	9,8	6,8; 0,5	Inhibitor; nekompetitivni antagonist
NMDA receptor			
MK-801 (korteks pacova; prednji mozak pacova)	1,0; 2,3; 3,2		blokator kanala
MK-801 (nucleus caudatus čoveka; kičmena moždina žabe)	5,2; 9,8	31,4	blokator kanala
Voltažno zavisni (ćelije hipokampusu pacova)	3,2		blokator kanala

DAT – dopaminski transporter; Ki – konstanta inhibicije; IC50 – polumaksimalna inhibitorna koncentracija; nAChR – nikotinski acetilholinski receptori; SERT – serotoninski transporter. Preuzeto iz rada: Mash (2023).

Interakcija ibogaina sa opioidnim receptorima bi mogla biti jedan od uzroka efikasnosti ibogaina u prekidu uzimanja opioida. Neka rana istraživanja su dovela u vezu efekte ibogaina sa aktiviranjem opioidnih receptora, međutim iako se ibogain i noribogain vezuju za opioidne receptore u mikromolarnim ili visokim nanomolarnim koncentracijama (Pearl i sar. 1995) oni ne funkcionišu kao uobičajeni opioidni agonisti ili antagonisti (Maillet i sar. 2015). Brojni podaci

ukazuju da ibogain nije ortosterni agonista opioidnih receptora, dok je u talamusu pokazano da ibogain i noribogain deluju kao antagonisti mu opioidnih receptora u niskim mikromolarnim koncentracijama (Antonio i sar. 2013). Ibogain je nekompetitivni antagonist nikotinskih acetilholinskih receptora (Mash i sar. 1998; Benwell i sar. 1996; Schneider i sar. 1996; Badio i sar. 1997; Fryer i Lukas 1999), a pretpostavlja se i da je agonista muskarinskih receptora (Koenig i Hilber 2015) ali za ovu pretpostavku još uvek ne postoji funkcionalna potvrda. Ibogain takođe inhibira aktivnost enzima monoamin oksidaze (MAO) čija je jedna od funkcija inaktivacija monoaminskih neurotransmitera kao što su dopamin, serotonin i noradrenalin (Alper 2001).

Najčešća neželjena dejstva ibogaina su povraćanje i tremor. Mnogo ređe i najozbiljnije neželjeno dejstvo je produženje QT intervala koje može dovesti do aritmije sa smrtnim ishodom (Hoelen i sar. 2009; Pleskovic i sar. 2012; Paling i sar. 2012; Meisner i sar. 2016; Litjens i Brunt 2016; Koenig i Hilber 2015). Na kardiomiocitima zamorca je pokazano da ibogain u mikromolarnim koncentracijama blokira hERG subjedinicu I_{Kr} kanala, koji imaju ulogu u fazi repolarizacije (Koenig i sar. 2013).

1.2.5. Efekti na energetskei metabolizam i redoks ravnotežu

Osim direktnih neurofarmakoloških efekata koje ibogain ostvaruje interakcijom sa receptorima i transporterima za neurotransmitere u mozgu, postoje i drugi mehanizmi kojima bi se mogli objasniti njegovi antiadiktivni efekti, naročito dugotrajni. Jedan od njih su adaptivne promene u energetskei homeostazi (Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2012; Nikolić-Kokić i sar. 2015a). Pokazano je da ibogain, putem mehanizama koji još uvek nisu poznati, dovodi do brzog pražnjenja rezervi ATP koje je praćeno povećanjem intenziteta ćelijskog disanja, povećanjem ekspresije enzima uključenih u energetskei metabolizam (glikolizu i Krebsov ciklus), kao i porastom količine ROS i aktivnosti antioksidativnih enzima (Nikolić-Kokić i sar. 2015a; Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2012; Paškulin i sar. 2006; Oreščanin-Dušić i sar. 2018; Vukašinović i sar. 2021).

Pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* u stacionarnoj fazi rasta, u aerobnim uslovima, je prihvaćeni eksperimentalni model za proučavanje puteva bazalnog metabolizma kod viših eukariota, uključujući i sisare (Ma 2001). Kvasac ne poseduje receptore (za neurotransmitere) za koje se ibogain vezuje u mozgu sisara, te je korišćen kao pogodan model za ispitivanje efekata ibogaina na energetskei metabolizam. Inkubiranje kvasca u medijumu koji sadrži ibogain dovodi do brzog i reverzibilnog pada koncentracije ATP u ćelijama, koji je praćen povećanjem intenziteta ćelijskog disanja (proizvodnje CO_2) i do povećanja proizvodnje ROS na način koji je zavisn od koncentracije i vremena (Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2012). Povećanje intenziteta ćelijskog disanja je očekivano praćeno povećanom proizvodnjom ROS, promenom ćelijskog redoks statusa i povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima, ali i značajnim padom ukupnog oksidativnog opterećenja (Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2012; Nikolić-Kokić i sar. 2015a).

Pošto su eksperimenti na kvascu pokazali da ibogain izaziva pražnjenje rezervi ATP i dovodi do aktiviranja energetskei metabolizma, odnosno mitohondrija, kao još jedan eksperimentalni model za ispitivanje ibogaina korišćene su ćelije koje ne poseduju mitohondrije, odnosno eritrociti. Osim toga, poznato je da eritrociti mogu da oslobađaju ATP iz submembranskih depoa kao odgovor na različite stimuluse (Chu i sar. 2012; Ellsworth i sar. 2009). Takođe, u eritrocitima ne postoji *de novo* sinteza antioksidativnih enzima pa je njihov antioksidativni kapacitet ograničen (Nikolić-Kokić i sar. 2010). U istraživanju na ljudskim eritrocitima je pokazano da ibogain dovodi do oslobađanja ATP u vanćelijski prostor kao i do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD1 i GR (Nikolić-Kokić i sar. 2015a).

Istraživanja na pacovima su pokazala da intraperitonealna primena ibogaina u dozi od 20 mg/kg telesne mase, dovodi do povećane ekspresije enzima uključenih u energetskei metabolizam

u mozgu. Pokazano je povećanje količine enzima glikolize (gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenaze, aldolaze A i piruvat kinaze) i Krebsovog ciklusa, 24 i 72 sata nakon primene ibogaina (Paškulin i sar. 2006). Ibogain je imao sličan efekat i na kvasac. U eksperimentima na kvascu pokazano je da ibogain povećava proteinsku ekspresiju enzima glikolize i SOD1 5 sati nakon izlaganja koncentraciji od 1 mg/l (Paškulin i sar. 2010). Na osnovu ovoga bi se moglo pretpostaviti da ibogain pokreće remodelovanje osnovnih metaboličkih puteva i po cenu početnog utroška energije dovodi do povećanja efikasnosti metabolizma i veće dostupnosti slobodne energije (Nikolić-Kokić i sar. 2015a). Koncentracija ibogaina primenjena u navedenom istraživanju na kvascu je farmakološki relevantna jer odgovara maksimalnoj koncentraciji ibogaina u mozgu pacova nakon intraperitonealnog tretmana dozom od 20 mg/kg telesne mase. Sa druge strane, u eksperimentu u kom su pacovi tretirani upravo dozom od 20 mg/kg intraperitonealno, 24 i 72 sata nakon tretmana proteinska ekspresija SOD u mozgu nije bila povećana (Paškulin i sar. 2006). Ovo nam ukazuje da postizanje efekata ibogaina kao i njihova detekcija zavise od vrste eksperimentalnog organizma i ciljnog tkiva kao i od vremena koje je proteklo od tretmana. Osim navedenih proteina ibogain je doveo i do povećanja ekspresije velikog broja neidentifikovanih proteina sa niskom zastupljenošću. Ovo bi moglo biti bar delimično odgovorno za veliku potrošnju energije u kvascu ubrzo nakon izlaganja ibogainu (Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2006).

U *in vitro* eksperimentima (DPPH test) je pokazano da ibogain sam po sebi nema antioksidativna svojstva (Paškulin i sar. 2012), dok je na različitim *in vitro* (Nikolić-Kokić i sar. 2015a; Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2012) i *ex vivo* (Oreščanin-Dušić i sar. 2018; Vukašinović i sar. 2021) eksperimentalnim modelima pokazano da ibogain povećava aktivnost antioksidativnih enzima (SOD1, CAT, GSH-Px, GR) što ide u prilog karakterizaciji ibogaina kao pro-antioksidativnog agensa (Paškulin i sar. 2012; Nikolić-Kokić i sar. 2015a). Još uvek nije poznato na koji način ibogain ostvaruje ovakve efekte ali istraživanja na kvascu i eritrocitima su pokazala da oni nisu posredovani vezivanjem za receptore (koji u ovim ćelijama nisu prisutni) nego nekim drugim načinom interakcije sa metabolizmom ROS (Paškulin i sar. 2010; Nikolić-Kokić i sar. 2015a).

Naša prethodna *ex vivo* istraživanja na kontraktilno aktivnom izolovanom uterusu pacova su pokazala da se kontraktilna aktivnost i aktivnost antioksidativnih enzima menjaju u zavisnosti od primenjene koncentracije ibogaina, pri čemu ne dolazi do promena u proteinskoj ekspresiji ovih enzima. Pri nižim koncentracijama, koje stimulišu kontraktilnu aktivnost, dolazi do smanjenja aktivnosti SOD1 i povećanja aktivnosti GSH-Px, dok pri višim koncentracijama, koje dovode do potpune inhibicije kontraktilnosti uterusa, smanjuje se aktivnost SOD1 i višestruko povećava aktivnost CAT (Oreščanin-Dušić i sar. 2018). Kontraktilna tkiva su osetljiva na promenu koncentracije ATP i pražnjenje rezervi energije može da dovede do narušavanja pravilnog ritma kontrakcija kao i do reverzibilne inhibicije kontraktilne aktivnosti. Poznato je da vanćelijski ATP stimuliše kontraktilnu aktivnost uterusa pacova ali mehanizam ove pojave nije detaljno ispitan (Zafrah i Alotaibi 2017), dok je na distalnom kolonu miša pokazano da ATP doprinosi ekscitatornoj neurotransmisiji delujući direktno na glatke mišićne ćelije preko P2Y receptora (Zizzo i sar. 2008). Dakle, promene kontraktilne aktivnosti uterusa u prisustvu ibogaina bi mogle biti delimično uzrokovane eksternalizacijom, pražnjenjem rezervi ili narušavanjem metabolizma ATP. Takođe, različita kontraktilna tkiva, uključujući i miometrijum uterusa, su osetljiva na promene ćelijskog redoks stanja i nivoa ROS pa bi smanjenje kontraktilne aktivnosti moglo biti uzrokovano porastom količine ROS a naročito H₂O₂ (Warren i sar. 2005; Appiah i sar. 2009; Appiah i sar. 2012). Šta više, antioksidativni enzim SOD1 može da utiče na kontraktilnost glatkih mišića u uterusu (Nikolić-Kokić i sar. 2015b). Sve ovo nam ukazuje da potrošnja i proizvodnja energije u ćelijama, redoks modifikacije koje su sa njom povezane, kao i sistem antioksidativne zaštite predstavljaju deo funkcionalne celine koja utiče na kontraktilnu aktivnost glatkih mišića. Osim toga proizvodnja ROS, koja nastaje nakon pražnjenja rezervi ATP, i njihova unutarćelijska

cirkulacija podrazumevaju različite korake u koje su uključeni i K_{ATP} kanali (Daiber 2010). Dakle, pražnjenje rezervi ATP i aktiviranje signalnih puteva povezanih sa purinergičkim receptorima i K_{ATP} kanalima utiče na fluks Ca^{2+} (Ivanova i sar. 2014) a to bi mogao da bude put kojim ibogain dovodi do promena u kontraktilnoj aktivnosti glatkih mišića uterusa, kao i promena u redoks homeostazi i aktivnosti antioksidativnih enzima.

Naša prethodna istraživanja *in vivo* na mužjacima pacova koji su tretirani jednom oralnom dozom ibogaina (1 ili 20 mg/kg telesne mase) su pokazala sistemski uticaj na energetski metabolizam i redoks balans, ali bez ozbiljnih toksičnih efekata. Obe doze ibogaina su dovele do značajne glikogenolitičke aktivnosti u hepatocitima 6 i 24 sata nakon primene što ukazuje na intenzivnu sistemsku potrošnju glukoze. Doza od 1 mg/kg nakon 6 sati je dovela do povećanja koncentracije TBARS, što ukazuje na blagi prooksidativni efekat, ali ovo nije bilo praćeno sistematskim promenama u aktivnosti antioksidativnih enzima. U isto vreme u jetri nisu zabeležene nikakve histopatološke promene ali je zabeleženo prisustvo blagog oksidativnog stresa 24 sata nakon tretmana ibogainom (Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Vidonja Uzelac 2019). U bubrezima je došlo do promena u aktivnosti antioksidativnih enzima kao i do umerenih promena u morfologiji proksimalnih tubula (Vidonja Uzelac i sar. 2019b; Vidonja Uzelac 2019). Na osnovu analize urina moglo bi se zaključiti da ove promene nisu dovele do narušavanja funkcije jetre i bubrega. U ranije navedenim *ex vivo* i *in vitro* eksperimentima primenjene koncentracije ibogaina su bile veće od onih izmerenih u ovom *in vivo* eksperimentu na mužjacima 6 i 24 sata nakon oralne primene, u kom pro-antioksidativna svojstva ibogaina nisu jasno pokazana.

1.3. Eksperimentalni modeli

1.3.1. *In vivo*

Laboratorijski pacov vrste *Rattus norvegicus* je uobičajeni životinjski model u fiziologiji i biomedicini. U ovom istraživanju su korišćene ženke soja *Wistar* (RRID:RGD_13508588). To je autbredovani albino soj koji se koristi kao višenamenski model duže od sto godina.

Reproduktivni ciklus (estrusni ciklus) ženki laboratorijskih pacova uglavnom traje 4-5 dana i uobičajeno se deli u 4 faze: proestrus, estrus, metestrus (ili diestrus I) i diestrus (ili diestrus II), mada ga neki autori dele u 5 faza. Proestrus i estrus približno traju po 12 sati, metestrus traje oko 21 sat a diestrus oko 57 sati (Paccola i sar. 2013). Faza ciklusa se može odrediti pregledom vaginalnog brisa. Ovaj način određivanja faze estrusnog ciklusa se zasniva na razlikama u morfologiji epitelnih ćelija i prisustvu leukocita i drugih ćelija u brisu tokom različitih faza ciklusa (Marcondes i sar. 2002; Hubscher i sar. 2005). Tokom estrusnog ciklusa dolazi do promena u lučenju polnih hormona u jajnicima i hipofizi: estrogena, progesterona, FSH, LH i prolaktina, koje dovode do sveobuhvatnih fizioloških efekata, između ostalog i na energetski metabolizam (Parker i sar. 2001) i metabolizam lekova (Brandstetter 1986).

1.3.2. *Ex vivo*

Razvoj tehnike izolovanih tkiva u dvadesetom veku doveo je do revolucije u farmakologiji koja se do tada zasnivala na deskriptivnim i anegdotskim prikazima delovanja lekova. Do tada su se istraživanja farmakoloških osobina lekova i drugih hemijskih supstanci zasnivala na istraživanjima *in vivo*, koja su imala čitav niz ograničenja. Bilo je teško odrediti tačnu koncentraciju leka u ciljnom tkivu, kao i tačan odgovor na izlaganje leku. Zbog toga je bilo nemoguće uspostaviti kvantitativni odnos između leka i efekta do kog on dovodi. Drugo, uočeni odgovor celog organizma na ispitivani lek je kombinacija originalnog odgovora izazvanog vezivanjem leka za receptor u ciljnim tkivima i reakcije ostalih tkiva, odnosno celog organizma na nastalu promenu. Tehnika izolovanih tkiva donela je istraživačima mogućnost da kontrolišu koncentraciju leka u ciljnom tkivu i da mere direktne efekte vezivanja leka za receptor (Kenakin 2002).

1.3.2.1. Glatki mišići

Glatki mišići se na osnovu strukturne i funkcionalne povezanosti ćelija dele na jednojedinичne (sinonimi: sincicijalni, visceralni) koji grade mišićne slojeve većine unutrašnjih organa uključujući uterus i većinu krvnih sudova, i višejedinичne koji su prisutni u velikim elastičnim arterijama, traheji, irisu oka i erekтору dlake (Sherwood 2016; Hall i Hall 2020). Jednojedinичni mišići poseduju pejsmejkerske regione i funkcionišu kao celina zahvaljujući velikom broju pukotinastih veza kroz koje se akcioni potencijal širi na susedne ćelije. U višejedinичnim mišićima ćelije funkcionišu nezavisno jedne od drugih što omogućava finu kontrolu i postepene odgovore na stimulse (Carroll 2007; Feher 2017). Na osnovu tipa kontraktilne aktivnosti glatki mišići se dele na tonične koji se kontrahuju i opuštaju sporo (glatki mišići u krvnim sudovima) i fazne koji se kontrahuju i opuštaju brže (glatki mišići u uterusu).

Kontraktilna aktivnost glatkih mišića može biti neurogena (pod kontrolom autonomnog nervnog sistema), miogena (izazvana spontanom generisanjem akcionog potencijala u pejsmejkerskim ćelijama, prisutna u nekim jednojedinичnim glatkim mišićima), izazvana/modulisana različitim humoralnim agensima (endokrinim ili parakrinim) ili mehaničkim stimulusima (istezanje). Za razliku od poprečno-prugastih mišića u glatkim mišićima jedan isti stimulus može imati i ekscitatorni i inhibitorni efekat u zavisnosti od zastupljenosti različitih tipova receptora u konkretnom glatkom mišiću. Na primer, adrenalin može da izazove kontrakciju preko inozitol 1,4,5-trisfosfata (IP3) ili relaksaciju preko cAMP. Bez obzira na vrstu stimulusa akcioni potencijal (ili potencijal veze u višejedinичnim glatkim mišićima) je izazvan influsom Ca^{2+} a ne Na^{+} . Naime, lokalna depolarizacija plazma membrane otvara L-tip Ca^{2+} kanala u kaveolama. Porast unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} stimuliše oslobađanje Ca^{2+} iz sarkoplazmatičnog retikuluma preko IP3 i rijanodinskih receptora. Ova pojava se naziva oslobađanje kalcijuma indukovano kalcijumom. Osim toga, indukcija kontrakcije glatke mišićne ćelije može da se ostvaruje i paralelnim mehanizmom koji je nezavisan od akcionog potencijala ili potencijala veze, odnosno nezavisan od promene potencijala mirovanja plazma membrane. U tom slučaju ekscitatorni neurotransmiteri aktiviraju G protein koji aktivira fosfolipazu C što povećava koncentraciju IP3 i indukuje oslobađanje kalcijuma iz sarkoplazmatičnog retikuluma (SR) (Bolton i Large 1986). Ca^{2+} se u citoplazmi vezuje za kalmodulin (četiri jona Ca^{2+} za jedan molekul kalmodulina) koji dalje aktivira enzim kinazu lakog lanca miozina (MLCK, eng. myosin light chain kinase). MLCK katalizuje fosforilaciju lakog lanca miozina što dovodi do promene konformacije, povećanja ATP-azne aktivnosti i interakcije između miozina i aktina (Hafen i Burns 2023). Visoka koncentracija Ca^{2+} aktivira i rho-kinazu koja fosforiliše enzim fosfatazu lakog lanca miozina (MLCP, eng. myosin light chain phosphatase) i na taj način inhibira njenu aktivnost, odnosno sprečava defosforilaciju lakog lanca miozina (MLC, eng. myosin light chain). Kontraktilni aparat razvija tenziju koja je proporcionalna koncentraciji Ca^{2+} u citoplazmi. Intenzitet ATP-azne aktivnosti u glatkim mišićnim ćelijama je mnogo manji nego u poprečno-prugastim. Zbog toga su kontrakcije sporije ali mogu da traju mnogo duže. Kontrakcija glatkog mišića se prekida defosforilacijom MLC. Relaksacija može biti uzrokovana prestankom stimulusa koji je indukovao kontrakciju ili delovanjem stimulusa koji inhibira kontrakciju kao što su NO, H_2O_2 , prostaciklin PGI_2 i drugi. U oba slučaja proces relaksacije zahteva smanjenje koncentracije kalcijuma u citosolu koji se aktivno transportuje pomoću Ca,Mg-ATPaza koje se nalaze u plazma membrani i sarkolemi, a takođe i putem Na^{+}/Ca^{2+} izmenjivača u plazma membrani. Za to vreme ligand zavisni i voltažno zavisni kanali za Ca^{2+} u plazma membrani su zatvoreni (Webb 2003). Za razliku od poprečno-prugastih mišića, smanjenje koncentracije Ca^{2+} samo po sebi ne dovodi do relaksacije već je za to odgovoran enzim MLCP koji je aktivan pri niskoj koncentraciji kalcijuma (Hafen i Burns 2023).

Potrošnja kiseonika u glatkim mišićima je mala u poređenju sa drugim tipovima mišića. Pri umerenoj kontraktilnoj aktivnosti energetski metabolizam lako zadovoljava potrebe za ATP, odnosno ne dolazi do velikog porasta u potrošnji kiseonika (Wray i Prendergast 2019). Energetski

metabolizam glatkih mišićnih ćelija odlikuje nekoliko razlika u odnosu na druge tipove ćelija, a najveća je visok nivo kompartmentalizacije. Naime, energija odnosno ATP potreban za rad kontraktilnog aparata se dobija oksidativnom fosforilacijom dok se ATP potreban za regulisanje koncentracije jona, a naročito za rad Na,K ATPaze, dobija anaerobnim metabolizmom (Lynch i Paul 1986; Paul i sar. 1984). Glikolitički enzimi su vezani za plazma membranu preko F-aktina i postoji direktna interakcija između glikolitičkih enzima i subjedinića Na,K ATPaze i H-ATPaze (Dhar-Chowdhury i sar. 2007; Wray i Prendergast 2019).

U uslovima homeostaze, koncentracije jona (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , H^+ itd.) sa različitih strana bioloških membrana se razlikuju i formiraju jonski gradijent putem aktivnog transporta, što omogućava brz i manje ili više selektivan transport jona niz elektrohemijski gradijent. Jonski kanali su veoma raznovrsni, učestvuju u ogromnom broju raznovrsnih bioloških procesa i predstavljaju najčešće polje istraživanja u potrazi za novim lekovima. Raznovrsnost jonskih kanala je veoma velika. Samo u jednom tipu ćelije može postojati više od 300 različitih tipova (Gabashvili i sar. 2007). Jonski kanali su klasifikovani na osnovu vrste jona koju provode, na osnovu prirode njihovog otvaranja i zatvaranja, kao i na osnovu broja kapija, odnosno pora. Na osnovu vrste jona koje provode dele se na: kalijumove, natrijumove, kalcijumove, hloridne, protonske i neselektivne katjonske kanale. Na osnovu aktivacije dele se na: voltažno-zavisne, ligand-zavisne i na kanale koji se aktiviraju na druge načine. Ime kanala se sastoji od glavnog jona koji kanal provodi (npr. Na) i glavnog fiziološkog regulatora koji je označen u supskriptu (npr. Nav). Sledi broj koji označava podfamiliju gena (npr. Nav1) i još jedan broj koji označava izoformu (npr. Nav1.1). Na kraju se nalazi slovo koje označava varijantu alternativnog iskrajanja primarnog transkripta (npr. Nav1.1a) (Chandy i Gutman 1993).

ATP-zavisni kalijumovi kanali (K_{ATP}) — K_{ATP} su najrasprostranjenija grupa kalijumovih kanala, koji ujedno najviše doprinose potencijalu mirovanja glatkih mišićnih ćelija (Teramoto 2006). K_{ATP} kanali provode slabu ulazno-ispravljačku struju kalijuma i pripadaju K_{ir} (eng. inwardly rectifying K^+ channel) superfamiliji kalijumovih kanala. Ovi kanali su heterooktamerni kompleksi sačinjeni od: ulazno-ispravljačkog K^+ kanala – K_{ir} koji se sastoji od 4 Kir6.x subjedinića (Kir6.1 ili Kir6.2 koje su kodirane genima KCNJ8 i KCNJ11), kao i od 4 regulatorne SURx (eng. sulphonylurea receptor subunit) subjedinića (subfamilija C: SUR1 , SUR2A ili SUR2B) koje vezuju sulfonilureu i koje su odgovorne za osetljivost na ATP i farmakološke karakteristike kanala (Inagaki i sar. 1995; Isomoto i Kurachi 1997; Aguilar-Bryan i sar. 1998; Szeto i sar. 2018). Ove subjediniće su različito eksprimirane u različitim tipovima ćelija pa se tako razlikuje i osetljivost ovih kanala na različite ligande (Szeto i sar. 2018). Upravo kompleksnost građe K_{ATP} kanala i tkivno-specifična ekspresija otežavaju proučavanje fiziološke funkcije i funkcionalnih osobina određenih podtipova kanala (Shyng 2022). U glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova K_{ATP} kanali se sastoje od $\text{Kir6.1}/\text{SUR2B}$ subjedinića (Li i sar. 2003), u endotelu arterija $\text{Kir6.1}/\text{Kir6.2}/\text{SUR2B}$ (Yoshida i sar. 2004; Aziz i sar. 2018), a u miometriju uglavnom od $\text{Kir6.1}/\text{Kir6.2}/\text{SUR1}/\text{SUR2B}$ (Curley i sar. 2002; Xu i sar. 2011; Hong i sar. 2016).

ATP se vezuje kada se kanali nalaze i u otvorenom i u zatvorenom stanju. Vezivanje ATP u bilo kom od ova dva stanja smanjuje prosečno vreme u zatvorenom stanju, smanjuje prosečno trajanje serija i povećava frekvenciju i trajanje zatvorenog stanja između serija. K_{ATP} kanali su spontano aktivni u odsustvu ATP. Za kinetiku pojedinačnih kanala su karakteristične serije kratkih otvaranja i zatvaranja, i dugački intervali odsustva provodljivosti, tj. zatvorenog stanja. ATP utiče na sva navedena stanja, odnosno redukuje trajanje serija i produžava trajanje zatvorenog stanja. Kada je kanal otvoren ATP se vezuje za svoje vezivno mesto sa konstantom disocijacije (K_d) oko $300 \mu\text{M}$. Pošto jedan kanal poseduje 4 vezivna mesta ukupna konstanta disocijacije iznosi oko $75 \mu\text{M}$. To znači da će u intaktnim ćelijama, u kojima je koncentracija ATP od 1 do 10 mM, otvoreni kanal imati ATP vezan za Kir6.2 tokom većeg dela vremena (Craig i sar. 2008).

K_{ATP} kanali su sveprisutni u plazma membrani ćelija u mnogim organima i imaju važnu ulogu u regulaciji ćelijskih funkcija u odgovoru na metaboličke potrebe ćelije. ATP ih inhibira a Mg-ADP aktivira što omogućava ćelijama da povežu električnu aktivnost ćelijske membrane sa trenutnim metaboličkim statusom, tj. odnosom ATP/ADP (Szeto i sar. 2018; Shyng 2022). Na provodljivost K_{ATP} kanala utiču i neke druge endogene supstance i do sada je pronađeno nekoliko endogenih „otvarača”: agonisti β -adrenergičkih receptora, relaksin, kao i drugi relaksanti uterusa koji dovode do povećanja unutarćelijskog cAMP. cGMP, i agensi koji generišu cGMP poput NO dovode do relaksacije. Kritični sulfhidrilni ostaci su glavna regulatorna mesta koja posreduju u modulaciji ROS-om, kao i NO-om (Gaston 1999; Fernhoff i sar. 2009). H_2O_2 dovodi do otvaranja K_{ATP} kanala, dok povećanje koncentracije ATP sprečava ovakav efekat peroksida (Filipović i Reeves 1997).

K_{ATP} kanali učestvuju u regulisanju kontraktilne aktivnosti glatkih mišićnih ćelija u uterusu i krvnim sudovima. Otvaranje K_{ATP} kanal inhibira spontanu kontraktilnu aktivnost trudnog i netrudnog miometrijuma (Xu i sar. 2011; Hong i sar. 2016). K_{ATP} kanali u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova učestvuju u regulisanju njihovog tonusa. Vazodilatatori, kao što su adenozin i beta-agonisti, povećavaju a vazokonstriktori smanjuju aktivnost K_{ATP} kanala preko PKC signalnog puta.

Mitohondrijski ATP-zavisni kalijumovi kanali (mito K_{ATP}) — Mito K_{ATP} se nalaze u unutrašnjoj membrani mitohondrija i smatra se: da imaju ulogu senzora za ROS; da regulišu proizvodnju ROS u mitohondrijama putem modulisanja bioenergetike; i da pokreću određene ROS signalne puteve kao što je aktiviranje PKC preko povećanja koncentracije H_2O_2 (Facundo i sar. 2007; Alberici i sar. 2009; Garlid i sar. 2009; Akopova 2017). U unutrašnjoj membrani mitohondrija nema Na^+ kanala ali se u njoj nalazi set K^+ kanala koji su u biofizičkom i farmakološkom smislu veoma slični onima u plazma membrani. Regulisani su na sličan način kao kanali u plazma membrani ali su primećeni i regulatorni mehanizmi specifični za mitohondrije kao što je strukturna i funkcionalna veza sa lancem transporta elektrona (Laskowski i sar. 2016). Lanac transporta elektrona u unutrašnjoj membrani mitohondrija ubacuje protone u međumembranski prostor i tako stvara električni potencijal membrane. Membranski potencijal pokreće inluks K^+ , tj. prelazak K^+ iz međumembranskog prostora u matriks, na dva načina: difuzijom, odnosno „curenjem K^+ ” (Garlid i sar. 1989) i putem mito K_{ATP} kanala. Ovakva razmena H^+ i K^+ povećava pH matriksa zbog čega fosfati ulaze u matriks preko elektroneutralnog Pi/OH^- antiportera. Povećanje koncentracije K^+ u matriksu je praćeno osmozom pa dolazi do povećanja zapremine matriksa. Višak K^+ se iz matriksa uklanja na regulisan način putem K^+/H^+ antiportera i tako se uspostavlja novo ravnotežno stanje u kom su zapremina i pH matriksa nešto veći, što značajno utiče na funkcionisanje mitohondrija (Halestrap 1989; Garlid i Paucek 2003; Garlid i Halestrap 2012). Naime transport K^+ kroz unutrašnju membranu mitohondrija doprinosi regulaciji membranskog potencijala, intenziteta ćelijskog disanja, transporta Ca^{2+} , sinteze ROS i redoks signalizacije (Szabo i Zoratti 2014). Zbog toga transport K^+ kroz kanale u unutrašnjoj membrani mitohondrija mora biti precizno kontrolisan kako bi se očuvao metabolizam mitohondrija i energetska homeostaza.

Poznato je da ATP, proizvod oksidativne fosforilacije, inhibira aktivnost mito K_{ATP} i dekoplujućeg proteina (UCP, eng. uncoupling protein). Dakle, u fiziološkim uslovima pri normalnom intenzitetu proizvodnje ATP i u prisustvu umerene koncentracije ROS, mito K_{ATP} i UCP su verovatno inhibirani i tako omogućavaju efikasnu sintezu ATP (Laskowski i sar. 2016). Sa druge strane, na različitim eksperimentalnim modelima je pokazano da u uslovima stresa, odnosno povećane proizvodnje ROS i narušene sinteze ATP, mito K_{ATP} se aktiviraju (Pastore i sar. 2007; Zhang i sar. 2001; Laskowski i sar. 2016) a takođe je pokazano da lipidni peroksidi, koji nastaju delovanjem ROS, aktiviraju UCP (Echtay 2007; Woyda-Ploszczyca i Jarmuszkiewicz 2013). Olakšan prolazak K^+ i H^+ niz elektrohemijski gradijent za posledicu ima smanjenje proizvodnje

ROS u mitohondrijama i uspostavljanje normalne sinteze ATP (Laskowski i sar. 2016). Sa druge strane, brojna istraživanja na različitim eksperimentalnim modelima su pokazala da otvaranje mitoK_{ATP} dovodi do povećanja proizvodnje ROS, između ostalog i u miometriju (Andrukhiv i sar. 2006; Oldenburg i sar. 2003; Tian i sar. 2003; Krenz i sar. 2002; Vadzyuk i Kosterin 2018). Obzirom na kontradiktorne rezultate dobijene proučavanjem različitih tkiva ne postoji način da se predvidi efekat otvaranja mitoK_{ATP} na proizvodnju ROS (Akopova 2017; Garlid 2000).

β-adrenergički receptori — Adrenergički receptori su metabotropni receptori, odnosno receptori vezani za G protein. Postoje dve glavne klase adrenergičkih receptora: α i β. α-adrenergički receptori se dele na dva glavna tipa: α1 i α2, koji su vezani za različite G proteine. β-adrenergički receptori se dele na tri glavna tipa: β1, β2 i β3. Endogeni ligandi adrenergičkih receptora su kateholamini: adrenalin, koji približno podjednako ekscituje α i β-adrenergičke receptore; i noradrenalin koji primarno ekscituje α-adrenergičke receptore ali u manjoj meri ekscituje i β-adrenergičke receptore (Hall i Hall 2020). β-adrenergički receptor se sastoji od jednog polipeptida koji formira sedam transmembranskih domena, tri unutarćelijske i tri vanćelijske petlje, vanćelijskog N-terminalnog domena i dugačkog unutarćelijskog C-terminalnog repa (Wallukat 2002). Glavni, ali ne i jedini mehanizam delovanja β-adrenergičkih receptora je aktiviranje adenilat ciklaze preko G_s proteina. Vezivanje adrenalina ili noradrenalina za β-adrenergički receptor izaziva, ili stabilizuje, promenu konformacije koja omogućava receptoru da aktivira G_s protein. GDP biva zamenjen GTP-om što dovodi do disocijacije heterotrimernog G proteina na G_{αs} subjedinicu i G_{βγ} kompleks (Bylund 2007). G_{αs} subjedinica aktivira adenilat ciklazu i dolazi do povećanja koncentracije sekundarnog glasnika cAMP-a. cAMP se vezuje za regulatornu subjedinicu protein kinaze A (PK-A) i dovodi do oslobađanja katalitički aktivne subjedinice. PK-A katalizuje fosforilaciju ostataka serina i treonina u mnogim proteinima i tako utiče na širok spektar procesa u živim ćelijama, od kontraktilne aktivnosti glatkih i srčanih mišićnih ćelija do ekspresije mnogih gena (Wachter i Gilbert 2012). β1-adrenergički receptori su primarno povezani sa G_s/adenilat ciklaza/PK-A signalnim putem, dok su β2-adrenergički receptori osim sa G_s, povezani i sa G_i signalnim putem, kao i sa funkcijama nezavisnim od G proteina kao što je regulacija Na⁺/H⁺ izmenjivača (Steinberg 1999; Wachter i Gilbert 2012). Tipični antagonist β1 i β2-adrenergičkih receptora je propranolol.

Sva tri tipa β-adrenergičkih receptora su eksprimirana u glatkim mišićima. Aktivacija β-adrenergičkih receptora dovodi do relaksacije glatkih mišića i smatra se da glavnu ulogu u ovom efektu ima cAMP-zavisni mehanizam. cAMP/PK-A-zavisni put sprečava aktivaciju kompleksa Ca²⁺-kalmodulin putem fosforilacije MLCK, kao i putem povećanja preuzimanja Ca²⁺ u SR preko PK-A-zavisne fosforilacije fosfolambdana. U nishodne efekte koje ovaj mehanizam aktivira spada i nekoliko tipova K⁺ kanala: veliki kalijumovi kanali koje aktivira Ca²⁺ (K_{Ca}1.1, BK ili Maxi-K), K_{ATP} kanali i K_{DR} kanali (eng. delayed rectified K⁺ channels). Takođe, relaksantni efekat β-adrenergičkih receptora može biti ostvaren i mehanizmima nezavisnim od cAMP-a, kao što je direktna interakcija G_{αs} subjedinice sa K_{Ca}1.1 kanalima u disajnim putevima (Scheid i sar. 1979; Barnes 1993; Tanaka i sar. 2005). U glatkim mišićnim ćelijama uterusa su prisutne obe klase adrenergičkih receptora. Stimulacija α-adrenergičkih receptora izaziva kontrakciju, a stimulacija β-adrenergičkih receptora relaksaciju uterusa (Bottari i sar. 1985). Što se tiče β klase, u uterusu su dominantno eksprimirani β2-adrenergički receptori, i utvrđeno je da oni imaju fundamentalnu ulogu u regulaciji mehaničke aktivnosti glatkih mišića u ovom organu (Tanaka i sar. 2005).

ROS i redoks regulacija predstavljaju važan, ali još uvek nedovoljno istražen aspekt funkcionisanja adrenergičkih receptora. Aktiviranje β-adrenergičkih receptora dovodi do povećanja aktivnosti NADPH oksidaze pa tako i povećanja proizvodnje ROS. Povećanje koncentracije ROS ima ulogu u nishodnoj signalizaciji, kao i u povratnoj sprezi koja reguliše fosforilaciju i internalizaciju samog receptora, što se postiže oksidativnim/nitrozativnim modifikacijama raznih regulatornih proteina (Vasudevan i sar. 2011). Sa druge strane, funkcija

β 2-adrenergičkih receptora može biti i direktno redoks regulisana. Naime, pokazano je da cisteinski ostaci mogu biti reverzibilno oksidovani do sulfenične kiseline (Cys-S-OH), kao i da redoks stanje receptora utiče na vezivanje liganda i prenos signala (Rambacher i Moniri 2020a; Rambacher i Moniri 2020b). Takođe, dugotrajna stimulacija β 1-adrenergičkih receptora dovodi do smanjenja proteinske ekspresije SOD1 (Srivastava i sar. 2007).

Purinergički receptori — Purini i njihovi derivati, naročito ATP, su ključni molekuli koji kontrolišu energetske homeostazu i sintezu nukleotida u ćelijama, ali takođe funkcionišu i kao signalni molekuli. Purinergički receptori su grupa transmembranskih proteina u plazma membrani koji se dele u dve glavne kategorije: P1 receptore za koje se vezuje adenzin, i P2 receptore za koje se vezuju vanćelijski nukleotidi (ATP, ADP, UTP i UDP). P1 i P2X su metabotropni receptori i mogu biti vezani za različite tipove G proteina, pa tako vezivanje liganda može da dovede do aktivacije ili inhibicije adenilat ciklaze, ili aktiviranja drugih puteva prenosa signala. P2Y receptori su ligand-zavisni homomultimerni ili heteromultimerni katjonski kanali (Sarıkaya 2020; Huang i sar. 2021).

Purinergički receptori koji posreduju u odgovoru na adenzin i adeninske nukleotide su prisutni u svim tipovima visceralnih glatkih mišića (Maguire i Satchell 1981). U krvnim sudovima, konkretno u malim pulmonarnim venama, ATP indukuje kontrakciju glatkih mišićnih ćelija koja je povezana sa vezivanjem za P2Y2 receptore i izazivanjem oscilacija Ca^{2+} (Henriquez i sar. 2018). Poznato je da vanćelijski ATP povećava jonsku provodljivost plazma membrane ćelija miometrijuma i kontraktilnu aktivnost uterusu. Takođe je poznato da su P2 receptori eksprimirani u miometrijumu. Miyoshi i sar. (2010, 2012) su pokazali da ATP ovakav efekat ostvaruje vezivanjem za P2X7 receptore koji funkcionišu kao neselektivni katjonski kanali, kao i da vanćelijski Mg^{2+} blokira efekat ATP (iz kliničke prakse je poznato da primena Mg^{2+} inhibira kontrakcije uterusu).

Purinergička signalizacija u određenim okolnostima može da utiče na redoks biologiju. Generalno, aktiviranje P2X receptora, naročito P2X7 i P2X4, ima važnu ulogu u proizvodnji ROS tokom inflamacije i infekcije. P2Y receptori takođe mogu da indukuju proizvodnju ROS i NO. Sa druge strane, aktivacija P2Y1 i P2Y11 može da ima antioksidativni efekat. Aktivaciju P2 receptora kontrolišu vanćelijski enzimi ektonukleotidaze koji katalizuju hidrolizu ATP preko ADP-a i AMP-a do adenozina. Oksidativni stres smanjuje aktivnost ovih enzima. Adenzin se vezuje za P1 receptore i njihova aktivacija generalno dovodi do smanjenja proizvodnje ROS i povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima, odnosno stimuliše održavanje redoks homeostaze (Savio i sar. 2021).

5-HT receptori — Serotonin (5-hidroksitriptamin; 5-HT) je indolaminski hormon i neurotransmiter. 5-HT receptori se nalaze u plazma membrani i membrani mitohondrija. Kod ljudi postoji 14 različitih podtipova 5-HT receptora. Jedan od njih (5-HT₃) je ligand-zavisni jonski kanal a svi ostali su vezani za G protein. Serotoninski sistem je jedan od evolutivno najstarijih hormonskih/neurotransmiterskih sistema, što bi moglo da objasni veliku raznovrsnost receptora kao i fizioloških funkcija u čijoj regulaciji učestvuje serotonin (Hoyer 2007; Nichols i Nichols 2008; Gresch 2013; Wang i sar. 2016).

U glatkim mišićima serotonin može da izazove i kontrakciju i relaksaciju u zavisnosti od podtipova prisutnih receptora. Tako je na primer pokazano da u uzdužnom glatkom mišiću u ileumu mačke, 5-HT₁ i 5-HT₄ receptori posreduju u kontrakciji, a 5-HT₂ i 5-HT₃ u relaksaciji (Wang i sar. 2011). Serotonin kontrahuje glatke mišiće u ljudskoj uterusnoj arteriji preko 5-HT₂ receptora (Karlsson i sar. 1997), a u jednaku pacova preko 5-HT₁ i 5-HT₂ (Eduard i sar. 2017). U ljudskom digestivnom sistemu 5-HT_{2B} povećavaju, a 5-HT₇ smanjuju, dok 5-HT₄ receptori mogu i da povećavaju i da smanjuju kontraktilnu aktivnost (Wouters i sar. 2007). Serotonin povećava pejsmejkersku aktivnost intersticijalnih Kavalovih ćelija preko 5-HT₃ receptora (Liu i sar. 2011).

U uterusu trudnih ljudi i pacova, serotonin stimuliše kontraktilnu aktivnost miometrijuma preko 5-HT₂. 5-HT₂ receptori su vezani za proteine iz G_{αq} porodice koji dovode do aktiviranja fosfolipaze C i porasta unutarćelijske koncentracije Ca²⁺ (Minosyan i sar. 2007; Cordeaux i sar. 2009).

Vezivanje serotonina za 5-HT_{1B} u glatkim mišićnim ćelijama pulmonarnih arterija dovodi do aktivacije NOX1 i povećanja proizvodnje ROS, odnosno oksidativnog stresa (Hood i sar. 2017). Slično tome, i anoreksigeni efekat serotonina je posredovan aktivacijom NOX i proizvodnjom ROS u hipotalamusu (Fang i sar. 2013). Pokazano je i da pod određenim uslovima aktivacija 5-HT_{1A} i 5-HT₄ receptora može da ima antioksidativni efekat (Collier i sar. 2012; Denysenko i sar. 2019).

1.3.2.2. Izolovane arterije

Izolovani krvni sudovi su jedno od najčešće korišćenih izolovanih tkiva u farmakologiji. Poseduju veliki broj različitih tipova receptora koji posreduju u kontrakciji (npr. 5-HT i α-adrenergički), relaksaciji (npr. β-adrenergički) i funkciji endotela (npr. acetilholinski). Pošto su glatki mišići u krvnim sudovima orjentisani u vidu koncentričnih krugova najpogodniji način za merenje tenzije je upotreba prstenastih preparata (Kenakin 1998).

Endotel nije prosta barijera između krvi i tkiva, već ima važnu ulogu u regulaciji tonusa krvnih sudova i u održavanju hemostaze. U endotelu se odvija čitav niz fizioloških procesa kao što su: 1) preuzimanje biološki aktivnih supstanci iz krvi, npr. noradrenalina i serotonina; 2) sinteza supstanci koje deluju vazodilatatorno, kao što su NO (prvobitno nazvan kao „endotelni faktor relaksacije“), endotelni hiperpolarizujući faktor (eng. EDHF, endothelium-dependent hyperpolarizing factor), prostaciklini, adenzin, ROS; 3) sinteza supstanci koje deluju vazokonstriktorno, npr. endotelini, tromboksan A₂, angiotenzin II; 4) aktiviranje vazoaktivnih prekursora, kao što je angiotenzin I; 5) regulisanje propustljivosti krvnog suda; 6) regulisanje aktivnosti trombocita. Od vazoaktivnih supstanci endotelnog porekla, najveći značaj za regulaciju tonusa krvnih sudova ima NO. NO je lipofilni gas koji nastaje delovanjem enzima endotelne NO sintaze (eNOS) u odgovoru na različite fizičke (npr. istezanje) i hemijske stimuluse (npr. acetilholin, citokini, faktori rasta proizvedeni u trombocitima, kao što je faktor rasta vaskularnog endotela). NO lako difunduje iz endotela i ima relativno kratak poluživot (u krvi oko 6 sekundi) tako da deluje uglavnom lokalno u tkivu u kom je nastao. U glatkim mišićnim ćelijama NO aktivira rastvorljivu guanilat ciklazu (sGC, eng. soluble guanylate cyclase). Porast koncentracije cGMP aktivira cGMP-zavisnu protein kinazu (PKG) koja na nekoliko načina dovodi do relaksacije glatkih mišićnih ćelija i smanjenja tonusa krvnog suda, npr. putem fosforilacije velikog broja proteina uključenih u regulaciju koncentracije Ca²⁺ i osetljivosti na Ca²⁺, ili hiperpolarizacijom membrane preko K⁺ kanala (Vanhoutte i sar. 2017; Krüger-Genge i sar. 2019; Hall i Hall 2020).

Polni hormoni imaju važnu ulogu u regulisanju tonusa krvnih sudova, naročito estrogen koji ostvaruje vazodilatatorni efekat interakcijom sa endotelom ili direktnim delovanjem na glatke mišićne ćelije u krvnim sudovima. Takođe, nedvosmisleno je pokazano da promene nivoa polnih hormona tokom reproduktivnog ciklusa imaju uticaj na efekte nekih endogenih i egzogenih vazoaktivnih supstanci. Ipak, za bolje razumevanje ove pojave su potrebna dodatna istraživanja (Haynes i sar. 2000; White 2002; Arnal i sar. 2010; Jaimes i sar. 2019).

1.3.2.3. Izolovani uterus

Uterus pacova je organ cevastog oblika koji se sastoji od dva roga koji se na distalnom kraju spajaju u cerviks. Uterus je izgrađen od tri sloja: perimetrijuma, miometrijuma i endometrijuma. Perimetrijum je spoljašnji vezivni sloj, odnosno perineum, koji obavija uterus. Miometrijum je srednji sloj u kom se nalaze glatki mišići i veliki krvni sudovi. Glatki mišići mogu da se kontrahuju fazno i tonično, i organizovani su u više slojeva i podslojeva a po pravcu pružanja se dele na uzdužne, kružne i kose. Endometrijum je mukozni sloj uterusa koji naleže na unutrašnju stranu miometrijuma. Ovaj sloj uterusa podleže najvećim promenama tokom estrusnog ciklusa, odnosno hipertrofira tokom sazrevanja jajnih ćelija i ovulacije (Wray i Prendergast 2019).

Miociti čine veliku većinu ćelija uterusa, više od 95%. Glatke mišićne ćelije uterusa su veoma slične glatkim mišićnim ćelijama u drugim tkivima. Ono po čemu se razlikuju su relativno velike dimenzije (dužina do 0,5 mm), jake struje Ca^{2+} i snažne kontrakcije. Miociti miometrijuma su povezani pukotinastim vezama koje im omogućavaju ektričnu sinhronizaciju. Uterus, odnosno miometrijum je miogeno tkivo sposobno da se spontano ritmički kontrahuje *in vivo* i *ex vivo* bez spoljašnje stimulacije ili nervne kontrole. Endokrini, parakrini i drugi faktori utiču na kontraktilnost miometrijuma. U dosadašnjim istraživanjima nisu identifikovane pejsmejkerske ćelije. Ni uklanjanje uterusa iz tela, niti izolovanje miometrijuma ili njegovo sečenje na male trake ne sprečava ritmičke kontrakcije. Čak i izolovani pojedinačni miociti mogu da imaju kontraktilnu aktivnost. Pretpostavlja se da oko jedne trećine miocita u uterusu poseduje endogenu pejsmejkersku aktivnost. Ovi miociti možda poseduju drugačiji set jonskih kanala koji uzrokuje nestabilnost membranskog potencijala i ritmičku depolarizaciju koja se brzo širi na susedne miocite preko pukotinastih veza. U miometrijumu je prisutan veliki broj različitih tipova jonskih kanala kao što su: L-tip Ca^{2+} kanala, T-tip Ca^{2+} kanala (njegov značaj je upitan), voltažno-zavisni kalijumovi kanali (K_v), visokoprovodljivi voltažno-zavisni i Ca^{2+} -zavisni kalijumovi kanali (BK), maloprovodljivi Ca^{2+} -zavisni kalijumovi kanali (SK) i ATP-zavisni kalijumovi kanali (K_{ATP}), kalijumovi kanali koji se aktiviraju istezanjem (KCNK), hloridni kanali aktivirani kalcijumom (CaCC), voltažno-zavisni Na^+ kanali (VGSC), Na,K ATPaza, nespecifični katjonski kanali (TRCP). Različiti G proteinski receptori (GRCP) koji preko fosfolipaze C (PLC) stvaraju IP3 i doprinose depolarizaciji i stimulišu ulazak Ca^{2+} u citoplazmu. Postoji mogućnost koja još uvek nije dokazana da je prisustvo brzih Na^+ kanala u jednom delu miocita odgovorno za njihovu spontanu pejsmejkersku aktivnost (Wray i Prendergast 2019).

Obzirom na kompartmentalizaciju energetskog metabolizma glatkih mišićnih ćelija, fazne kontrakcije uterusa dovode do cikličnih promena u sadržaju visokoenergetskih fosfata (ATP i fosfokreatin), laktata i pH. Na piku kontrakcije visokoenergetskih fosfata je sve manje, laktata sve više i pH postaje sve kiseli pa kontrakcija počinje da slabi. Ovo zajedno sa promenama ekscitabilnosti i inaktivacijom L-tipa Ca^{2+} kanala dovodi do prestanka fazne kontrakcije. Tokom perioda mirovanja između dve kontrakcije ATP, fosfokreatin, laktat i pH se vraćaju na prethodni nivo (Wray i Prendergast 2019). Mitohondrije se nalaze u blizini nukleusa i granuliranog endoplazmatičnog retikuluma ili uz sarkolemu blizu kaveola (Gam i sar. 2017). Osim očiglednog značaja za energetski metabolizam, odnosno oksidativnu fosforilaciju, mitohondrije su važne i za regulisanje unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} (McCarron i Muir 1999) interaguju i mogu da se vezuju za SR (Rizzuto i sar. 1998; Csordás i sar. 2006) i mogle bi da imaju važnu ulogu u modulisanju spontane aktivnosti uterusa pacova (Gravina i sar. 2010). Kontraktilna aktivnost miometrijuma je i redoks regulisana. Na primer, izlaganje izolovanog uterusa pacova prilično visokim koncentracijama H_2O_2 dovodi do prolazne inhibicije faznih kontrakcija, najverovatnije putem oksidacije unutarćelijskih tiolnih grupa na K_v kanalima (Appiah i sar. 2009; Appiah i sar. 2012).

Promene faza estrusnog ciklusa su praćene umerenim promenama u ekscitabilnosti i kontraktilnosti uterusa (Wray i Noble 2008). Spontana električna aktivnost i mehanička aktivnost u uzdužnim mišićima uterusa *in vivo* variraju tokom reproduktivnog ciklusa (Talo i Kärki 1976; Ishikawa i Fuchs 1978; Wray i Noble 2008). Literaturni podaci o spontanoj kontraktilnoj aktivnosti uterusa pacova *ex vivo* u različitim fazama estrusnog ciklusa su malobrojni (Downing i sar. 1981; Vedernikov i sar. 2003; Wray i Noble 2008) ali je poznato da osetljivost kontraktilnog odgovora na različite agoniste, serotonin između ostalih, varira u zavisnosti od faze ciklusa (Oropeza i sar. 2000). Osim na kontraktilnu aktivnost, polni hormoni utiču i na redoks ravnotežu u uterusu pacova (Gómez-Zubeldia i sar. 2002).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1) **Odrediti koncentracije ibogaina i njegovog primarnog metabolita noribogaina u krvnoj plazmi ženki pacova nakon jednokratnog *per os* tretmana ibogainom.**

U *in vivo* eksperimentu, pacovi su tretirani dozama od 1 mg/kg i 20 mg/kg, i žrtvovani nakon 6 ili 24 sata. Prethodna istraživanja su pokazala da je biološka raspoloživost ibogaina veća kod ženki pacova nego kod mužjaka. Pošto literaturni podaci o uporednoj farmakokinetici i biološkoj raspoloživosti ibogaina kod mužjaka i ženki pacova nisu dovoljno detaljni i sveobuhvatni, u ovom istraživanju smo izmerili koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi, u cilju boljeg razumevanja rezultata *in vivo* eksperimenta.

2) **Ispitati efekte ibogaina na energetske metabolizam, enzimski sistem antioksidativne zaštite i pokazatelje oksidativnih oštećenja u različitim tkivima ženki pacova nakon jednokratnog *per os* tretmana.**

Prethodna istraživanja na različitim eksperimentalnim modelima su pokazala da ibogain utiče na energetske metabolizam i redoks ravnotežu. Kod mužjaka pacova, pri istim eksperimentalnim uslovima kao u ovom istraživanju, ibogain je izazvao smanjenje količine glikogena u jetri, kao i narušavanje redoks homeostaze u raznim tkivima. Pošto je biološka raspoloživost ibogaina veća kod jedinki ženskog pola, kao i zbog generalnih polnih razlika u metabolizmu i neželjenim efektima farmakološki aktivnih supstanci, ispitali smo efekte ibogaina na količinu glikogena u jetri, aktivnost enzima SOD1, SOD2, CAT, GSH-Px, GR, GST, XO i koncentraciju neproteinskih i slobodnih proteinskih -SH grupa i TBARS u eritrocitima, jetri, bubrezima, srcu, ileumu, uterusu, plućima, slezini i mozgu ženki pacova.

3) **Ispitati efekte ibogaina na histomorfologiju jetre, bubrega i srca ženki pacova nakon jednokratnog *per os* tretmana.**

Ibogain se primarno metaboliše u jetri i izlučuje putem urina i fecesa. Najčešći smrtni ishodi nakon primene ibogaina se vezuju za prestanak rada srca, ali i bubrega. Biološka raspoloživost ibogaina je veća kod jedinki ženskog pola, a takođe jedinke ženskog pola su sklonije neželjenim reakcijama na farmakološki aktivne supstance. Zbog toga smo ispitali postojanje histopatoloških pomena u tkivu jetre, bubrega i miokarda.

4) **Ispitati neposredne vazoaktivne efekte ibogaina na izolovane krvne sudove pacova, kao i mogućnost posrednog efekta putem oslobađanja ATP iz eritrocita.**

Najozbiljniji neželjeni efekti ibogaina su vezani za kardiovaskularni sistem. Iako se veliki broj istraživanja bavio efektima ibogaina na srce, odnosno na izazivanje aritmija i srčanog zastoja, podaci o efektima ibogaina na cirkulaciju, odnosno na tonus krvnih sudova skoro da ne postoje. Zbog toga smo ispitali efekte ibogaina na tonus izolovane torakalne aorte i mezenterične arterije, koji su posredovani endotelom, kao i one koji se ostvaruju direktnim delovanjem na glatke mišićne ćelije. Pošto je u istraživanju *in vitro* pokazano da ibogain dovodi do oslobađanja ATP iz eritrocita u plazmu, u ovom istraživanju smo ispitali efekat odgovarajućih koncentracija ATP na tonus izolovane torakalne aorte.

5) **Ispitati mehanizme uticaja ibogaina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova.**

U našem prethodnom istraživanju je pokazano da ibogain u niskim koncentracijama stimuliše a u visokim inhibira kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova. Pretpostavljeno je da bi ove promene u kontraktilnoj aktivnosti mogle da budu

posredovane promenama u koncentraciji ATP i H₂O₂. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita da li su stimulatorni i inhibitorni efekti ibogaina posredovani povećanjem vanćelijske koncentracije ATP, odnosno povećanjem unutarćelijske koncentracije H₂O₂, ili direktnim interakcijama sa receptorima pre svega serotoniniskim.

6) Ispitati mehanizme uticaja ibogaina na enzimski sistem antioksidativne zaštite u izolovanom uterusu pacova.

U našem prethodnom istraživanju na izolovanom uterusu pacova pokazano je da ibogain dovodi do promena u aktivnosti antioksidativnih enzima (pre svega do višestrukog povećanja aktivnosti CAT, ali i do povećanja aktivnosti GSH-Px i smanjenja aktivnosti SOD) koje ukazuju na prisustvo visoke koncentracije H₂O₂ u sistemu. Zbog velikog potencijalnog značaja uočenog efekta za redoks regulaciju cilj ovog istraživanja je bio da se ispitaju signalni putevi, odnosno receptori/jonski kanali uključeni u ovu pojavu.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Laboratorijske životinje

Svi eksperimentalni postupci koji podrazumevaju upotrebu laboratorijskih životinja su sprovedeni u skladu sa Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u eksperimentalne i druge naučne svrhe, i odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” broj 06-10/15. Korišćene su zdrave ženke pacova soja Wistar (RRID: RGD_13508588), telesne mase 175–250 g, gajene u uobičajenim uslovima: tri životinje u kavezu, temperatura 22–24 °C, režim osvetljenja 12 sati svetlo/12 sati mrak, sa neograničenim pristupom vodi i hrani (standardna hrana za laboratorijske glodare). Pre bilo kakvih eksperimentalnih postupaka, bilo *in vivo* ili *ex vivo*, utvrđena je faza estrusnog ciklusa u kojoj se svaka životinja nalazila.

3.1.1. Određivanje faze estrusnog ciklusa

Vaginalni bris je uziman staklenom pipetom sa oblim vrhom napunjenom sa 0,2 ml destilovane vode. Nakon nanošenja na predmetno staklo i sušenja, bris je bojen hematoksinom. Brisevi su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom i faza estrusnog ciklusa je određivana na osnovu zastupljenosti tri tipa ćelija: epitelnih ćelija ovalnog oblika sa jasno vidljivim jedrom; kornifikovanih (skvamoznih) ćelija ljuspastog oblika bez vidljivog jedra; i leukocita. U proestrusu su pretežno prisutne ovalne epitelne ćelije sa vidljivim jedrima, u estrusu kornifikovane ćelije, u meta-estrusu su prisutna sva tri tipa ćelija, dok su u diestrusu pretežno prisutni leukociti, mada su prisutne i kornifikovane i ovalne epitelne ćelije sa vidljivim jedrom (Marcondes i sar. 2002).

3.2. Hemikalije

U izradi disertacije je korišćen ibogain hidrohlorid (PubChem CID: 197059) čistoće 99,9% (Remøgen, Phytostan Enterprises Inc.) koji je obezbedila prof. dr Mara Bresjanac u okviru LNPR projekta finansiranog iz ARRS Programa P3-0171 (Slovenija), kao i ibogain hidrohlorid čistoće 98,93% koji je obezbedio dr Roman Paškulin (Slovenija). Za potrebe većine eksperimenata (*in vivo*, *ex vivo* na izolovanim krvnim sudovima i većina eksperimenata na izolovanom uterusu) ibogain je rastvoren u dH₂O snažnim vorteksovanjem (koncentracija štoka 2 mg/ml) i čuvan zaštićen od svetla i visoke temperature. Za potrebe jednog od eksperimenata na izolovanom uterusu (poređenje efekata ibogaina i ketanserina) ibogain je rastvaran u DMSO.

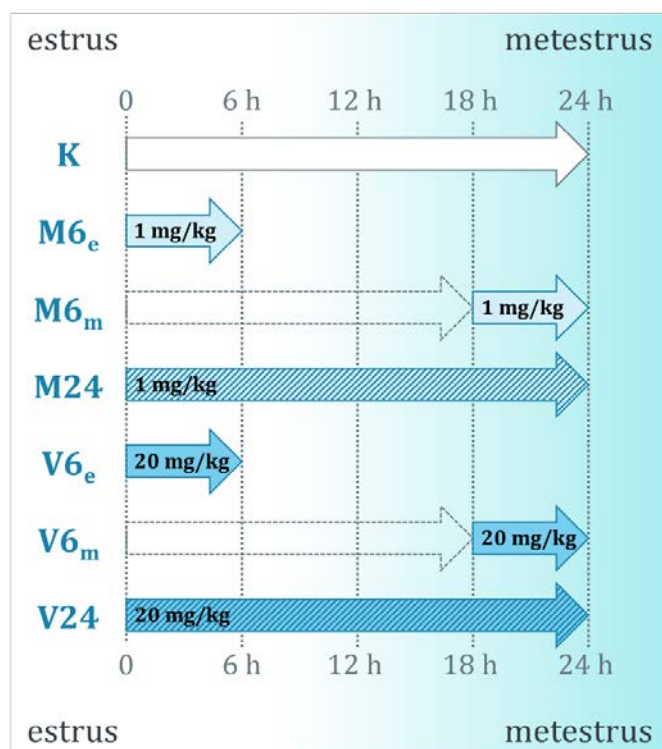
U *ex vivo* eksperimentima su korišćeni: ketanserin (+)-tartarat (PubChem CID: 24278121) čistoće ≥97%, proizvođač Sigma-Aldrich, broj proizvoda S006; (±)-propranolol hidrohlorid (PubChem CID: 62882) čistoće ≥99%, proizvođač Sigma-Aldrich, broj proizvoda P0884; i glibenklamid (PubChem CID: 3488) čistoće ≥99%, proizvođač Sigma-Aldrich, broj proizvoda G0639.

3.3. *In vivo* eksperiment

Svi eksperimentalni postupci, odnosno način tretmana (*per os*), doze (1 i 20 mg/kg) i trajanje (6 i 24 sata) tretmana, način izolovanja i pripreme tkiva, kao i sve biohemijske i histološke analize u ovom eksperimentu su izvedeni na isti način kao u prethodnom eksperimentu na mužjacima pacova (Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Vidonja Uzelac i sar. 2019b; Vidonja Uzelac 2019).

3.3.1. Dizajn eksperimenta

Imajući u vidu da metabolizam ženki pacova varira tokom reproduktivnog ciklusa (Parker i sar. 2001), a takođe i metabolizam lekova (Watanabe i sar. 1997), jedan od zadataka ovog eksperimenta je bio da eliminiše taj izvor varijabilnosti tako što bi sve životinje bile tretirane u istoj fazi ciklusa. Radi bolje uporedivosti sa rezultatima drugih eksperimenata, odlučeno je da to bude estrusna faza. Međutim, trajanje reproduktivnog ciklusa i pojedinačnih faza može da varira, a prelazi između faza su postepeni. Ipak, uzimajući u obzir prosečno trajanje pojedinačnih faza estrusnog ciklusa, možemo osnovano pretpostaviti da će životinje koje su tretirane u estrusnoj fazi i žrtvovane nakon 6 sati, u trenutku žrtvovanja vrlo verovatno i dalje biti u estrusnoj fazi. Sa druge strane, životinje koje su tretirane u estrusnoj fazi i žrtvovane nakon 24 sata, u trenutku žrtvovanja će vrlo verovatno biti u metestrusu. Zbog toga smo tretman ibogainom u trajanju od 6 sati izveli na dva načina. Jedna grupa životinja je tretirana odmah nakon utvrđivanja estrusne faze. Druga grupa je nakon što je utvrđena estrusna faza ciklusa odvojena, tretirana nakon 18 sati i žrtvovana 6 sati nakon tretmana (u metestrusu). Ova grupa je žrtvovana 24 sata nakon utvrđene estrusne faze, isto kao i grupe koje su žrtvovane 24 sata nakon tretmana. Na prelazu iz estrusa u metestrus, promene nivoa estrogena i progesterona u krvi ženki pacova su male (Sato i sar. 2016) i nisu praćene značajnim promenama u ekspresiji ili aktivnosti antioksidativnih enzima, osim u reproduktivnim organima (D'Almeida i sar. 1995; Pajović i Saičić 2008a; Pajović i Saičić 2008b; Lee i sar. 2012), niti u stopi energetskog metabolizma (Anantharaman-Barr i Decombaz 1989).



Slika 3. Šematski prikaz dizajna *in vivo* eksperimenta.

U ovom eksperimentu je postojalo sedam grupa (Slika 3): K – kontrolna grupa, tretirana destilovanom vodom, dekapitovana nakon 24 sata; M6_e – tretirana malom dozom ibogaina u estrusu (1 mg/kg), dekapitovana nakon 6 sati; M6_m – tretirana malom dozom ibogaina u metestrusu (1 mg/kg), dekapitovana nakon 6 sati; M24 – tretirana malom dozom ibogaina u estrusu (1 mg/kg), dekapitovana nakon 24 sata; V6_e – tretirana velikom dozom ibogaina u estrusu (20 mg/kg), dekapitovana nakon 6 sati; V6_m – tretirana velikom dozom ibogaina u metestrusu (20 mg/kg), dekapitovana nakon 6 sati; V24 – tretirana velikom dozom ibogaina u estrusu (20 mg/kg), dekapitovana nakon 24 sata. U grupama K, M6_e, M24, V6_e i V24 je bilo po 6 životinja, a u grupama

M_{6m}, V_{6m} po 5. Životinje su tretirane *per os*, gavažom, i svaka životinja je primila 1 ml tečnosti (voda ili rastvor ibogaina odgovarajuće koncentracije) na 100 grama telesne mase. Nakon tretmana sve životinje su bile smeštene u posebne kaveze (pojedinačno) sa neograničenim pristupom hrani i vodi.

3.3.2. Potrošnja vode i hrane

Na kraju eksperimenta izmerena je količina konzumirane vode (prikazano u mililitrima na sat po kilogramu telesne mase) i hrane (prikazano u gramima na sat po kilogramu telesne mase). Ukupna zapremina konzumirane vode je izračunata kao zbir zapremine vode koju je životinja slobodno popila i zapremine koja je uneta gavažom.

3.3.3. Izolovanje tkiva

Uzorci krvi su skupljani u heparinizovane mikrotube (500 i.j./ml pune krvi) neposredno nakon dekapitacije. Jetra je perfundovana hladnim fiziološkim rastvorom i deo levog režnja je odvojen za histološka ispitivanja, a ostatak levog režnja je upotrebljen za biohemijska ispitivanja. Takođe su izolovani bubrezi, srca, ileum, uterus, pluća, slezina i mozak. Kranijalni deo desnog bubrega (jedna trećina) i deo kaudo-lateralnog zida leve komore srca su odvojeni za histološka, a ostatak tkiva za biohemijska ispitivanja. Uzorci za histološka ispitivanja su fiksirani u 4% rastvoru paraformaldehida u fosfatnom puferu, pH 7,4. Uzorci za biohemijske analize su odmah zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -70 °C.

3.3.4. Razdvajanje plazme i eritrocita

Plazma i eritrociti su razdvojeni centrifugiranjem 10 min na 3000× g. Plazma je zamrznuta i čuvana na -20 °C do merenja koncentracije ibogaina i noribogaina. Eritrociti su isprani tri puta fiziološkim rastvorom (0,9%) , zamrznuti i čuvani na -20 °C.

3.3.5. Merenje koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi

Razdvajanje i kvantifikacija ibogaina i noribogaina u uzorcima plazme urađeni su na Agilent 1100 HPLC sistemu koji je povezan na Quattro micro™ API maseni spektrometar sa detektorom sa tri analizatora - trostruki kvadrupol (HPLC-MS/MS, eng. High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry). Eluiranje je izvedeno na Zorbax XDB-CN (75 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μm) analitičkoj koloni, prema metodi za određivanje alkaloida u biološkim uzorcima (Koželj 2015; Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Vidonja Uzelac 2019). Maseni spektrometar je snimao mase u pozitivnom modu. U cilju kvantifikacije jedinjenja za svaki standard posebno je snimljen molekulski jon i dva najintenzivnija fragmenta iz MS2 spektra (SRM, eng. Selected Reaction Monitoring). Izabrani SRM joni su sledeći: za ibogain (311→174, 122), noribogain (297→160, 122) i za interni standard (325→105, 271). Softver MassLynx 4.1 korišćen je za kontrolu instrumenta. Alkaloidi su identifikovani poređenjem sa standardima. Ukupan sadržaj svakog jedinjenja izračunat je na osnovu površine pikova i izražen je kao mg/l. Kalibracione krive za ibogain i noribogain su bile linearne u opsegu od 0,1 to 100,0 ng/ml. Koeficijent korelacije je bio 0,996 ili veći. Donja granica kvantifikacije (LLQ, eng. Lower Limit of Quantitation) je bila 0,2 ng/ml za oba jedinjenja. Priprema uzorka je podrazumevala taloženje proteina sa dvostrukom zapreminom acetonitrila (C₂H₃N). Standardi za kalibraciju su napravljeni dodavanjem odgovarajuće količine radnog standarda i internog standarda (prazepam) u plazmu u kojoj nema ispitivanih supstanci, odnosno u plazmu netretiranog pacova. Svi uzorci i standardi su čuvani zaštićeni od svetla jer su ibogain i noribogain fotosenzitivni.

3.3.6. Priprema tkiva za merenje aktivnosti enzima

Odmrznuti eritrociti su pomešani sa hladnom dH₂O u odnosu zapremina 1:6, vorteksovani i ostavljeni na ledu 30 min kako bi hemolizirali. Hemolizati su korišćeni za merenje koncentracije

hemoglobina i aktivnosti CAT, GSH-Px, GR i XO. Aktivnost SOD1 je merena u hemolizatima iz kojih je prethodno uklonjen hemoglobin. Uzorci tkiva (jetra, bubreg, srce, uterus, ileum, pluća, slezina, mozak – cela hemisfera) su odmrznuti i pomešani sa puferom (0,25 M saharoza, 0,05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) u odnosu masa 1:10, homogenizovani i sonifikovani (10 kHz, 3x15 s sa pauzama od 15 s) uz održavanje niske temperature, i centrifugirani 90 min na 105000× g, na 4 °C. Supernatanti su korišćeni za spektrofotometrijsko merenje aktivnosti enzima i koncentracije proteina. Uzorci uterusa dobijeni u *ex vivo* eksperimentima su pripremani za merenje aktivnosti antioksidativnih enzima na isti način.

3.3.7. Priprema tkiva za merenje koncentracije TBARS i slobodnih -SH grupa

Uzorci tkiva (jetra, bubreg, srce, uterus, ileum, pluća, slezina, mozak – cela hemisfera) su odmrznuti i pomešani sa puferom (0,05 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) u odnosu masa 1:5, homogenizovani i sonifikovani (10 kHz, 3x15 s sa pauzama od 15 s) uz održavanje niske temperature, i centrifugirani 15 min na 9000× g, na 4 °C. Supernatanti su korišćeni za spektrofotometrijsko merenje koncentracije TBARS, ukupnih i neproteinskih -SH grupa.

3.3.8. Merenje koncentracije proteina u uzorcima tkiva

Koncentracije proteina u uzorcima tkiva su merene Lorijevom metodom (Lowry i sar. 1951) koja se zasniva na formiranju kompleksa između jona bakra i peptidnih veza u alkalnoj sredini, kao i na oksidoredukcionoj reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa (FolinCiocalteu-ov reagens) sa aromatičnim aminokiselinama. Nastaje plava boja čiji intenzitet je proporcionalan koncentraciji proteina. Apsorbancija je merena na 670 nm. Za standardnu krivu je korišćen albumin iz goveđeg seruma.

3.3.9. Merenje koncentracije hemoglobina u hemolizatima eritrocita

Koncentracija hemoglobina u hemolizatima eritrocita je određivana pomoću Drabkinovog reagensa (Drabkin i Austin 1935). Hemoglobin se u reakciji sa kalijum fericijanidom oksiduje do methemoglobina, koji u reakciji sa cijanidnim anjonom daje cijanmethemoglobin. Apsorbancija je merena na 545 nm, a koncentracija je izračunata pomoću molarog ekstinkcionog koeficijenta koji iznosi 36,77.

3.3.10. Uklanjanje hemoglobina iz hemolizata eritrocita

Hemoglobin je iz lizata eritrocita uklonjen ekstrakcijom pomoću hladnog hloroforma i etanola (Tsuchihashi 1923). Smeša se centrifugira 10 min na 2000× g i ukoliko supernatant nije bistar postupak se ponavlja. Dobijeni supernatant se koristi za merenje aktivnosti SOD1.

3.3.11. Merenje aktivnosti enzima

Aktivnosti svih enzima osim SOD su izražene u međunarodnim enzimskim jedincima (U). U je definisana kao količina enzima koji katalizuje konverziju jednog mikromola supstrata u minutu ($\mu\text{mol}/\text{min}$) pod specifičnim uslovima datog enzimskog eseja (Labuda i sar. 2018). Aktivnosti svih enzima u eritrocitima su prikazane u enzimskim jedinicama po gramu hemoglobina, a aktivnosti enzima u tkivima u enzimskim jedinicama po miligramu proteina. Za merenje aktivnosti enzima, kao i koncentracije TBARS i -SH grupa, korišćeni su uobičajeni spektrofotometrijski eseji čije je izvođenje detaljno opisano u velikom broju doktorskih teza (Jovanović-Galović 1998; Nikolić 2004; Oreščanin Dušić 2008; Appiah 2011; Slavić 2011; Mijušković 2015; Ninkov 2016; Mitrović 2018; Radić 2018; Vidonja Uzelac 2019; Guševac Stojanović 2020 i druge). Ovde je dat prikaz osnovnih principa.

Za sva spektrofotometrijska merenja u ovoj disertaciji (eseji za merenje aktivnosti enzima i koncentracije proteina, hemoglobina, TBARS i -SH grupa) korišćeni su sledeći spektrofotometri: SAFAS UVmc2 (SAFAS), Shimadzu UV-160 (Shimadzu Scientific Instruments), Shimadzu UV-1800

(Shimadzu Scientific Instruments), Thermo Scientific Evolution 300 (Thermo Fisher Scientific), Thermo Scientific Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific).

Superoksid dismutaza (SOD) — Aktivnost SOD određivana je adrenalinskom metodom, koja se zasniva na praćenju smanjenja brzine autooksidacije adrenalina u alkalnoj sredini (Misra i Fridovich 1972). U alkalnoj sredini adrenalin reaguje sa kiseonikom i nastaju adrenohrom i $O_2^{\cdot-}$ koji povratno ubrzava autooksidaciju adrenalina. SOD uklanja $O_2^{\cdot-}$ i pri tome inhibira reakciju autooksidacije. Brzina autooksidacije adrenalina jednaka je nagibu linearnog dela porasta apsorbanije na 480 nm koji odgovara brzini nastanka adrenohroma. Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina koju izazove SOD prisutna u uzorku koristi se kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Jedinica aktivnosti SOD (U) je definisana kao količina enzima potrebna da smanji brzinu autooksidacije adrenalina za 50%, u linearnom delu porasta apsorbanije, na pH 10,2 i sobnoj temperaturi. Na ovaj način se meri ukupna SOD aktivnost u uzorku. Aktivnost **SOD2** se meri na isti način nakon što se SOD1 inhibira inkubacijom sa KCN. Aktivnost **SOD1** se izračunava oduzimanjem aktivnosti SOD2 od ukupne SOD.

Katalaza (CAT) — Aktivnost CAT je određena merenjem brzine degradacije H_2O_2 , odnosno praćenjem promene apsorbanije na 230 nm na sobnoj temperaturi i pH 8; ekstinkcioni koeficijent $0,071 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Beutler 1982). Promena apsorbanije je direktno proporcionalna aktivnosti katalaze u uzorku.

Glutation peroksidaza (GSH-Px) — Aktivnost GSH-Px je merena metodom čiji princip su opisali Paglia i Valentine (1967). Kao supstrat je korišćen t-butil hidroperoksid. GSH-Px katalizuje dvoelektronsku redukciju supstrata uz oksidaciju GSH. Tako nastaje GSSG koji se može ponovo redukovati u reakciji koju katalizuje GR, uz oksidaciju NADPH do $NADP^+$. Smanjenje koncentracije NADPH se prati spektrofotometrijski na 340 nm, na 37°C ; ekstinkcioni koeficijent $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Izmerena brzina promene apsorbanije je direktno proporcionalna aktivnosti GSH-Px u uzorku.

Glutation reduktaza (GR) — Pošto GR katalizuje redukciju GSSG uz oksidaciju NADPH, aktivnost ovog enzima je merena praćenjem brzine oksidacije NADPH, odnosno merenjem brzine smanjenja apsorbanije na 340 nm, na 37°C ; ekstinkcioni koeficijent $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Glatzle i sar. 1974).

Glutation S transferaza (GST) — Za merenje aktivnost GST korišćeni su 1-hlor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) i GSH kao supstrati. GST katalizuje konjugaciju CDNB i GST pa je aktivnost enzima merena praćenjem promene koncentracije konjugata, odnosno apsorbanije na 340 nm, na 37°C ; ekstinkcioni koeficijent konjugovanog CDNB $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Habig i sar. 1974).

Ksantin oksidaza (XO) — Aktivnost XO je merena u prisustvu ksantina kao supstrata. XO katalizuje oksidaciju ksantina do mokračne kiseline pa je aktivnost XO određena merenjem brzine porasta koncentracije mokračne kiseline, odnosno praćenjem apsorbanije na 292 nm, na 37°C ; ekstinkcioni koeficijent $12,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Terada i sar. 1990).

3.3.12. Merenje koncentracije TBARS

Uzorci su inkubirani 10 minuta na 95°C sa tiobarbituratnom kiselinom u finalnoj koncentraciji od 0,3%. Apsoorbancija je merena na 532 nm (Rehoncorna i sar. 1980). Koncentracija TBARS je određena pomoću standardne krive MDA koji je dobijen kiselim hidrolizom malonaldehid-bis-(dimetil acetal)-a i izražena u mikromolima po gramu vlažne mase tkiva.

3.3.13. Merenje koncentracije neproteinskih i slobodnih proteinskih -SH grupa

Koncentracija slobodnih -SH grupa u uzorcima je merena pomoću reakcije sa Elmanovim reagensom, odnosno 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoevom kiselinom), skraćeno DTNB (Ellman 1959). DTNB reaguje sa tiolima, dolazi do raskidanja disulfidne veze i nastaje 2-nitro-5-tiobenzoat

(TNB⁻), koji se jonizuje do TNB²⁻ koji rastvoru daje žutu boju. Apsorbancija se meri na 412 nm; ekstinkcioni koeficijent 14,15 mM⁻¹cm⁻¹. Na ovaj način je merena koncentracija ukupnih slobodnih –SH grupa u uzorcima. Koncentracija neproteinskih –SH grupa je merena na isti način nakon taloženja proteina sulfosalicilnom kiselinom. Koncentracija slobodnih proteinskih –SH grupa je izračunata oduzimanjem koncentracije neproteinskih od ukupnih slobodnih –SH grupa. Koncentracije su izražene u molima po litru.

3.3.14. Priprema tkiva za histološku analizu

Uzorci jetre, srca i bubrega su fiksirani 24 sata u neutralnom 4% paraformaldehidu, a zatim dehidrirani serijom rastućih koncentracija etanola (30-100%) i ksilola, i ukalupljeni u parafinski vosak (Histowax, Histolaboduct AB, Göteborg, Švedska). Ukalupljeni uzorci su isečeni na rotacionom mikrotomu, debljina preseka 5 µm.

3.3.15. Histoheмиjska bojenja

Preseci su deparafinizovani ksilolom i rehidrirani opadajućim koncentracijama etanola. Primenjena su dva uobičajena histoheмиjska bojenja (Luna 1968). Preseci jetre, bubrega i srca su obojeni hematoksilin eozin (HE) bojenjem i tako dobijeni preparati su korišćeni za histopatološki pregled. Preseci jetre su obojeni i PAS (eng. Periodic acid–Schiff) bojenjem, i ovi preparati su korišćeni za procenu količine glikogena u jetri.

3.3.16. Histopatološki pregled jetre, bubrega i srca

Histomorfološki pregled jetre je podrazumevao uočavanje patoloških promena kao što su: edem hepatocita, dilatacije centralne vene, dilatacija grana vene porte, infiltracije limfocita i plazmocita u portne prostore, hiperplazija Kupferovih ćelija, nekroze i druge. Uočena dilatacija centralne vene i grana vene porte je smatrana značajnom ukoliko je prisutna u više od jedne trećine uzorka.

Histomorfološki pregled bubrega je podrazumevao pregled morfologije korteksa, odnosno epitelnih ćelija proksimalnih tubula, oblika lumena tubula i morfologije glomerula, kao i pregled morfologije medule. Uočene patološke promene su klasifikovane kao: blage – okrugao ili ovalan oblik lumena tubula u bar tri četvrtine pregledanih tubula, okruglasta jedra prisutna u svim ćelijama ali loše vidljiva u manje od jedne polovine ispitanih tubula; ili umerene – pravilan (okrugao ili ovalan) oblik lumena prisutan u manje od jedne petine, a zvezdast oblik u najmanje tri četvrtine tubula, okruglasta i slabo vidljiva jedra u bar jednoj polovini ćelija i fokalno odsutna u manje od jedne polovine pregledanih tubula.

Histomorfološki pregled uzoraka srca je podrazumevao pregled morfologije miokarda i perikarda. Prisustvo nekroze je utvrđeno na osnovu vidljivosti jedara i poprečne prugavosti kardiomiocita. Nekroza je klasifikovana kao fokalna ako je zahvatala manje od 5% uzorka, umereno izražena difuzna nekroza ako je zahvatala do polovine uzorka, i veoma izražena difuzna nekroza ako je zahvatala više od polovine uzorka. Histomorfološki pregled je podrazumevao i uočavanje infiltracije mononuklearnih ćelija u miokardu (indikator miokarditisa), prisustva perivaskularnog infiltrata zapaljenskih ćelija (indikator vaskulitisa), promene u količini adipoznog tkiva i prisustvo perikarditisa.

Za pregled preparata i izradu mikrografija jetre korišćen je svetlosni mikroskop Leitz DMRB sa kamerom Leica MC190 HD, za bubreg je korišćen svetlosni mikroskop Leica DM LS2 sa kamerom Canon PowerShot S70, a za srce Leica DM2000 sa kamerom Leica ICC50.

3.3.17. Procena količine glikogena u jetri

Količina glikogena u uzorcima jetre je procenjena kvantitativnom i semikvantitativnom analizom (Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Vidonja Uzelac 2019). Kvantitativna analiza, odnosno

određivanje procenta glikogen-pozitivnih ćelija, je izvedena koristeći uvećanje od 400× (uvećanje objektiva 40×). U svakom uzorku je pregledano po pet vidnih polja oko centralnih vena sa najjačom obojenošću i prikazana je srednja vrednost procenta glikogen-pozitivnih ćelija. Prikazane mikrografije su napravljene koristeći uvećanje objektiva 20× i uvećanje kamere 3,2×. Pošto glikogen-pozitivne ćelije mogu da sadrže različitu količinu glikogena, izvedena je i semikvantitativna analiza na osnovu intenziteta ljubičaste-magenda boje, koja je podrazumevala svrstavanje svakog uzorka u jednu od tri kategorije obeležene sa: + za slabu obojenost (intenzitet obojenosti glikogena je manji od jedne trećine maksimalnog intenziteta), ++ za srednju obojenost (intenzitet obojenosti glikogena je između jedne i dve trećine maksimalnog intenziteta), i +++ za jaku obojenost (intenzitet obojenosti glikogena je veći od dve trećine).

3.3.18. Merenje koncentracije glukoze u krvi

Koncentracija glukoze je merena u punoj krvi odmah nakon dekapitacije. Za merenje je korišćen uređaj Blood Glucose Test Strip TOUCH-IN® Micro (ApexBio).

3.3.19. Analiza urina

Specifična gustina, pH vrednost i koncentracija glukoze, nitrita i ketona u urinu su mereni pomoću traka za analizu urina – Uriscan urine test strips (YD Diagnostics).

3.4. Ex vivo eksperimenti

Eksperimenti na izolovanim arterijama i uterusu su izvođeni primenom uobičajenih kimografskih metoda čije je izvođenje opisano u više doktorskih disertacija (Oreščanin Dušić 2008; Appiah 2011; Slavić 2011; Mijušković 2015; Sokolović 2018; Drakul 2018). Polni hormoni, čije se koncentracije u krvi menjaju tokom reproduktivnog ciklusa utiču u manjoj ili većoj meri na kontraktilnost glatkih mišićnih ćelija u krvnim sudovima i uterusu, kao i na njihovu osetljivost na različite stimulse. Osim toga, utiču i na redoks ravnotežu u ovim tkivima. Zbog toga su svi *ex vivo* eksperimenti u ovoj disertaciji urađeni na preparatima arterija i uterusa koji su izolovani iz ženki pacova u estrusu. Životinje su žrtvovane dekapitacijom. Krvni sudovi i uterus su izolovani u najkraćem roku i odmah stavljeni u odgovarajući izotonični rastvor.

3.4.1. Izolovane arterije

Za eksperimente na izolovanim arterijama je korišćen Krebs-Ringerovog rastvor. Sastav (mM): NaCl 118,3; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; D-glukoza 11,1. Izolovana torakalna aorta i mezenterična arterija su očišćene od okolnog vezivnog i masnog tkiva i isečene na segmente dužine 3-5 mm. Preparati su postavljeni u vodeno kupatilo za izolovane organe (model 4050, Ugo Basile) tako što su kroz lumen provučene dve paralelne žice od kojih je jedna povezana sa izometrijskim senzorom za silu. Preparati su inkubirani u Krebs-Ringerovom rastvoru temperature 37°C, koji je aerisan karbogenom (95% O₂ i 5% CO₂). Preparati su postepeno zatezani do opterećenja od 2 grama. Za kimografsko praćenje tonusa krvnih sudova je korišćen „Monitorski sistem bioloških podataka” isoLAB ver 3.4 (EIUnit) koji sadrži izometrijske senzore za silu, pretvarač-konverter i personalni računar sa pripadajućom aplikacijom. Nakon perioda stabilizacije preparata (oko 30 minuta) prvo je ispitivana očuvanost funkcije endotela. Kontrakcije glatkih mišićnih ćelija u krvnom sudu su izazivane selektivnim agonistom α -adrenergičkih receptora fenilefrinom, 10⁻⁶ M. Zatim je u vodeno kupatilo dodavan acetilholin, 10⁻⁵ M. Acetilholin izaziva oslobađanje NO iz endotela pa je procenat relaksacije direktno proporcionalan stepenu funkcionalne očuvanosti endotela. Postupak je ponavljan dva puta. Nakon toga, preparat je ponovo prekontrahevan dodavanjem fenilefrina, a zatim je u vodeno kupatilo dodavana ispitivana supstanca (u ovom eksperimentu ibogain 20 mg/l, tj. 57,6 μ M, i ATP 1-500

pM, kumulativno 688 pM) i praćen je efekat na tonus prekontrahevanog krvnog suda. Efekat je izražavan kao procenat relaksacije. Veličine uzorka su prikazane u odeljku „rezultati”.

3.4.2. Izolovani uterus

Za većinu eksperimenata na izolovanom uterusu je korišćen De Jalonov rastvor. Sastav (mM): NaCl 154; KCl 5,63; NaHCO₃ 5,95; CaCl₂ 0,54; D-glukoza 2,77. Korišćeno je i nekoliko modifikacija De Jalonovog rastvora sa izmenjenim koncentracijama Ca²⁺ ili K⁺, i to: 0,4 mM, 0,95 mM i 5,95 mM CaCl₂, i 15,6 mM i 38,6 mM KCl. U jednom od eksperimenata je korišćen Krebs Henseleitov izotonični rastvor. Sastav (mM): NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,25; MgSO₄ 1,2; D-glukoza 11. Rogovi uterusa su očišćeni od okolnog vezivnog i masnog tkiva i postavljeni u vodeno kupatilo sa izotoničnim rastvorom temperature 37°C koji je aerisan karbogenom (95% O₂ i 5% CO₂). Preparati su postepeno zatezani do opterećenja od 1 grama. Korišćen je sistem za izolovane organe TSZ-04-E sa vodenim kupatilom, izometrijskim senzorom za silu FSG-01 i pojačivačem EXP-CLSG-4 (MDE Research). Za registrovanje i analizu podataka je korišćen SPEL Advanced Kymograph v2.94 software (Experimetria Ltd. i LogiRex Software Laboratory). Fazna kontraktilnost uterusa je analizirana na osnovu četiri parametra: amplituda, frekvencija, površina ispod krive (AUC, eng. area under curve) i trajanje pojedinačnih kontrakcija. Efekat tretmana je poređen sa kontrolnim periodom, odnosno sa aktivnošću istog preparata pre tretmana. Kada su primenjivani pretretmani kontrolni period je bio nakon pretretmana. Pretretmani su primenjivani u koncentracijama koje ne dovode do značajnih neposrednih promena kontraktilne aktivnosti. Veličina uzorka se razlikovala među eksperimentima i prikazana je za svaki eksperiment u odeljku „rezultati”. Koncentracije ibogaina i drugih supstanci su u odeljku „rezultati” prikazane na dva načina, kao molarna koncentracija ili u gramima po litru. Razlog za korišćenje masene koncentracije u nekim eksperimentima je lakša uporedivost rezultata sa rezultatima ranijih istraživanja.

Efekti ibogaina na kontraktilnu aktivnost uterusa su ispitani u izotoničnom rastvoru sa različitim koncentracijama Ca²⁺ i K⁺, odnosno u uslovim pri kojima izolovani uterus ispoljava različite tipove kontraktilne aktivnosti (odsustvo kontrakcija, pravilne fazne kontrakcije, tonične kontrakcije). Efekti ibogaina poređeni su pod istim uslovima sa efektima ATP, ketanserina (visoko afinitetni neselektivni antagonist 5-HT₂ receptora kod glodara) i drugih agonista i antagonist različitih receptora i signalnih puteva (nije prikazano u rezultatima jer nisu zapažene sličnosti). Kvantitativno poređenje stimulatornih i inhibitornih efekata ibogaina i ketanserina je izvedeno primenom rastućih molarnih koncentracija radi poređenja sigmoidnih krivih i EC50 vrednosti. Izmerena je i aktivnost antioksidativnih enzima u uterusu nakon 2 sata kontraktilne aktivnosti u prisustvu ketanserina (29 μM) u cilju poređenja sa efektima ibogaina.

Da bi se ispitali mehanizmi ranije pokazanih efekata ibogaina na aktivnost antioksidativnih enzima u kontraktilno aktivnom izolovanom uterusu, korišćeni su propranolol (tipični antagonist β₁ i β₂-adrenergičkih receptora) i glibenklamid (inhibitor K_{ATP} kanala). Korišćene su dve koncentracije CaCl₂: 0,54 mM (0,06 g/l) pri kojoj je intenzitet faznih kontrakcija uterusa nizak, i 5,95 mM (0,66 g/l) pri kojoj je intenzitet faznih kontrakcija uterusa veoma visok. Nakon perioda stabilizacije u vodeno kupatilo je dodato 10 mg/l ibogaina i kontraktilna aktivnost je praćena naredna 4 sata. Tretirani i netretirani (kontrolni) uterus su nakon 2 ili 4 sata zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80 °C do merenja aktivnosti antioksidativnih enzima. Analiziran je i efekat ibogaina sa i bez pretretmana na kontraktilnu aktivnost. Takođe je ispitan i uticaj rastućih koncentracija ibogaina, sa i bez pretretmana propranololom i glibenklamidom, na kontraktilnu aktivnost u Krebs Henseleitov rastvoru (uterus ima stabilnu faznu aktivnost umerenog intenziteta).

3.5. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka je izvedena prema protokolima koje su opisali Hinkle i sar. (2002). Većina rezultata je prikazana kao aritmetička sredina \pm standardna greška aritmetičke sredine, dok su neki rezultati prikazani kao udeo ili procenat. Testiranje hipoteza je izvedeno upotrebom parametrijskih testova. U tu svrha, rezultati koji su prikazani u vidu procenata su transformisani primenom prirodnog logaritma. Prag značajnosti je bio 0,05. Korišćeni su softveri Statistica 9.1. (StatSoft) i GraphPad Prism 8.0.2. (GraphPad Software, Inc.).

Potrošnja hrane i vode, koncentracija glukoze u krvi, procenat glikogen-pozitivnih ćelija u jetri, aktivnosti svih enzima i koncentracije TBARS i -SH grupa u svim tkivima u *in vivo* eksperimentu su analizirane jednofaktorskom i dvofaktorskom analizom varijanse. Razlike između kontrolne grupe i svih grupa tretiranih ibogainom su analizirani jednofaktorskom analizom varijanse kojom je obuhvaćeno svih sedam grupa (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24). Efekat faze estrusnog ciklusa je analiziran dvofaktorskom analizom varijanse za četiri grupe (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m), faktori: faza ciklusa i doza. Ukoliko dvofaktorska analiza varijanse nije pokazala značajan efekat faze ciklusa odgovarajuće estrusne i metestrusne grupe su objedinjene. Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m, i urađena je jednofaktorska analiza varijanse kojom je obuhvaćeno svih pet grupa (K, M6, M24, V6, V24). Da bi se dodatno uporedili efekti ibogaina nakon 6, odnosno nakon 24 sata, urađena je posebno jednofaktorska analiza varijanse za grupe K, M6 i V6, i za grupe K, M24, V24.

Efekat ibogaina na tonus izolovanih arterija analiziran je jednofaktorskom analizom varijanse. Veza između stepena očuvanosti endotela i relaksantnog efekta ibogaina je ispitana Pirsonovim koeficijentom korelacije. Kada su arterije podeljene u dve grupe na osnovu očuvanosti endotela, relaksantno dejstvo ibogaina je analizirano dvofaktorskom analizom varijanse, faktori: očuvanost endotela i vreme. Efekat ATP na tonus izolovanih arterija je analiziran na isti način, s' tim što su faktori bili očuvanost endotela i vreme.

Stimulatorni i inhibitorni efekti rastućih molarnih koncentracija ibogaina i ketanserina su poređeni pomoću sigmoidnih krivih i EC50 vrednosti. Pošto se pokazalo da sigmoidni fit nije optimalan način za kvantifikovanje inhibitornih efekata ibogaina i ketanserina, primenjena je dvofaktorska analiza varijanse, faktori: tretman (ibogain ili ketanserin) i koncentracija. Efekti ketanserina na aktivnost antioksidativnih enzima u izolovanom uterusu su analizirani jednofaktorskom analizom varijanse. Efekti rastućih koncentracija ibogaina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusu sa i bez pretretmana propranololom i glibenklamidom su analizirani dvofaktorskom analizom varijanse, faktori: tretman i koncentracija. Promene u kontraktilnoj aktivnosti tokom četiri sata u prisustvu ibogaina su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse, faktori: koncentracija Ca²⁺ i vreme. Efekti pretretmana su takođe analizirani dvofaktorskom analizom varijanse, faktori: tretman i vreme. Aktivnost antioksidativnih enzima u izolovanom uterusu sa i bez pretretmana je analizirana dvofaktorskom analizom varijanse, faktori: tretman i vreme.

Nakon analize varijanse, sve grupe su poređene između sebe primenom Takijevog HSD testa.

4. REZULTATI

4.1. Sistemski efekti *per os* tretmana jediničnom dozom ibogaina

4.1.1. Biološka raspoloživost u plazmi

Šest sati nakon oralnog tretmana nižom dozom, ibogain je detektovan u plazmi samo dve životinje (od 11) a nakon 24 sata nije detektovan (Tabela 2 i Prilog 1). Za razliku od ibogaina, noribogain je nakon 6 sati detektovan u plazmi svih životinja, a nakon 24 sata u plazmi samo jedne životinje (od 6). Šest sati nakon oralnog tretmana višom dozom, ibogain je detektovan u plazmi svih 11 životinja, a nakon 24 sata u plazmi samo jedne životinje (od 6). Noribogain je bio prisutan u plazmi svih životinja tretiranih višom dozom, nakon 6 i 24 sata. Izmerene koncentracije ibogaina i noribogaina su bile veće nakon tretmana većom dozom, dok su koncentracije noribogaina bile veće od koncentracija ibogaina u svim tretiranim grupama. Takođe, koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi su bile veće 6 sati nego 24 sata nakon tretmana.

Tabela 2. Koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi (mg/l).

		Ibogain	Noribogain
K	prisustvo	0/6	0/6
	koncentracija	n.p.	n.p.
M6_e	prisustvo	1/6	6/6
	koncentracija	0,0026 ± n.p.	0,0128 ± 0,0009
M6_m	prisustvo	1/5	5/5
	koncentracija	0,0108 ± n.p.	0,0071 ± 0,0016
M24	prisustvo	0/6	1/6
	koncentracija	n.p.	0,0112 ± n.p.
V6_e	prisustvo	6/6	6/6
	koncentracija	0,0076 ± 0,0010	0,1602 ± 0,0047
V6_m	prisustvo	5/5	5/5
	koncentracija	0,0200 ± 0,0070	0,2094 ± 0,0224
V24	prisustvo	1/6	6/6
	koncentracija	0,0008 ± n.p.	0,0086 ± 0,0020

Donja granica kvantifikacije za ibogain i noribogain je bila 0,2 µg/l. Koncentracije su prikazane kao aritmetička sredina i srednja vrednost aritmetičke sredine uzimajući u obzir samo uzorke u kojima je koncentracija ibogaina-noribogaina izmerena. Pojedinačne koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi svake životinje su prikazane u Prilogu 1. n.p. – nije primenljivo.

4.1.2. Količina konzumirane vode i hrane

Količina konzumirane vode je bila najmanja u kontrolnoj grupi, a najveća 24 sata nakon tretmana manjom dozom ibogaina i jedino se ova grupa značajno razlikovala od kontrolne (Tabela 3; rezultati analize varijanse su prikazani u Tabela 4 a rezultati Takijevog HSD testa u Tabeli 3). Između drugih grupa nije bilo značajnih razlika. Količina konzumirane hrane je bila manja u grupama žrtvovanim 6 sati nakon tretmana, a naročito nakon tretmana većom dozom (Tabela 3;

rezultati analize varijanse su prikazani u Tabela 4 a rezultati Takijevog HSD testa u Tabeli 3). Potrošnja hrane je bila najveća 24 sata nakon tretmana manjom dozom i značajno se razlikovala u odnosu na grupu koja je tretirana većom dozom u estrusu i žrtvovana nakon 6 sati. Nije bilo značajnih razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Razlike u količini konzumirane hrane su bar delimično artefakt dizajna eksperimenta i ne treba ih smatrati isključivo efektom ibogaina. Za detaljnije objašnjenje videti Prilog 2.

Tabela 3. Količina potrošene vode i hrane, i koncentracija glukoze u krvi.

	Voda [g/h/kg t.m.]	Hrana [ml/h/kg t.m.]	Glikemija [mM]
K	3,877 ± 0,301 ^a	2,303 ± 0,467	6,830 ± 0,418
M6_e	4,953 ± 0,464	1,278 ± 0,483	5,650 ± 0,180
M6_m	4,293 ± 1,196	1,940 ± 0,546	7,090 ± 0,469
M24	5,549 ± 0,530 ^a	2,728 ± 0,202 ^a	6,408 ± 0,377
V6_e	4,086 ± 0,693	0,757 ± 0,377 ^a	7,100 ± 0,392
V6_m	3,958 ± 0,864	0,966 ± 0,463	6,570 ± 0,710
V24	4,342 ± 0,647	2,469 ± 0,316	6,842 ± 0,325

^a označava grupe koje se međusobno značajno razlikuju (Takijev HSD test, $p < 0,05$). Za detaljnije objašnjenje o potrošnji hrane videti Prilog 2. t.m. – telesna masa.

4.1.3. Koncentracija glukoze u krvi

Koncentracija glukoze u krvi pacova tretiranih ibogainom se nije značajno razlikovala od kontrole. Takođe nije bilo ni značajnih razlika između tretiranih grupa. Jedino je dvofaktorska analiza varijanse pokazala značajnu interakciju. Naime, šest sati nakon tretmana manjom dozom ibogaina, koncentracija glukoze je bila veća u krvi pacova koji su tretirani u metestrusu, a 6 sati nakon tretmana većom dozom u krvi pacova koji su tretirani u estrusu (Tabela 3 i Tabela 4), ali post-hok test nije pokazao značajne razlike.

4.1.4. Analiza urina

Analizom urina nije uočeno prisustvo glukoze i nitrita ni u jednoj eksperimentalnoj grupi. Koncentracija ketona, pH vrednost i specifična gravitacija se ni u jednoj tretiranoj grupi nisu razlikovale od kontrole (podaci nisu prikazani).

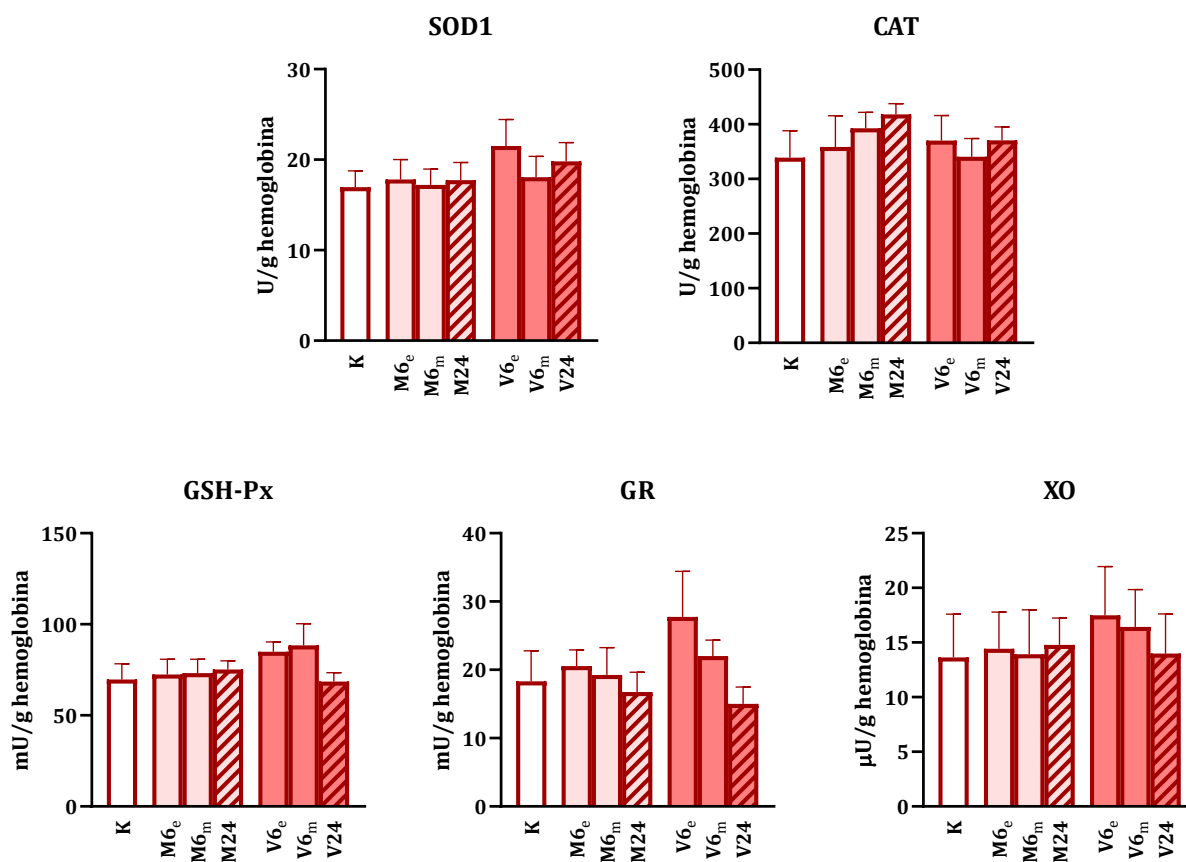
Tabela 4. Količina potrošene vode i hrane, i koncentracija glukoze u krvi – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)			
	Voda	Hrana	Glikemija
	n.z.	F = 3,21 p < 0,05	n.z.
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)			
	Voda	Hrana	Glikemija
Faktor: faza ciklusa	n.z.	n.z.	n.z.
Faktor: doza	n.z.	n.z.	n.z.
Interakcija	n.z.	n.z.	F = 18,80 p < 0,05
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)			
	Voda	Hrana	Glikemija
	F = 3,41 p < 0,05	F = 4,70 p < 0,01	n.z.
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)			
	Voda	Hrana	Glikemija
	n.z.	n.z.	n.z.
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)			
	Voda	Hrana	Glikemija
	F = 3,85 p < 0,05	n.z.	n.z.

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno.

4.1.5. Eritrociti

Nije bilo značajnih razlika u aktivnostima antioksidativnih enzima i XO u eritrocitima ženki pacova nakon tretmana ibogainom (Slika 4; rezultati analize varijanse su prikazani u Tabeli 5).



Slika 4. Aktivnost antioksidativnih enzima i ksantin oksidaze u eritrocitima ženki pacova nakon tretmana ibogainom.

Tabela 5. Aktivnost antioksidativnih enzima i ksantin oksidaze u eritrocitima ženki pacova nakon tretmana ibogainom – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)					
	SOD1	CAT	GSH-Px	GR	XO
	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)					
	SOD1	CAT	GSH-Px	GR	XO
Faktor: faza ciklusa	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
Faktor: doza	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)					
	SOD1	CAT	GSH-Px	GR	XO
	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)					
	SOD1	CAT	GSH-Px	GR	XO
	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)					
	SOD1	CAT	GSH-Px	GR	XO
	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno.

4.1.6. Jetra

U svim grupama koje su tretirane ibogainom, u jetri određenog broja životinja je uočena dilatacija centralne vene i/ili grana vene porte (Tabela 6A; Slika 5). Osim navedenih, histomorfološkom analizom nisu uočene druge patološke promene, ali su pomoću PAS bojenja uočene razlike u hepatocitima koje ukazuje na glikogenolitičku aktivnost ibogaina (Tabela 6B; Slika 6). Udeo glikogen-pozitivnih ćelija u jetri 24 sata nakon tretmana manjom dozom je bio značajno manji nego u kontrolnoj grupi (rezultati analize varijanse su prikazani u Tabeli 7, a rezultati Takijevog HSD testa u Tabeli 6B). Takođe, u svim tretiranim grupama postoji određen broj životinja sa smanjenim intenzitetom PAS bojenja.

Manja doza ibogaina dovela je povećanja aktivnosti CAT i smanjenja aktivnosti XO u jetri 24 sata nakon tretmana, u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 7; Tabela 8). Koncentracija TBARS je najveća 24 sata nakon tretmana većom dozom ali se ne razlikuje značajno od kontrole. Tretman ibogainom je doveo i do povećanja koncentracije neproteinskih -SH grupa. Velika doza je nakon 6 sati, u grupi tretiranoj u estrusu, dovela do značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu, dok se u toku 24 sata od tretmana koncentracija neproteinskih -SH grupa vratila na kontrolni nivo. Takođe, 6 sati nakon tretmana, koncentracije neproteinskih -SH grupa bile su veće nakon tretmana većom dozom ibogaina, u poređenju sa manjom. Faza estrusnog ciklusa je imala uticaj na aktivnost CAT koja je bila veća u metestrusu i XO koja je bila veća u estrusu, ali nije značajno menjala efekat ibogaina, odnosno ni jedna od ovih grupa se nije značajno razlikovala od kontrole. Sa druge strane faza estrusnog ciklusa je imala uticaj i na koncentraciju neproteinskih -SH grupa koja je bila veća u grupama koje su tretirane u estrusu, i nakon tretmana velikom dozom značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela 6. Histopatološka analiza jetre ženki pacova nakon tretmana ibogainom (A) i prisustvo glikogena u jetri izraženo kao procenat glikogen-pozitivnih ćelija i intenzitet PAS bojenja (B).

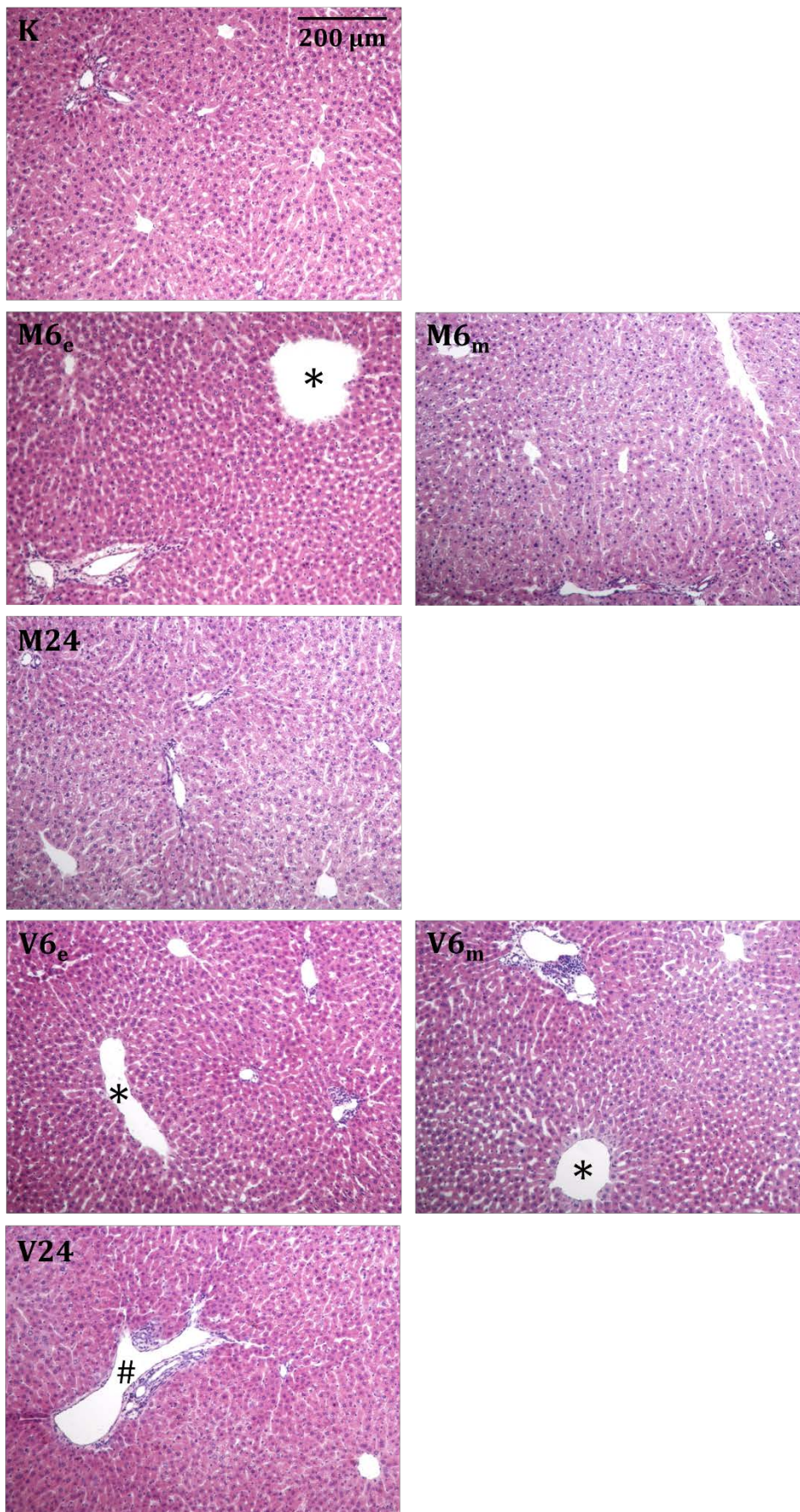
A) Histopatološka analiza				
	Bez morfoloških promena	Dilatacija centralne vene i grana vene porte		
K	6/6	0/6		
M6_e	1/4	3/4		
M6_m	2/3	1/3		
M24	3/4	1/4		
V6_e	3/6	3/6		
V6_m	3/5	2/5		
V24	1/5	4/5		
B) Prisustvo glikogena				
	% glikogen-pozitivnih ćelija	Intenzitet PAS bojenja		
		+++	++	+
K	91,83 ± 3,18 ^a	6/6	0/6	0/6
M6_e	57,75 ± 15,75	2/4	0/4	2/4
M6_m	80,00 ± 2,52	3/3	0/3	0/3
M24	59,00 ± 10,72 ^a	1/4	3/4	0/4
V6_e	66,50 ± 12,81	4/6	0/6	2/6
V6_m	48,20 ± 16,11	2/5	0/5	3/5
V24	77,00 ± 6,47	3/5	2/5	0/5

^a označava grupe koje se međusobno značajno razlikuju (Takijev HSD test, p < 0,05).

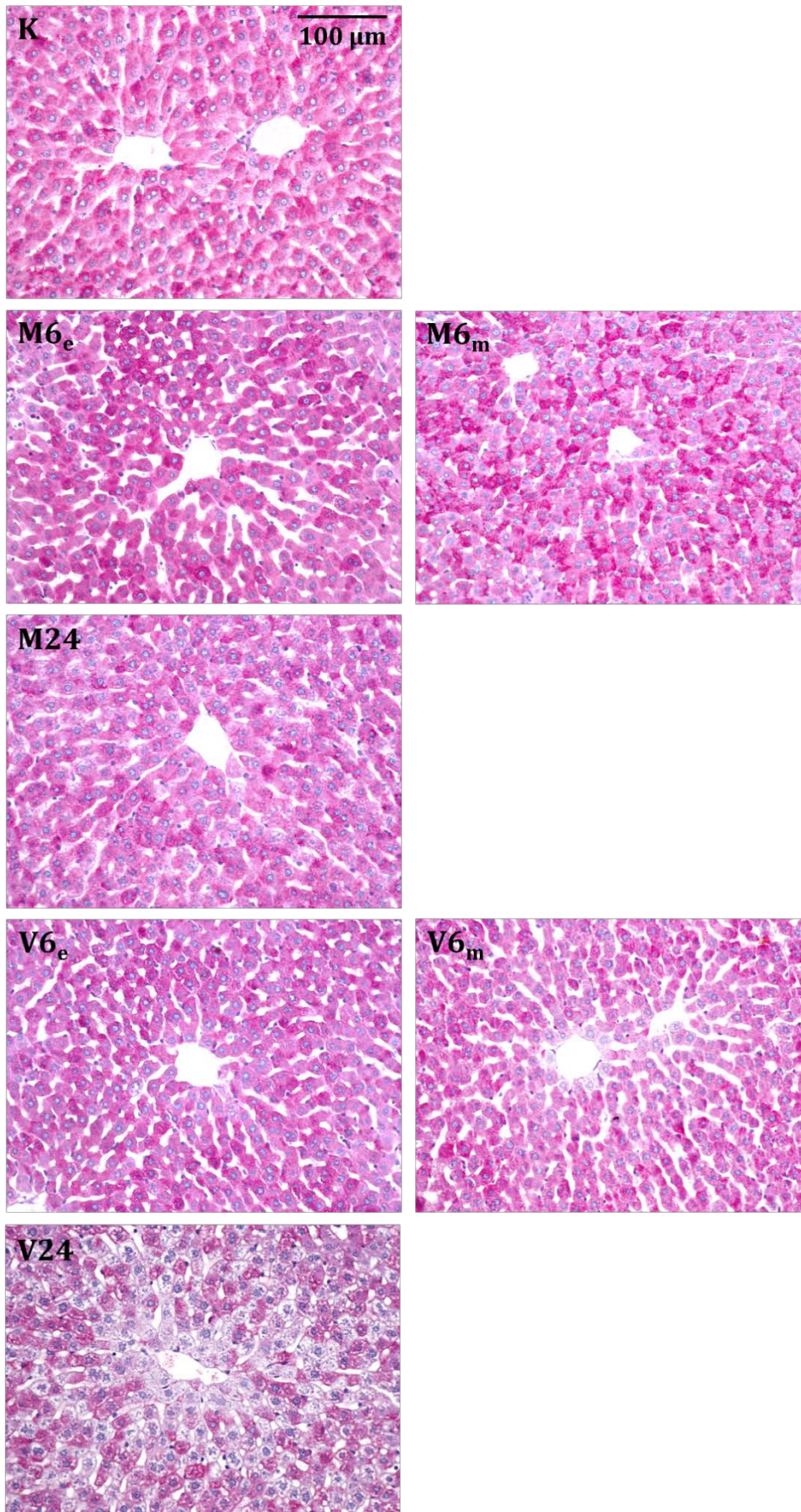
Tabela 7. Procenat glikogen-pozitivnih ćelija u jetri – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)	
	n.z.
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)	
Faktor: faza ciklusa	n.z.
Faktor: doza	n.z.
Interakcija	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)	
	n.z.
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)	
	n.z.
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)	
	F = 6,02 p < 0,05

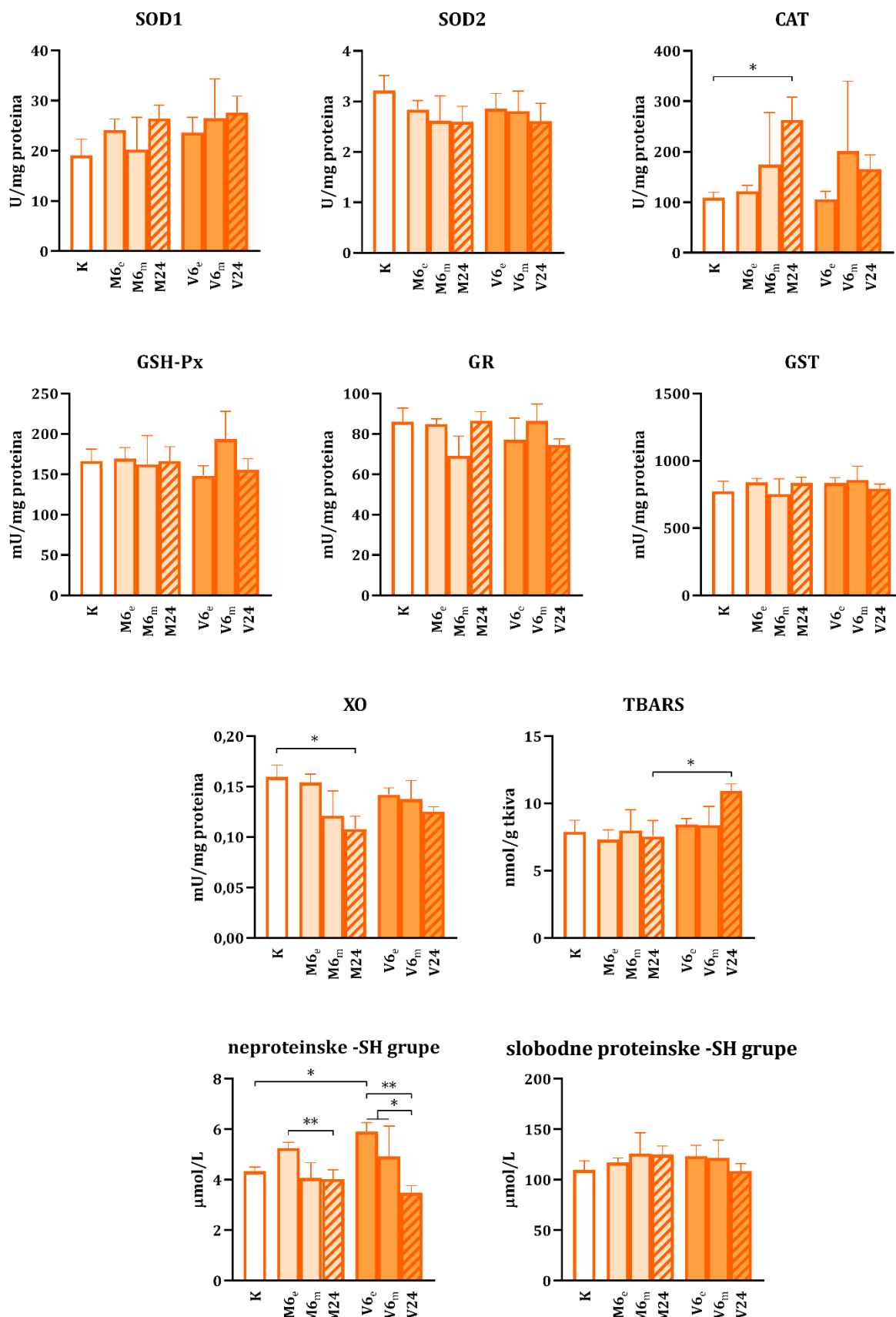
Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m.
n.z. – nije značajno.



Slika 5. Mikrografije jetre ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Hematoksilin-eozin; uvećanje objektiva 10×; * – dilatacija centralne vene; # – dilatacija vene porte.



Slika 6. Mikrografije jetre ženki pacova nakon tretmana ibogainom. PAS bojenje, uvećanje objektiva 20×, glikogenske granule su obojene ljubičasto-magenta bojom.



Slika 7. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u jetri ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Takijev HSD test: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

Tabela 8. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u jetri ženki pacova nakon tretmana ibogainom – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	F = 2,91 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	F = 2,84 p < 0,05	n.z.	F = 5,76 p < 0,001	n.z.
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
Faktor: faza ciklusa	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	e > m F = 4,84 p < 0,05	n.z.	e > m F = 9,28 p < 0,01	n.z.
Faktor: doza	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	V > M F = 4,81 p < 0,05	n.z.
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	F = 2,89 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	n.p.	F = 3,46 p < 0,05	n.p.	n.z.
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	n.p.	n.z.
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	F = 6,30 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	n.p.	F = 3,76 p < 0,05	n.p.	n.z.

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno; n.p. – nije primenljivo.

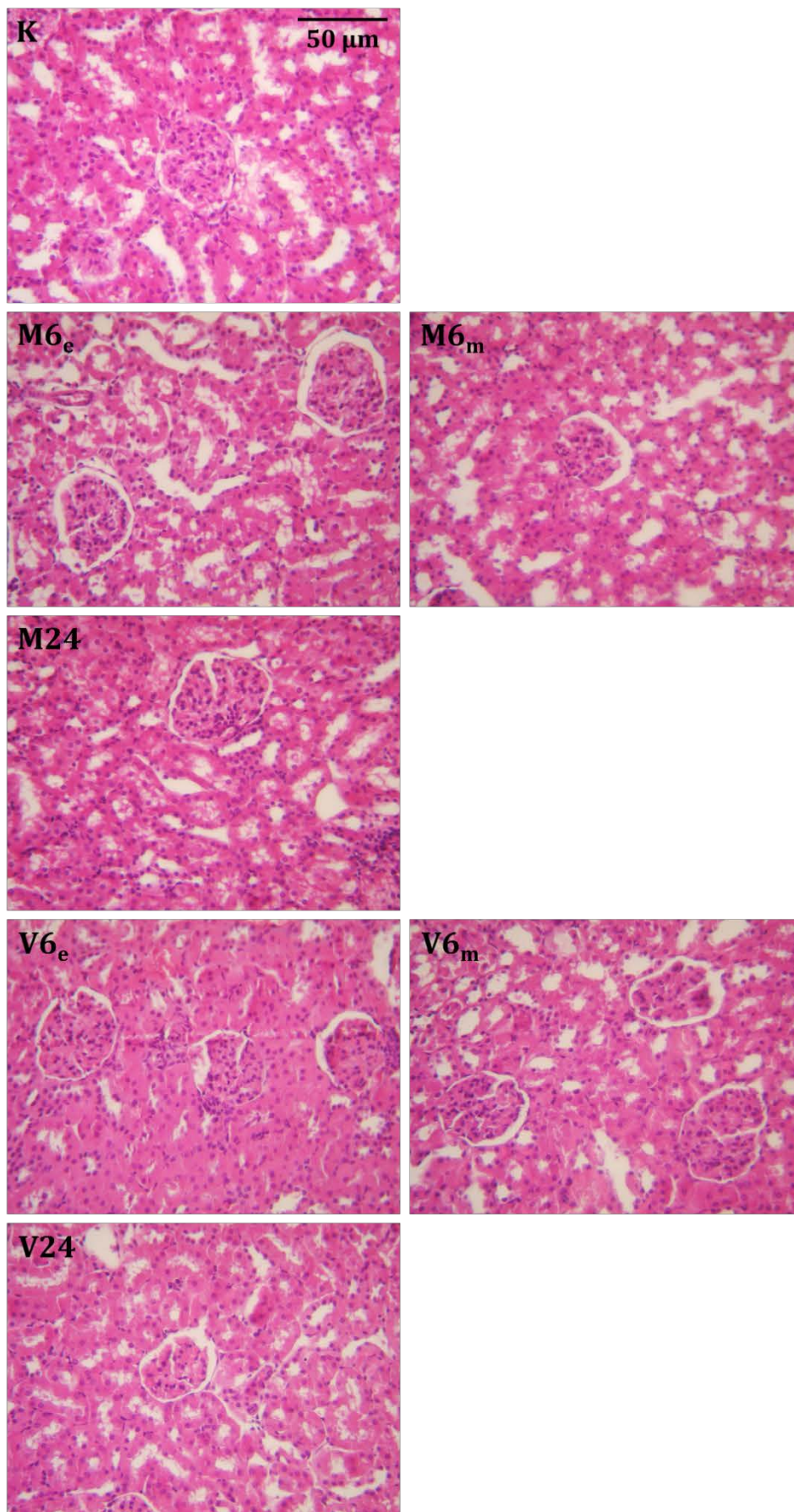
4.1.7. Bubrezi

U bubrežima svih životinja tretiranih ibogainom uočene su blage ili umerene patološke promene proksimalnih tubula i epitelnih ćelija, bez obzira na dozu, vreme i fazu estrusnog ciklusa (Tabela 9; Slika 8). Tretman većom dozom je doveo do izraženijih morfoloških promena. Takođe, u grupama koje su tretirane u estrusu promene su izraženije u poređenju sa grupama tretiranim u metestrusu.

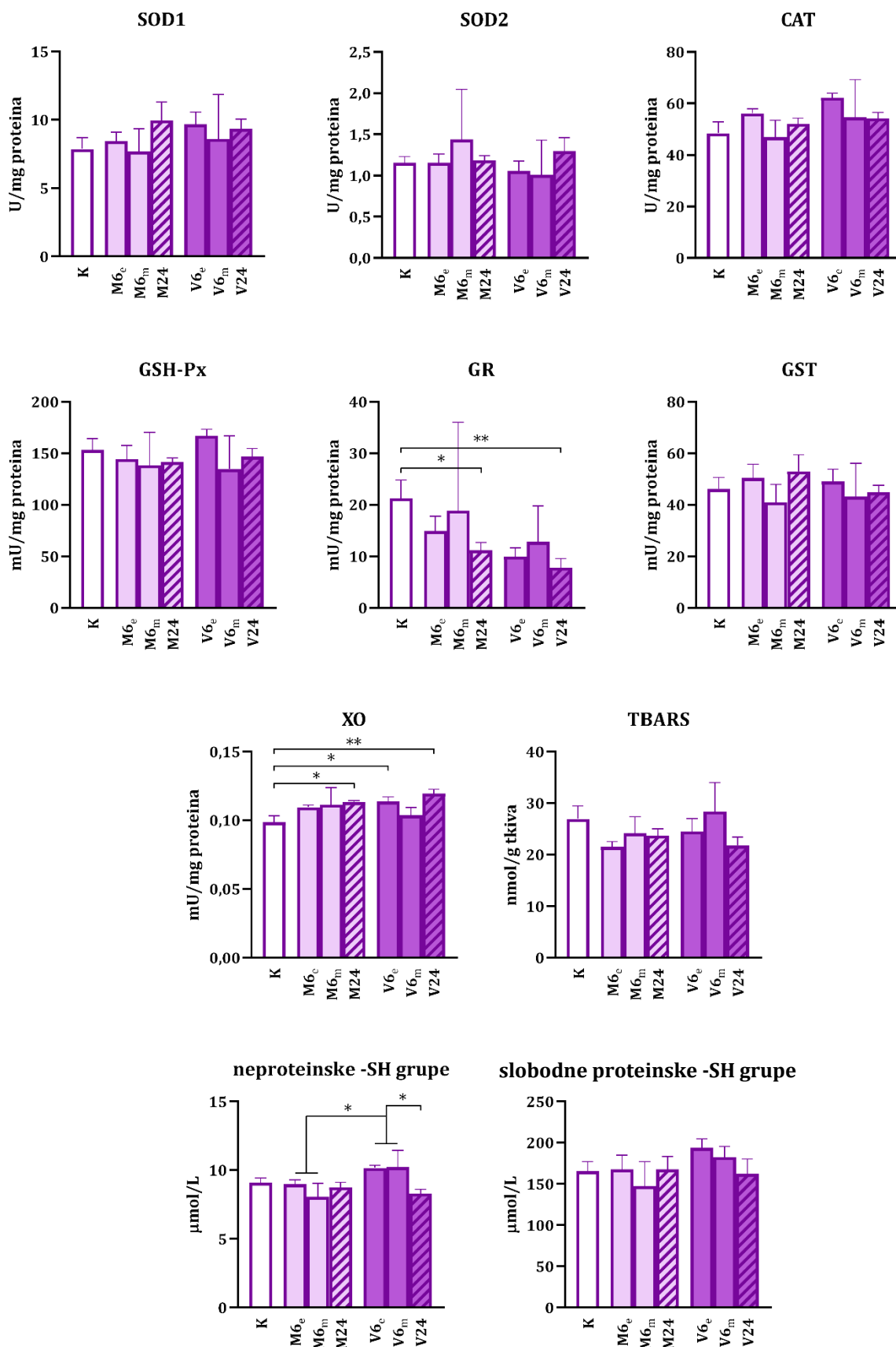
Ibogain je generalno doveo do smanjenja aktivnosti GR i povećanja aktivnosti XO, što je najizraženije 24 sata nakon tretmana obema dozama (Slika 9; Tabela 10). Postoje i značajne razlike u koncentraciji neproteinskih -SH grupa, ali bez razlike u odnosu na kontrolu. Naime, koncentracija neproteinskih -SH grupa 6 sati nakon tretmana većom dozom je bila veća u odnosu na ostale tretirane grupe. Takođe, 6 sati nakon tretmana, koncentracije neproteinskih i slobodnih proteinskih -SH grupa bile su veće nakon tretmana većom dozom ibogaina, u poređenju sa manjom dozom. Faza estrusnog ciklusa je imala uticaj na aktivnost CAT koja je bila veća u estrusu.

Tabela 9. Histopatološka analiza bubrega ženki pacova nakon tretmana ibogainom.

	Bez morfoloških promena	Blage morfološke promene	Umerene morfološke promene
K	6/6	0/6	0/6
M6_e	0/4	3/4	1/4
M6_m	0/3	3/3	0/3
M24	0/4	3/4	1/4
V6_e	0/6	0/6	6/6
V6_m	0/5	4/5	1/5
V24	0/6	1/6	5/6



Slika 8. Mikrografije bubrega ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Hematoksilin-eozin, uvećanje objektivna 40×.



Slika 9. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u bubrezima ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Takijev HSD test: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Tabela 10. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u bubrezima ženki pacova nakon tretmana ibogainom – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	F = 4,38 p < 0,01	n.z.	F = 5,16 p < 0,001	n.z.
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
Faktor: faza ciklusa	n.z.	n.z.	e > m F = 5,78 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
Faktor: doza	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	V > M F = 19,02 p < 0,001	V > M F = 5,08 p < 0,05
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	F = 2,87 p < 0,05	n.z.	F = 5,08 p < 0,01	n.z.	F = 6,86 p < 0,001	n.z.
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.z.	F = 3,60 p < 0,05	n.z.	F = 8,99 p < 0,01	n.z.
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	F = 8,21 p < 0,01	n.z.	F = 10,54 p < 0,01	n.z.	n.z.	n.z.

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno; n.p. – nije primenljivo.

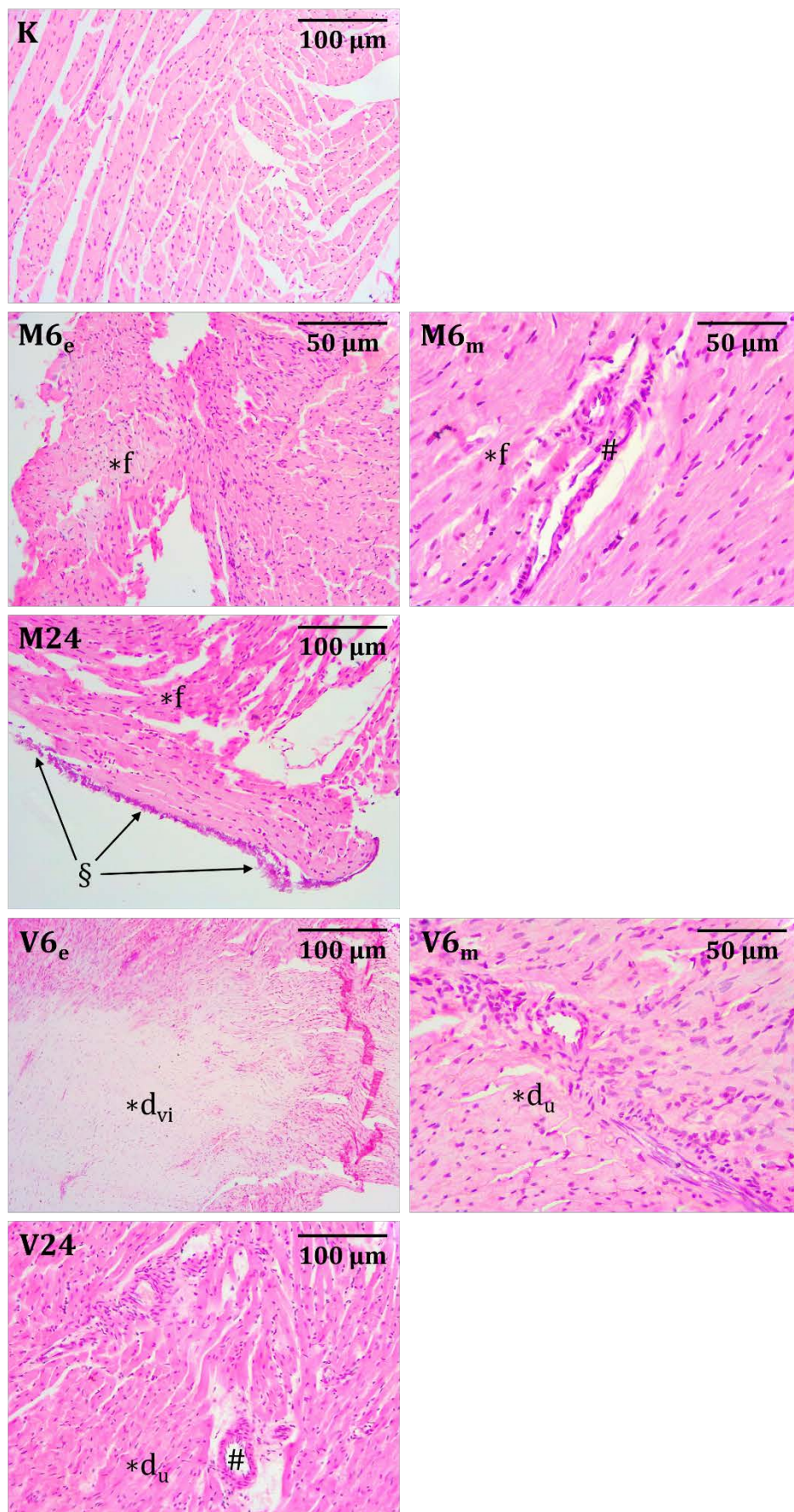
4.1.8. Srce

Ibogain je izazvao histopatološke promene u srcu većine tretiranih pacova (Tabela 11; Slika 10). Najblaže promene su bile prisutne 6 sati nakon tretmana manjom dozom ibogaina. U ovim grupama je u miokardima pojedinih životinja uočena fokalna nekroza kardiomiocita. Nekroza je bila najizraženija 6 sati nakon tretmana velikom dozom u grupi koja je tretirana u estrusu. Ibogain je uzrokovao i pojavu perivaskularnog zapaljenskog infiltrata, naročito nakon tretmana većom dozom. Zapaljenje perikarda je uočeno samo 24 sata nakon tretmana manjom dozom. Ni u jednoj grupi nije uočeno prisustvo mononuklearnog zapaljenskog infiltrata između kardiomiocita, kao ni promena količine masnog tkiva.

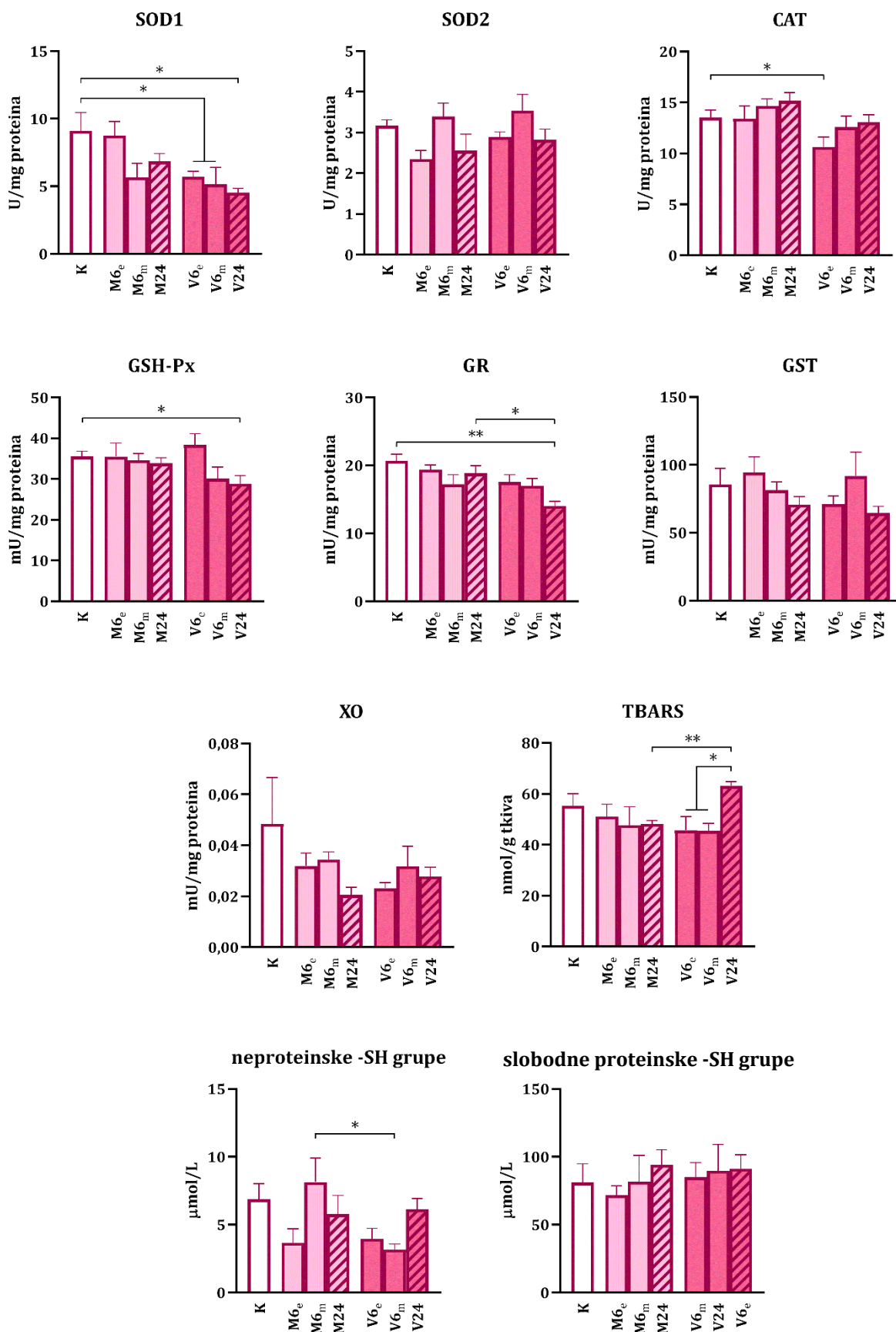
Tretman većom dozom ibogaina je doveo do značajnih razlika u aktivnosti antioksidativnih enzima u odnosu na kontrolu (Slika 11; Tabela 12). Aktivnost SOD1 bila je smanjena 6 i 24 sata nakon tretmana većom dozom. Aktivnost CAT bila je smanjena 6 sati nakon tretmana većom dozom samo u grupi koja je tretirana u estrusu. Takođe, u grupama koje su žrtvovane 6 sati nakon tretmana, aktivnost CAT je bila veća u srcu pacova koji su tretirani manjom dozom. Aktivnost GSH-Px i GR bila je smanjena 24 sata nakon tretmana većom dozom. Postoje i značajne razlike u koncentraciji TBARS i neproteinskih -SH grupa, ali bez razlike u odnosu na kontrolu. U grupama tretiranim većom dozom ibogaina, koncentracija TBARS nakon 24 sata je bila veća nego nakon 6 sati, a takođe je bila veća i u poređenju sa grupom koja je tretirana manjom dozom i žrtvovana nakon 24 sata. Koncentracija neproteinskih -SH grupa u srcu pacova tretiranih manjom dozom u metestrusu, nakon 6 sati je bila veća u poređenju sa grupom koja je tretirana većom dozom. Faza estrusnog ciklusa je imala uticaj na aktivnost SOD2 koja je bila veća u metestrusu.

Tabela 11. Histopatološka analiza srca ženki pacova nakon tretmana ibogainom.

	Nekroza kardiomiocita				
	Odsutna	Fokalna	Difuzna umereno izražena	Difuzna veoma izražena	
K	6/6	0/6	0/6	0/6	
M6e	3/4	1/4	0/4	0/4	
M6m	2/5	3/5	0/5	0/5	
M24	0/4	0/4	4/4	0/4	
V6e	0/6	0/6	0/6	6/6	
V6m	1/5	0/5	4/5	0/5	
V24	0/6	0/6	6/6	0/6	
	Mononuklearni zapaljenski infiltrat	Perivaskularni zapaljenski infiltrat	Količina masnog tkiva		Perikarditis
			smanjena	povećana	
K	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
M6e	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
M6m	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5
M24	0/4	2/4	0/4	0/4	3/4
V6e	0/6	5/6	0/6	0/6	0/6
V6m	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
V24	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6



Slika 10. Mikrografije srca ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Hematoksilin-eozin, uvećanje objektivna 20 i 40×; *f – fokalna nekroza; *d_u – difuzna umerena nekroza; *d_{vi} – difuzna veoma izražena nekroza; # – perivaskularni zapaljenski infiltrat; § – perikarditis.



Slika 11. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u srcu ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Takijev HSD test: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

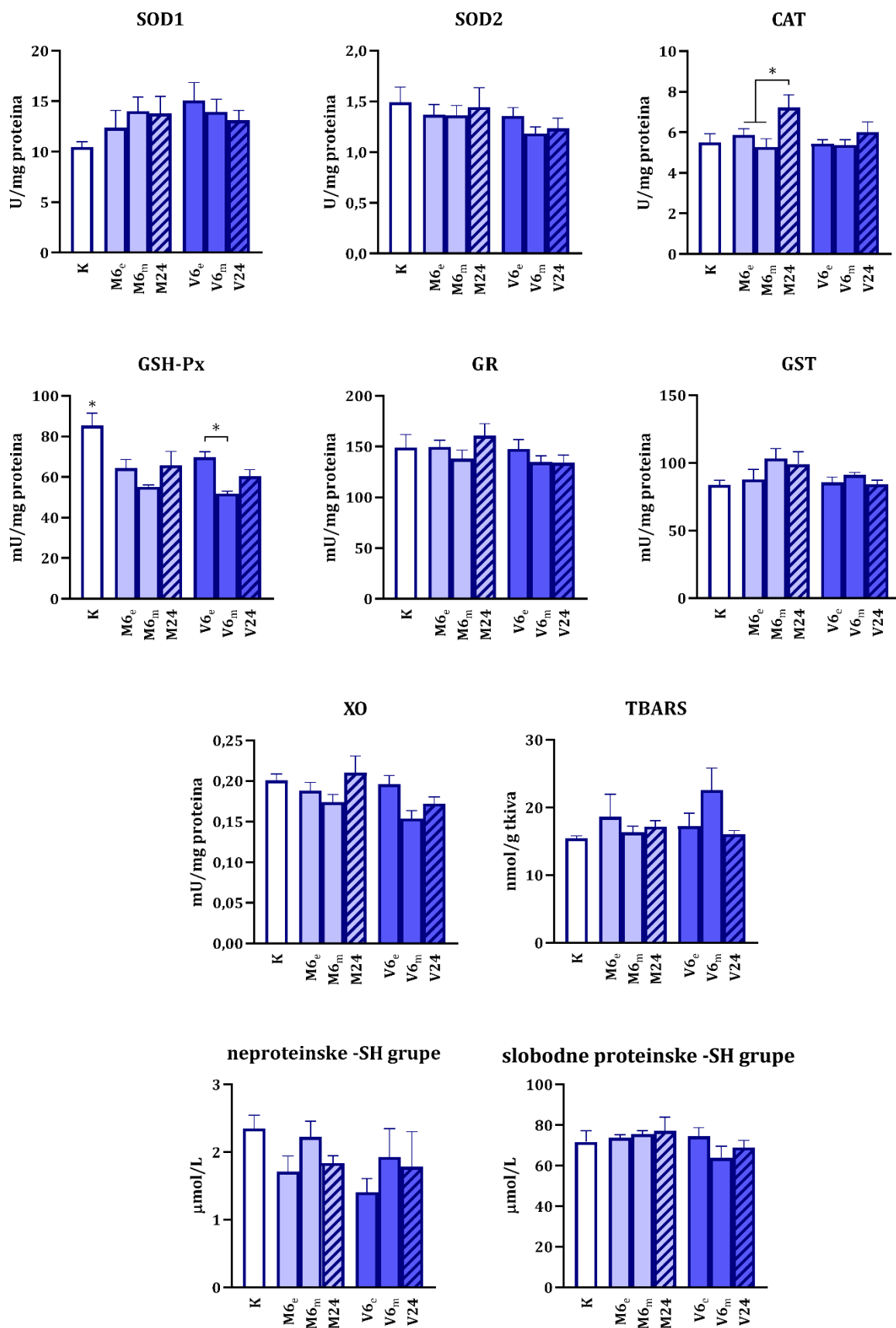
Tabela 12. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u srcu ženki pacova nakon tretmana ibogainom – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	F = 3,90 p < 0,01	n.z.	F = 2,60 p < 0,05	n.z.	F = 4,72 p < 0,01	n.z.	n.z.	n.z.	F = 2,63 p < 0,05	n.z.
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
Faktor: faza ciklusa	n.z.	m > e F = 9,76 p < 0,01	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
Faktor: doza	n.z.	n.z.	M > V F = 5,37 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	M > V F = 4,71 p < 0,05	n.z.
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	F = 5,96 p < 0,05	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	F = 4,00 p < 0,01	n.p.	F = 3,08 p < 0,05	n.z.	F = 6,40 p < 0,001	n.z.	n.z.	F = 3,32 p < 0,05	n.z.	n.z.
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	F = 3,97 p < 0,05	n.p.	n.z.	n.z.	F = 3,62 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	F = 6,86 p < 0,01	n.p.	n.z.	F = 4,87 p < 0,05	F = 13,28 p < 0,001	n.z.	n.z.	F = 6,14 p < 0,05	n.z.	n.z.

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno; n.p. – nije primenljivo.

4.1.9. Ileum

U ileumu je došlo od smanjenja aktivnosti GSH-Px u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolu (Slika 12; Tabela 13). Faza estrusnog ciklusa je takođe imala značajan uticaj na aktivnost GSH-Px u ileumu pacova tretiranih ibogainom u trajanju od 6 sati. Aktivnost je bila veća u estrusu nego u metestrusu, naročito pri većoj dozi ibogaina. Aktivnost CAT je bila najveća 24 sata nakon tretmana manjom dozom i značajno se razlikovala od grupa žrtvovanih 6 sati nakon tretmana. Analiza varijanse je pokazala da postoje značajne razlike u aktivnosti XO između eksperimentalnih grupa ali post-hok test nije dao ni jednu značajnu razliku između pojedinačnih grupa. Faza estrusnog ciklusa je imala uticaj i na aktivnost XO koja je bila veća u estrusu.



Slika 12. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u ileumu ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Takijev HSD test: * – $p < 0,05$.

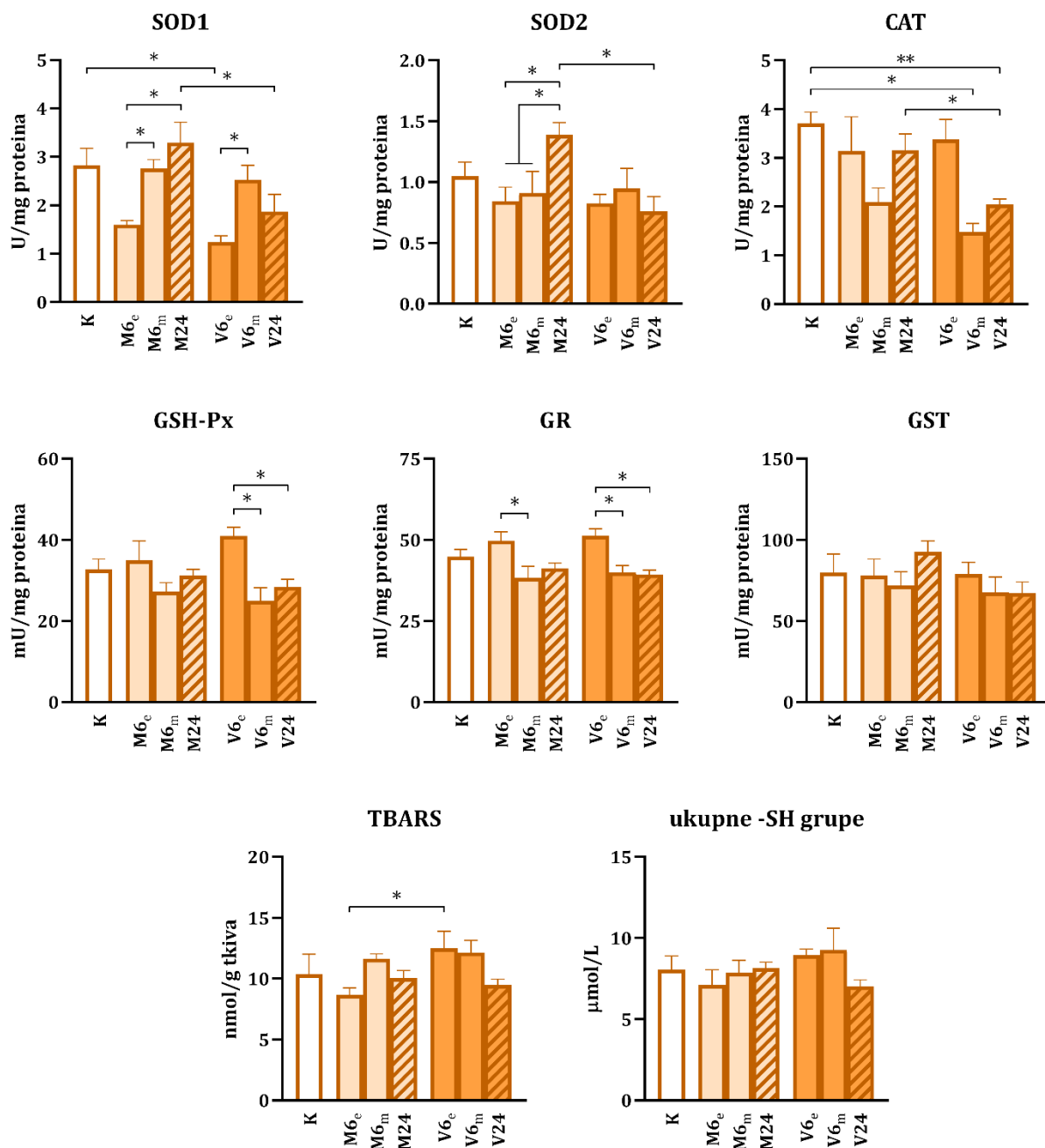
Tabela 13. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u ileumu ženki pacova nakon tretmana ibogainom – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	F = 2,78 p < 0,05	F = 6,04 p < 0,001	n.z.	n.z.	F = 2,51 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
Faktor: faza ciklusa	n.z.	n.z.	n.z.	e > m F = 22,70 p < 0,001	n.z.	n.z.	e > m F = 7,88 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.
Faktor: doza	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	F = 4,04 p < 0,01	n.p.	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.z.
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.z.
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.z.	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.z.

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno; n.p. – nije primenljivo.

4.1.10. Uterus

Faza estrusnog ciklusa je značajano uticala na aktivnost SOD1, CAT, GSH-Px i GR u uterusu pacova tretiranih ibogainom (Slika 13; Tabela 14). Aktivnost SOD1 je bila veća u metestrusu, dok je aktivnost CAT, GSH-Px i GR bila veća u estrusu. Sa druge strane, aktivnosti SOD2 i GST, kao i koncentracije TBARS i ukupnih slobodnih -SH grupa se nisu značajno razlikovale u različitim fazama estrusnog ciklusa. Analiza varijanse za svih sedam eksperimentalnih grupa je pokazala postojanje značajnih razlika u aktivnostima SOD1, SOD2, CAT, GSH-Px i GR, ali kada su odgovarajuće estrusne i metestrusne grupe objedinjene, analiza varijanse je pokazala značajne razlike samo u aktivnostima SOD1 i SOD2. Dakle, najveći udeo u ukupnoj razlici u varijansama između grupa u aktivnosti CAT, GSH-Px i GR imao je estrusni ciklus. Osim razlika po fazama estrusnog ciklusa, aktivnost SOD1 je 6 sati nakon tretmana većom dozom u estrusu bila značajno manja od kontrole. Takođe, 24 sata nakon tretmana manjom dozom aktivnost SOD1 je bila veća nego 24 sata nakon tretmana većom dozom. Aktivnost SOD2, 24 sata nakon tretmana manjom dozom ibogaina je bila veća nego 6 sati nakon tretmana, a takođe je bila veća nego 24 sata nakon tretmana većom dozom ibogaina. Veća doza ibogaina je dovela do značajnog pada aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu, 24 sati nakon tretmana, kao i 6 sati nakon tretmana ali samo u metestrusu. Osim što su aktivnosti GSH-Px i GR bile veće u estrusu nego u metestrusu, za njih je zajedničko i da su aktivnosti u uterusu pacova tretiranih većom dozom u estrusu bile veće 6 sati nakon tretmana u poređenju sa 24 sati nakon tretmana. Koncentracija TBARS u grupama koje su žrtvovane 6 sati nakon tretmana je bila veća nakon tretmana većom dozom ibogaina, bez značajnih razlika u odnosu na kontrolu. Nije bilo značajnih razlika u aktivnosti GST niti u koncentraciji ukupnih slobodnih -SH grupa.



Slika 13. Aktivnost antioksidativnih enzima i glutation-S transferaze, i koncentracije TBARS i ukupnih slobodnih sulfhidrilnih grupa u uterusu ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Takijev HSD test: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

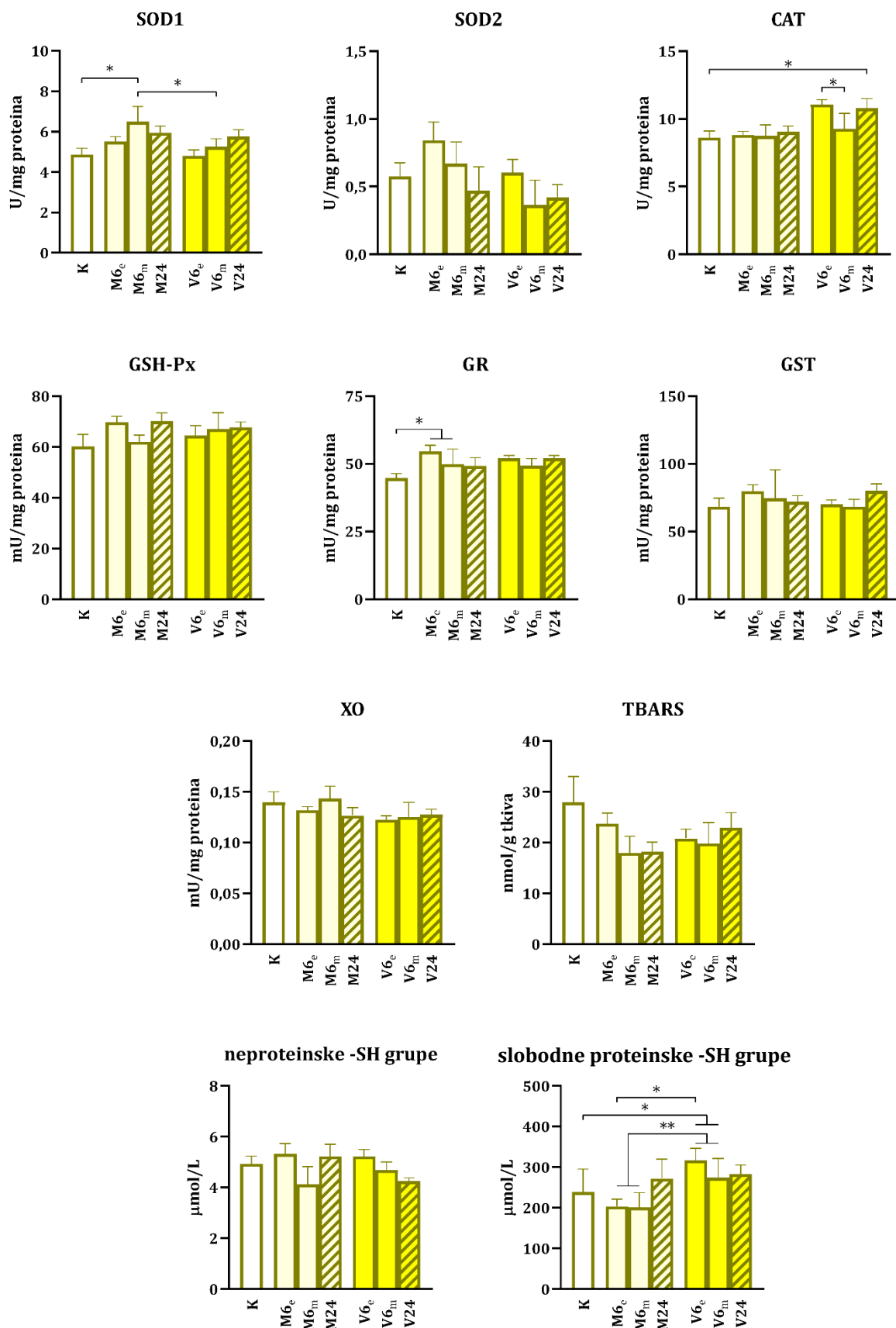
Tabela 14. Aktivnost antioksidativnih enzima i glutation-S transferaze, i koncentracije TBARS i ukupnih slobodnih sulfhidrilnih grupa u uterusu ženki pacova nakon tretmana ibogainom – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)								
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	TBARS	Ukupne -SH grupe
	F = 6,47 p < 0,01	F = 3,01 p < 0,05	F = 4,58 p < 0,01	F = 3,57 p < 0,01	F = 5,09 p < 0,001	n.z.	n.z.	n.z.
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)								
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	TBARS	Ukupne -SH grupe
Faktor: faza ciklusa	m > e F = 44,85 p < 0,001	n.z.	e > m F = 9,62 p < 0,01	e > m F = 12,25 p < 0,01	e > m F = 17,14 p < 0,001	n.z.	n.z.	n.z.
Faktor: doza	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	V > M F = 4,91 p < 0,05	n.z.
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)								
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	TBARS	Ukupne -SH grupe
	n.p.	F = 4,55 p < 0,01	n.p.	n.p.	n.p.	n.z.	n.z.	n.z.
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)								
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	TBARS	Ukupne -SH grupe
	n.p.	n.z.	n.p.	n.p.	n.p.	n.z.	n.z.	n.z.
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)								
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	TBARS	Ukupne -SH grupe
	n.p.	F = 7,70 p < 0,01	n.p.	n.p.	n.p.	n.z.	n.z.	n.z.

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno; n.p. – nije primenljivo.

4.1.11. Pluća

Manja doza ibogaina dovela je do značajnog povećanja aktivnosti SOD1 u odnosu na kontrolu kod životinja tretiranih u estrusu, 6 sati nakon tretmana (Slika 14; Tabela 15). Manja doza je dovela i do povećanja aktivnosti GR 6 sati nakon tretmana. Veća doza je dovela do povećanja aktivnosti CAT 24 sata nakon tretmana, i do povećanja koncentracije slobodnih proteinskih -SH grupa 6 sati nakon tretmana. Najveći udeo u ukupnim razlikama u varijansi između eksperimentalnih grupa potiče od grupa koje su žrtvovane 6 sati nakon tretmana. Preciznije, osim CAT čija je aktivnost bila značajno povećana 24 sata nakon tretmana većom dozom, sve ostale značajne razlike između grupa su zabeležene 6 sati nakon tretmana. Aktivnost SOD1, SOD2 i XO je bila veća 6 sati nakon tretmana manjom dozom, a aktivnost CAT i koncentracija proteinskih -SH grupa nakon tretmana većom dozom. Postojale su i značajne razlike između faza estrusnog ciklusa u aktivnosti SOD1 i CAT, i u koncentraciji neproteinskih -SH grupa. Aktivnost SOD1 je bila veća u grupama koje su tretirane u metestrusu, a aktivnost CAT i koncentracija neproteinskih -SH grupa je bila veća u grupama koje su tretirane u estrusu.



Slika 14. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u plućima ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Takijev HSD test: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

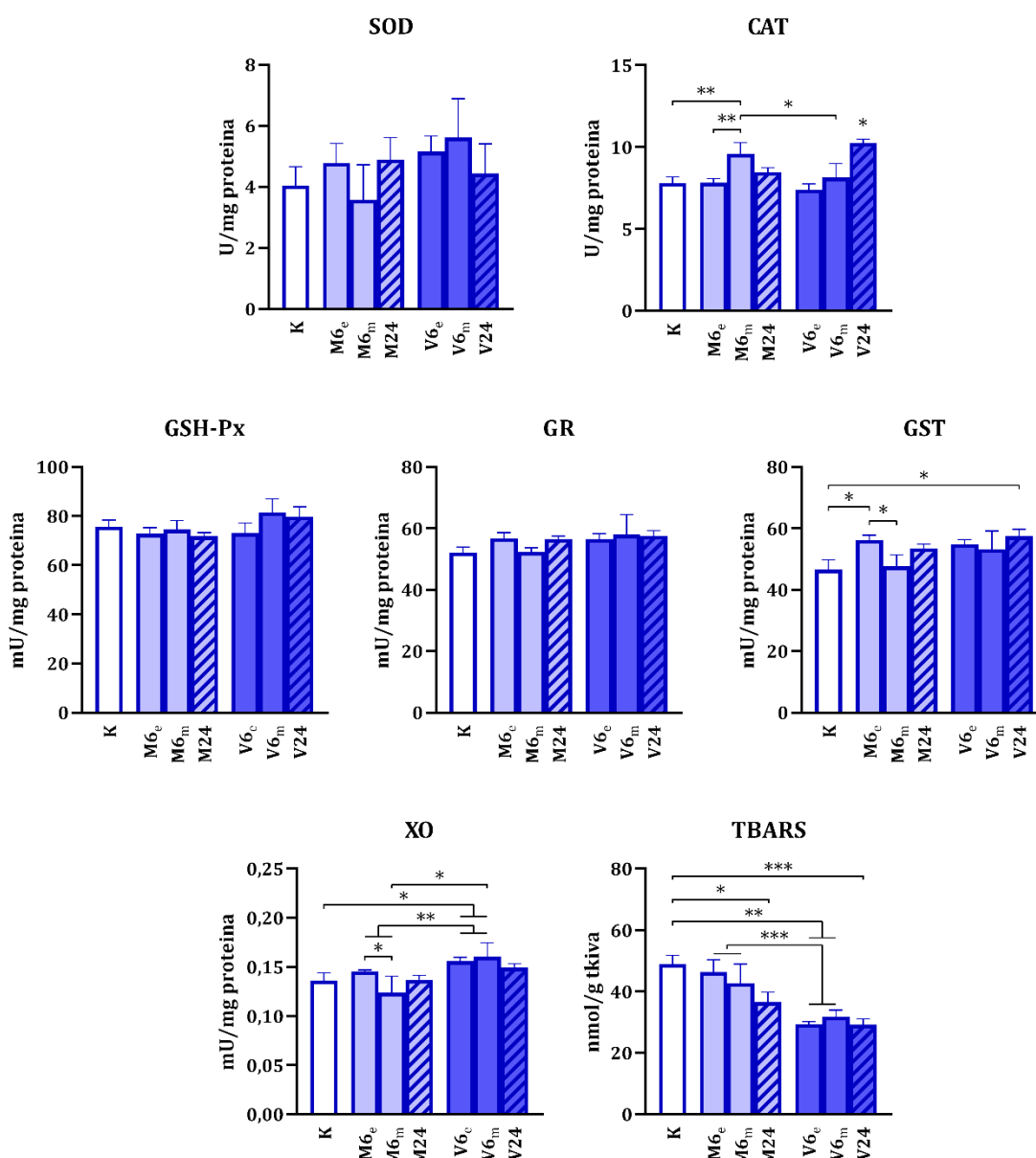
Tabela 15. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u plućima ženki pacova nakon tretmana ibogainom – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	F = 4,02 p < 0,01	n.z.	F = 4,82 p < 0,01	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	F = 2,42 p < 0,05	F = 3,24 p < 0,05
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
Faktor: faza ciklusa	m > e F = 7,10 p < 0,05	n.z.	e > m F = 6,06 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	e > m F = 7,79 p < 0,05	n.z.
Faktor: doza	M > V F = 13,20 p < 0,01	M > V F = 6,66 p < 0,05	V > M F = 9,23 p < 0,01	n.z.	n.z.	n.z.	M > V F = 8,33 p < 0,01	n.z.	n.z.	V > M F = 17,34 p < 0,001
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.p.	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.p.	F = 4,64 p < 0,01
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.p.	n.z.	n.p.	n.z.	F = 5,91 p < 0,01	n.z.	n.z.	n.z.	n.p.	F = 11,44 p < 0,001
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.p.	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno; n.p. – nije primenljivo.

4.1.12. Slezina

U poređenju sa kontrolnom grupom, aktivnost CAT je bila povećana 6 sati nakon tretmana manjom dozom ibogaina u metestrusu i 24 sata nakon tretmana većom dozom (Slika 15; Tabela 16). Aktivnost GST u slezini je bila generalno povećana i značajno se razlikovala od kontrole 6 sati nakon tretmana manjom dozom ibogaina u estrusu i 24 sata nakon tretmana većom dozom. Aktivnost XO je 6 sati nakon tretmana većom dozom bila povećana u odnosu na kontrolnu grupu i grupe tretirane manjom dozom. Koncentracija TBARS je bila značajno manja od kontrole 24 sata nakon tretmana manjom dozom, i 6 i 24 sata nakon tretmana većom dozom. Faza estrusnog ciklusa je imala značajan uticaj na aktivnost CAT i GST nakon tretmana manjom dozom. Aktivnost CAT je bila veća u grupi koja je tretirana u metestrusu, a aktivnost GST u grupi koja je tretirana u estrusu.



Slika 15. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS u slezini ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Takijev HSD test: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

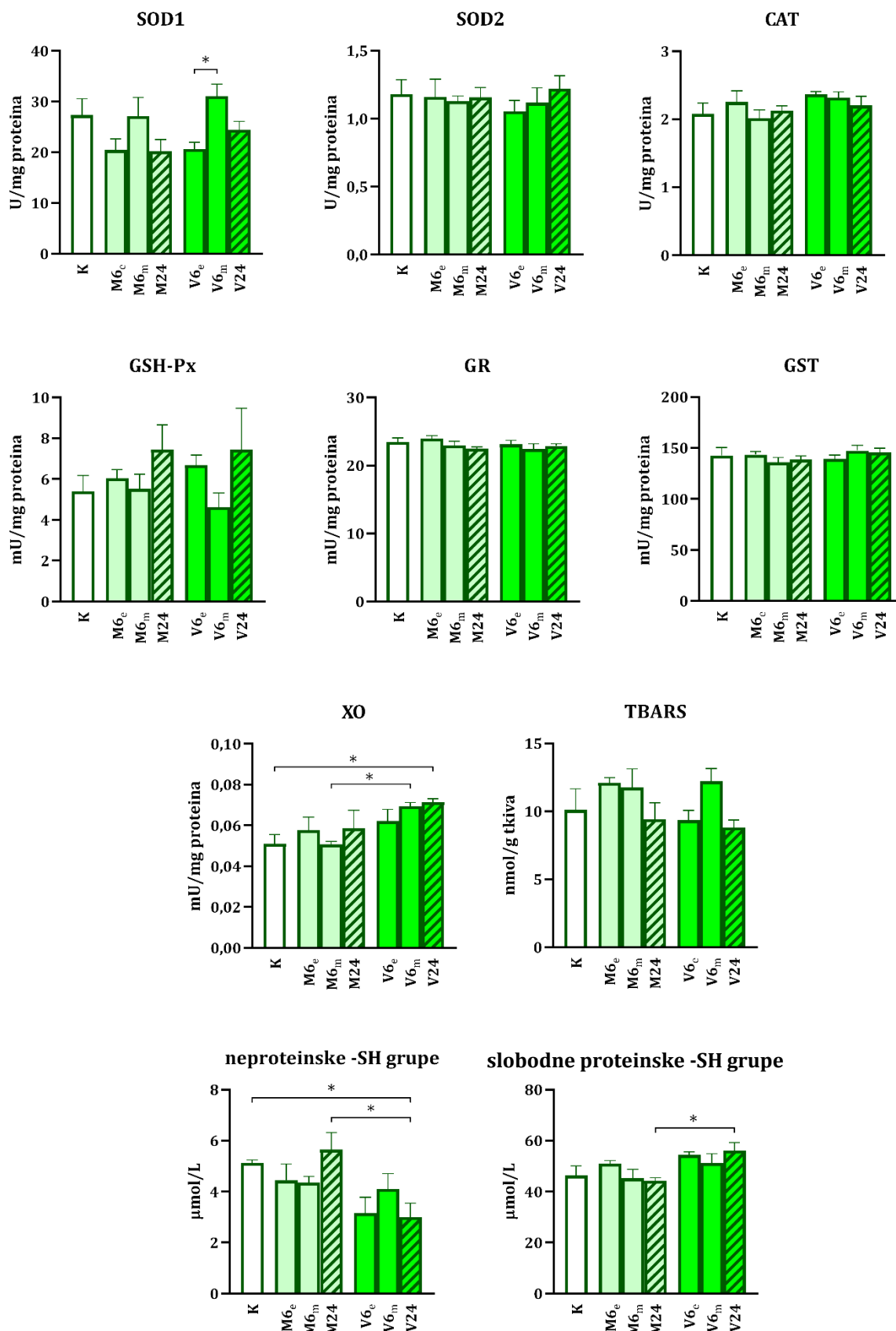
Tabela 16. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS u slezini ženki pacova nakon tretmana ibogainom – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)							
	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS
	n.z.	F = 11,56 p < 0,001	n.z.	n.z.	F = 3,73 p < 0,01	F = 5,29 p < 0,001	F = 8,54 p < 0,001
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)							
	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS
Faktor: faza ciklusa	n.z.	m > e F = 15,10 p < 0,001	n.z.	n.z.	e > m F = 7,47 p < 0,05	n.z.	n.z.
Faktor: doza	V > M F = 4,37 p = 0,051	M > V F = 8,31 p < 0,01	n.z.	n.z.	n.z.	V > M F = 22,10 p < 0,001	M > V F = 22,87 p < 0,001
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	F = 6,94 p < 0,05	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)							
	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS
	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.p.	F = 4,95 p < 0,01	F = 12,83 p < 0,001
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)							
	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS
	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.p.	F = 7,25 p < 0,01	F = 18,32 p < 0,001
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)							
	SOD	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS
	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	F = 12,92 p < 0,001

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno; n.p. – nije primenljivo.

4.1.13. Mozak

U poređenju sa kontrolnom grupom, aktivnost XO je bila značajno povećana, a koncentracija neproteinskih -SH grupa značajno smanjena 24 sata nakon tretmana većom dozom ibogaina (Slika 16; Tabela 17). Koncentracija neproteinskih -SH grupa 24 sata nakon tretmana većom dozom se značajno razlikovala i od grupe tretirane manjom dozom koja nije dovela do smanjenja koncentracije. Sa druge strane koncentracija proteinskih -SH grupa je bila značajno veća nakon 24 sata u grupi koja je tretirana većom dozom u odnosu na grupu koja je tretirana manjom dozom. Aktivnost XO je bila veća 6 sati nakon tretmana većom dozom nego nakon tretmana manjom dozom u metestrusu. Faza estrusnog ciklusa je imala značajan uticaj na aktivnost SOD1 i GSH-Px. Aktivnost SOD1 je bila veća u grupi koja je tretirana u metestrusu, a aktivnost GSH-Px u grupi koja je tretirana u estrusu.



Slika 16. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u mozgu ženki pacova nakon tretmana ibogainom. Takijev HSD test: * – $p < 0,05$.

Tabela 17. Aktivnost antioksidativnih enzima, glutation-S transferaze i ksantin oksidaze, i koncentracije TBARS, neproteinskih i slobodnih proteinskih sulfhidrilnih grupa u mozgu ženki pacova nakon tretmana ibogainom – analiza varijanse.

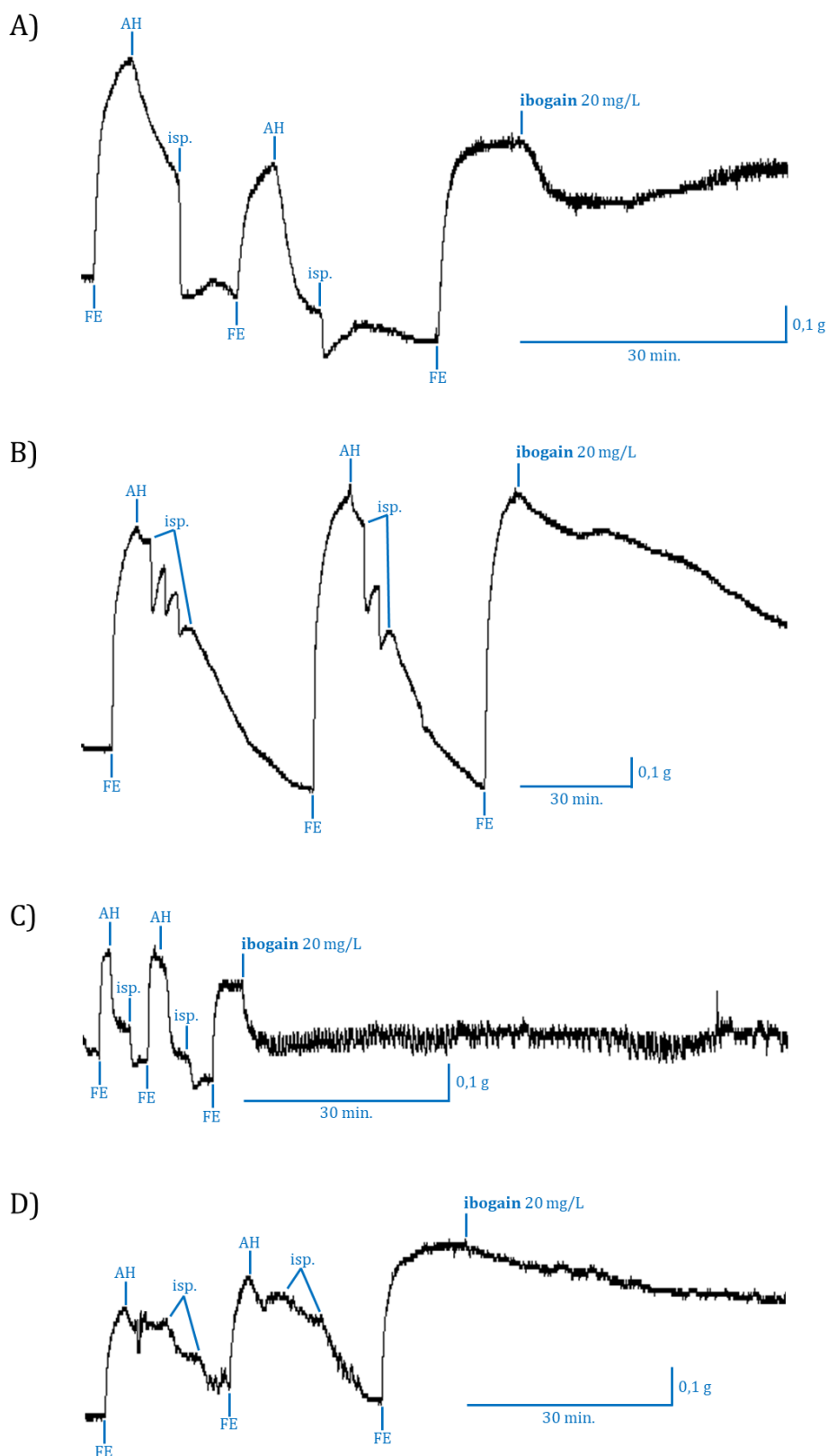
A) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6_e, M6_m, M24, V6_e, V6_m, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	F = 2,86 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	F = 2,77 p < 0,05	n.z.	F = 3,32 p < 0,05	F = 2,85 p < 0,05
B) Dvofaktorska analiza varijanse (M6_e, M6_m, V6_e, V6_m)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
Faktor: faza ciklusa	m > e F = 2,37 p < 0,01	n.z.	n.z.	e > m F = 5,06 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
Faktor: doza	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	V > M F = 6,44 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
C) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, M24, V6, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.p.	n.z.	n.z.	n.p.		n.z.	F = 3,63 p < 0,05	n.z.	F = 4,64 p < 0,01	F = 3,47 p < 0,05
D) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M6, V6)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.p.	n.z.	n.z.	n.p.	n.z.	n.z.	F = 4,66 p < 0,05	n.z.	F = 3,47 p < 0,05	n.z.
E) Jednofaktorska analiza varijanse (K, M24, V24)										
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	GST	XO	TBARS	Neproteinske -SH grupe	Proteinske -SH grupe
	n.p.	n.z.	n.z.	n.p.		n.z.	F = 2,84 p < 0,05	n.z.	F = 8,72 p < 0,01	F = 4,41 p < 0,05

Grupe M6 i V6 su dobijene spajanjem grupa M6_e i M6_m, odnosno V6_e i V6_m. n.z. – nije značajno; n.p. – nije primenljivo.

4.2. Vazoaktivna svojstva ibogaina

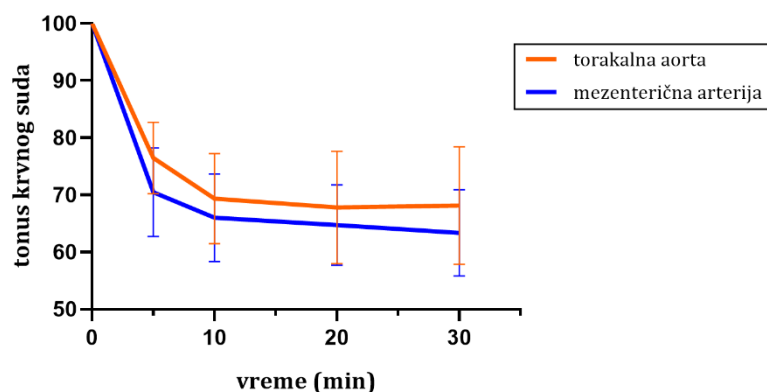
4.2.1. Efekti ibogaina na tonus izolovanih krvnih sudova

Pokazano je da ibogain (20 mg/l,) ima relaksantni efekat, odnosno da smanjuje tonus izolovanih arterija (torakalne aorte i mezenterične arterije pacova) prekontrahovanih fenilefrinom (Slika 17; Slika 18A; Tabela 18A). Relaksantni efekat ibogaina je bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa stepenom funkcionalne očuvanosti endotela u oba tipa arterija (Pirsonov koeficijent korelacije, Tabela 19). Da bi se dalje ispitala uloga endotela, preparati izolovanih arterija su podeljeni u dve grupe na osnovu funkcionalnog testa očuvanosti endotela sa acetilholinom. U grupu sa funkcionalno očuvanim endotelom (E+) su svrstani preparati kod kojih je acetilholin izazivao smanjenje tonusa od 80% ili više, dok su ostali preparati svrstani u grupu bez funkcionalno očuvanog endotela (E-) (Slika 17; Slika 18B,C). Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala značajan efekat očuvanosti endotela (Tabela 18B), kao i značajan efekat vremena. Ipak relaksantni efekti ibogaina nisu u potpunosti posredovani endotelom, pošto je ibogain u određenoj meri smanjivao tonus i onih preparata izolovanih arterija kod kojih test sa acetilholinom nije pokazao nikakvu očuvanost endotela.

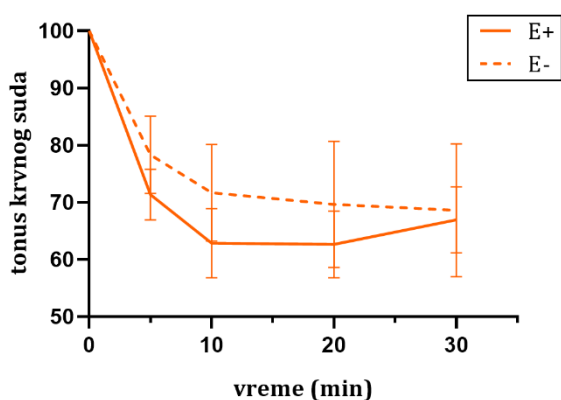


Slika 17. Reprezentativni zapisi relaksantnog efekta ibogaina (20 mg/l) na tonus izolovanih arterija pacova prekontrahovanih fenilefrinom: **A)** torakalna aorta sa funkcionalno očuvanim endotelom; **B)** torakalna aorta bez funkcionalno očuvanog endotela; **C)** mezenterična arterija sa funkcionalno očuvanim endotelom; **D)** mezenterična arterija bez funkcionalno očuvanog endotela. FE – fenilefrin; AH – acetilholin; isp. – ispiranje.

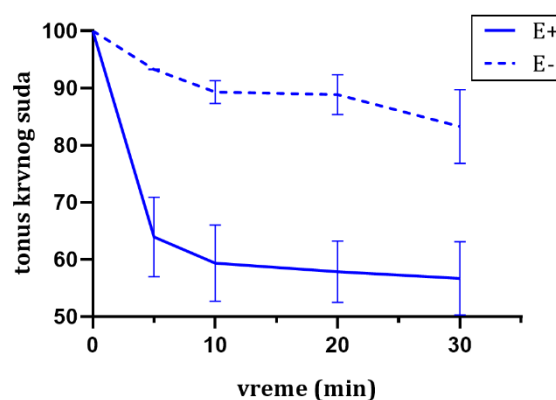
A) torakalna aorta i mezenterična arterija



B) torakalna aorta



C) mezenterična arterija



Slika 18. Relaksantni efekat ibogaina (20 mg/l) na tonus izolovanih arterija pacova prekontrahovanih fenilefrinom: **A)** torakalna aorta i mezenterična arterija – preparati nisu razdvajani na osnovu testa funkcionalne očuvanosti endotela; **B)** torakalna aorta sa i bez funkcionalno očuvanog endotela; **C)** mezenterična arterija sa i bez funkcionalno očuvanog endotela. E+ – preparati sa funkcionalno očuvanim endotelom; E- – preparati bez funkcionalno očuvanog endotela.

Tabela 18. Relaksantni efekat ibogaina na: **A)** izolovanu torakalnu aortu (n = 17) i **B)** mezenteričnu arteriju pacova (n = 9) – analiza varijanse.

A) Jednofaktorska analiza varijanse		
	Torakalna aorta	Mezenterična arterija
	F = 10,07 p < 0,001	F = 4,599 p < 0,01
B) Dvofaktorska analiza varijanse		
	Torakalna aorta	Mezenterična arterija
Faktor: vreme	F = 10,77 p < 0,001	F = 4,13 p < 0,01
Faktor: očuvanost endotela	F = 7,03 p < 0,01	F = 7,37 p < 0,01
Interakcija	n.z.	n.z.

n.z. – nije značajno.

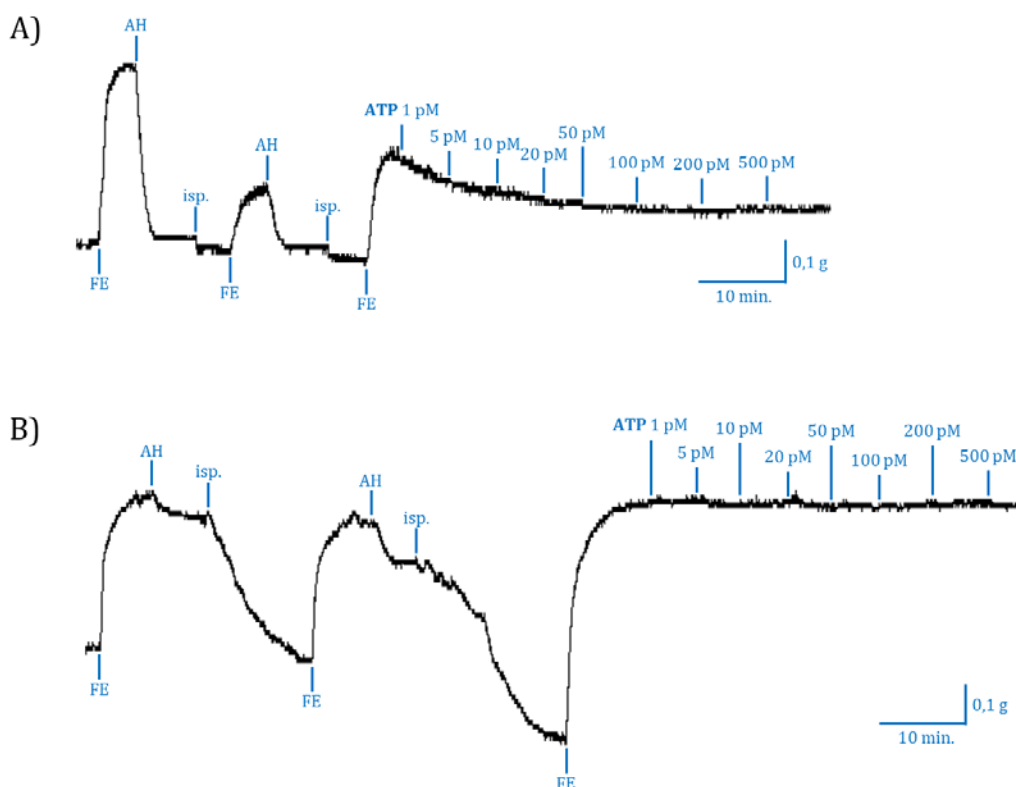
Tabela 19. Pirsonov koeficijent korelacije stepena funkcionalne očuvanosti endotela i relaksantnog efekta ibogaina na: **A)** izolovanu torakalnu aortu i **B)** mezenteričnu arteriju pacova.

A) Torakalna aorta				
	5 min.	10 min.	20 min.	30 min.
r =	-0,605	-0,676	-0,633	-0,490
r ² =	0,365	0,457	0,401	0,240
p <	0,001	0,01	0,01	0,05
B) Mezenterična arterija				
	5 min.	10 min.	20 min.	30 min.
r =	-0,580	-0,627	-0,686	-0,521
r ² =	0,337	0,393	0,470	0,272
p <	0,05	0,05	0,05	n.z.

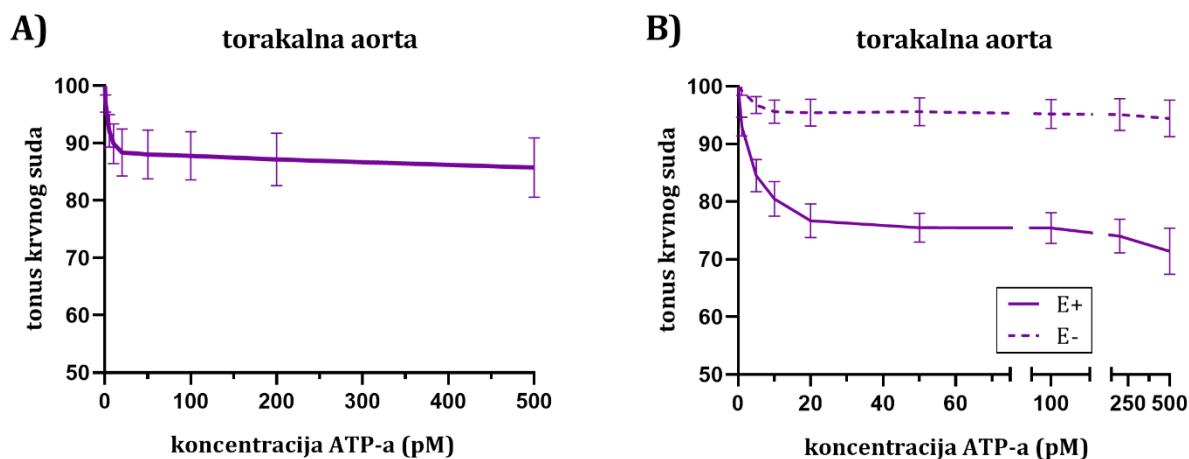
n.z. – nije značajno.

4.2.2. Efekti ATP na tonus izolovanih krvnih sudova

Da bi se ispitala eventualna uloga ATP u relaksantnom dejstvu ibogaina, preparati izolovane torakalne aorte prekontrahovane fenilefrinom su tretirani rastućim koncentracijama ATP u opsegu od 1 do 500 pM (kumulativno do 688 pM) (Slika 19; Slika 20A). Jednofaktorska analiza varijanse nije pokazala postojanje značajnih razlika u tonusu (Tabela 20A). Ipak, Pirsonov koeficijent korelacije je pokazao značajnu pozitivnu korelaciju između stepena funkcionalne očuvanosti endotela i efekta rastućih koncentracija ATP na tonus izolovane torakalne aorte (Tabela 21). Zbog toga su preparati u zavisnosti od stepena očuvanosti endotela podeljeni u dve grupe na način koji je opisan u prethodnom odeljku (Slika 19; Slika 20B). Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala značajan efekat očuvanosti endotela (Tabela 20B), kao i koncentracije, ali i značajnu interakciju ovih faktora. U grupi bez očuvanog endotela, pad tonusa se u najvećoj meri dešava pri koncentracijama od 1 i 5 pM nakon čega se skoro uopšte ne menja i nakon 500 pM ATP (kumulativno 688 pM) iznosi približno 95% početnog tonusa. U grupi sa očuvanim endotelom tonus se u najvećoj meri smanjuje nakon dodavanja koncentracija od 1-20 pM (kumulativno 36 pM) a pri najvećoj koncentraciji od 500 pM ATP (kumulativno 688 pM) iznosi približno 75% početnog tonusa.



Slika 19. Reprezentativni zapisi relaksantnog efekta ATP (1-500 pM, kumulativno 688 pM) na tonus izolovane torakalne aorte pacova prekontrahovane fenilefrinom: **A)** torakalna aorta sa funkcionalno očuvanim endotelom; **B)** torakalna aorta bez funkcionalno očuvanog endotela. FE – fenilefrin; AH – acetilholin; isp. – ispiranje.



Slika 20. Relaksantni efekat ATP (1-500 pM, kumulativno 688 pM) na tonus izolovane torakalne aorte pacova prekontrahovane fenilefrinom: **A)** preparati nisu razdvajani na osnovu testa funkcionalne očuvanosti endotela; **B)** torakalna aorta sa i bez funkcionalno očuvanog endotela. E+ – preparati sa funkcionalno očuvanim endotelom; E- – preparati bez funkcionalno očuvanog endotela.

Tabela 20. Relaksantno dejstvo ibogaina na izolovanu torakalnu aortu pacova – analiza varijanse; n = 8.

A) Jednofaktorska analiza varijanse	
n.z.	
B) Dvofaktorska analiza varijanse	
Faktor: koncentracija	F = 6,12 p < 0,001
Faktor: očuvanost endotela	F = 98,12 p < 0,001
Interakcija	F = 2,93 p < 0,01
n.z. – nije značajno.	

Tabela 21. Pirsonov koeficijent korelacije stepena funkcionalne očuvanosti endotela i relaksantnog efekta ATP na izolovanu torakalnu aortu pacova.

	1 pM	5 pM	10 pM	20 pM	50 pM	100 pM	200 pM	500 pM
r	-0,609	-0,690	-0,728	-0,760	-0,783	-0,777	-0,865	-0,744
r ²	0,370	0,477	0,530	0,578	0,612	0,600	0,749	0,554
n.z.	n.z.	n.z.	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,01	p < 0,05

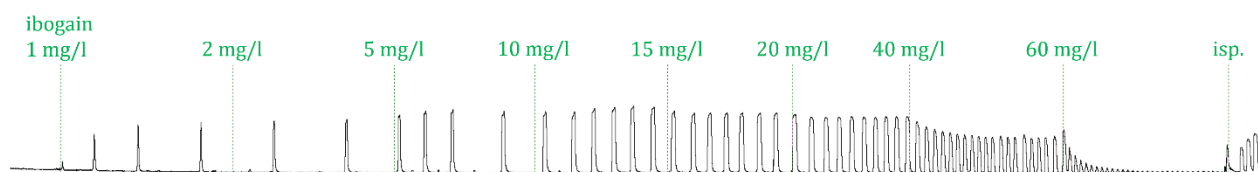
n.z. – nije značajno.

4.3. Efekti ibogaina na kontraktilnu aktivnost i ROS/AOS/redoks homeostazu izolovanog uterusa

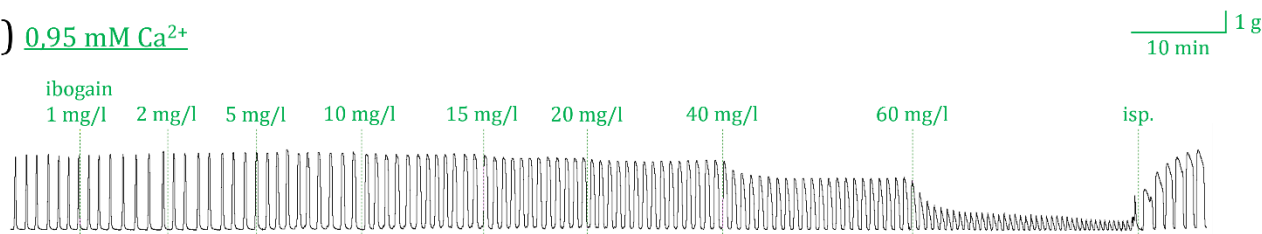
4.3.1. Stimulacija i inhibicija kontraktilne aktivnosti izolovanog uterusa rastućim koncentracijama ibogaina

Ibogain u nižim koncentracijama stimuliše a u višim koncentracijama inhibira kontraktilnu aktivnost glatkih mišićnih ćelija u izolovanom uterusu pacova (Slika 21). U De Jalonovom izotoničnom rastvoru sa 0,4 mM Ca^{2+} , koncentracija Ca^{2+} je previše niska da bi se preparat kontrahovao (Slika 21A). Dodavanje ibogaina (1 mg/l) dovodi do pojave kontrakcija. Sa porastom koncentracije ibogaina rastu amplituda i frekvencija, i uspostavlja se pravilna fazna kontraktilna aktivnost. Sa porastom koncentracije ibogaina raste i širina pika, odnosno povećava se trajanje pojedinačnih kontrakcija. U De Jalonovom izotoničnom rastvoru sa 0,95 mM Ca^{2+} , preparat izolovanog uterusa ima pravilnu faznu kontraktilnu aktivnost (Slika 21B). U ovom slučaju niže koncentracije ibogaina ne dovode do bitnog povećanja amplitude ili frekvencije ali takođe dovode do povećanja trajanja pojedinačnih kontrakcija. Veće koncentracije ibogaina dovode do smanjenja amplitude koje je praćeno porastom frekvencije, i konačno do potpunog prestanka kontraktilne aktivnosti. Inhibitorno dejstvo ibogaina je reverzibilno, odnosno kontraktilna aktivnost se ponovo uspostavlja nakon ispiranja preparata.

A) 0,4 mM Ca^{2+}



B) 0,95 mM Ca^{2+}

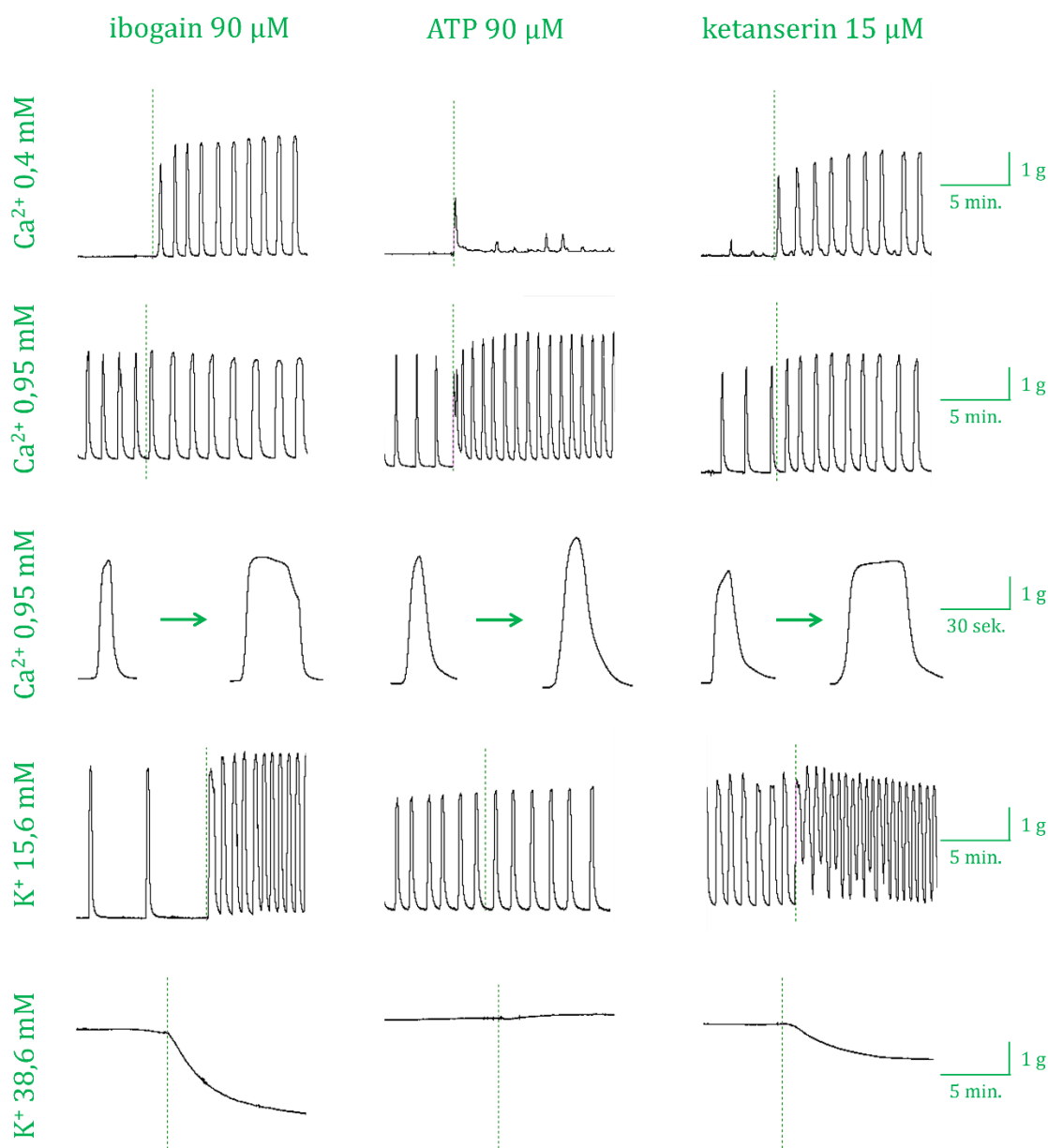


Slika 21. Reprezentativni zapisi efekta rastućih koncentracija ibogaina (1-60 mg/l, kumulativno 153 mg/l; 2,9- μM) na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova: **A)** De Jalonov izotonični rastvor sa 0,4 mM Ca^{2+} u kom se preparat ne kontrahuje; **B)** De Jalonov izotonični rastvor sa 0,95 mM Ca^{2+} u kom preparat ima pravilnu faznu kontraktilnu aktivnost ; isp. – ispiranje.

4.3.2. Uloga 5-HT receptora, ATP i H_2O_2

Da bi se ispitala eventualna uloga ATP u stimulatornom efektu ibogaina, odnosno uporedili efekti ATP i ibogaina, kao i da bi se donekle razjasnili farmakološki mehanizmi efekata ibogaina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova, prvo su utvrđene modifikacije De Jalonovog rastvora sa određenim koncentracijama Ca^{2+} i K^+ pri kojima preparati izolovanog uterusa imaju karakterističnu kontraktilnu aktivnost, a u isto vreme ibogain, u izabranoj koncentraciji, ima karakterističan efekat. Na taj način je postignuta maksimalna reproducibilnost. U takvim uslovima efekti ibogaina su poređeni sa efektima ATP, kao i sa efektima različitih inhibitora/blokatora receptora/jonskih kanala iz laboratorijske kolekcije. Pokazano je da nema sličnosti u efektima ibogaina i ATP ali da postoji izuzetna sličnost u efektima ibogaina i ketanserina (Slika 22). U De

Jalonovom izotoničnom rastvoru sa 0,4 mM Ca²⁺, u kom se preparat izolovanog uterusa ne kontrahuje, nakon dodavanja ibogaina (90 μM) uspostavlja se pravilna fazna kontraktilna aktivnost. Sa druge strane, dodavanje ATP (90 μM) nema ovakav efekat. U De Jalonovom izotoničnom rastvoru sa 0,95 mM Ca²⁺, u kom preparat izolovanog uterusa ima pravilnu faznu kontraktilnu aktivnost, ibogain povećava trajanje pojedinačnih kontrakcija, dok ATP povećava amplitudu i frekvenciju bez bitnog efekta na trajanje kontrakcija. U De Jalonovom izotoničnom rastvoru sa 15,6 mM K⁺, u kom preparat izolovanog uterusa ima pravilnu faznu kontraktilnu aktivnost, ibogain povećava frekvenciju, dok ATP nema efekat na frekvenciju. I na kraju, u De Jalonovom izotoničnom rastvoru sa 38,6 mM K⁺, koji izaziva toničnu kontrakciju preparata izolovanog uterusa, ibogain dovodi do delimične relaksacije, dok ATP nema efekat.



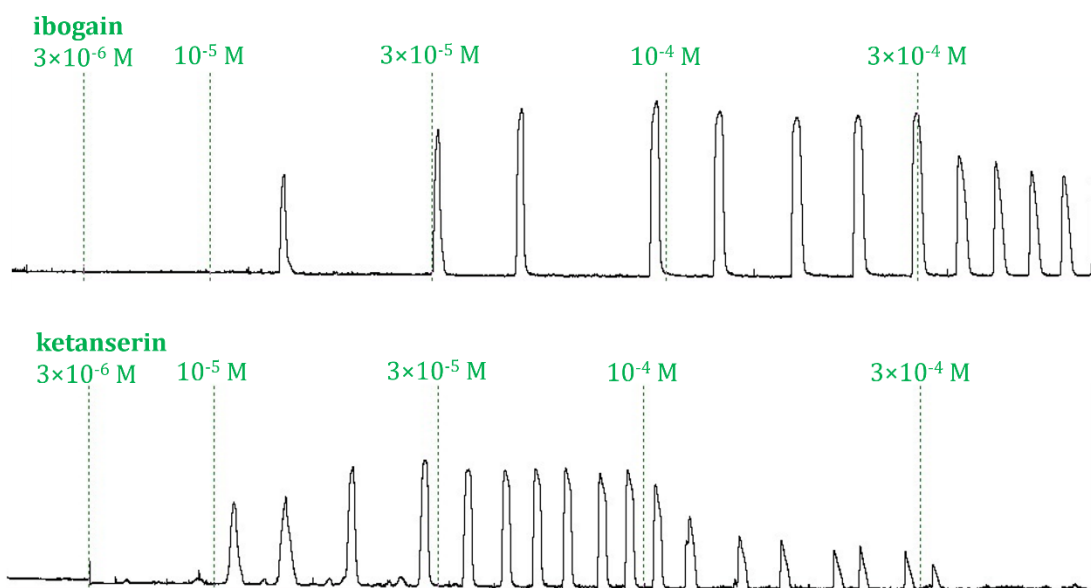
Slika 22. Reprezentativni zapisi efekta ibogaina (90 μM), ATP (90 μM) i ketanserina (15 μM) na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova u De Jalonovom rastvoru sa različitim koncentracijama Ca²⁺ i K⁺.

Ketanserin (15 μM) u svim korišćenim rastvorima, odnosno pri svim koncentracijama Ca²⁺ i K⁺, u kvalitativnom smislu ima iste efekte kao ibogain (uspostavljanje pravilne fazne kontraktilne

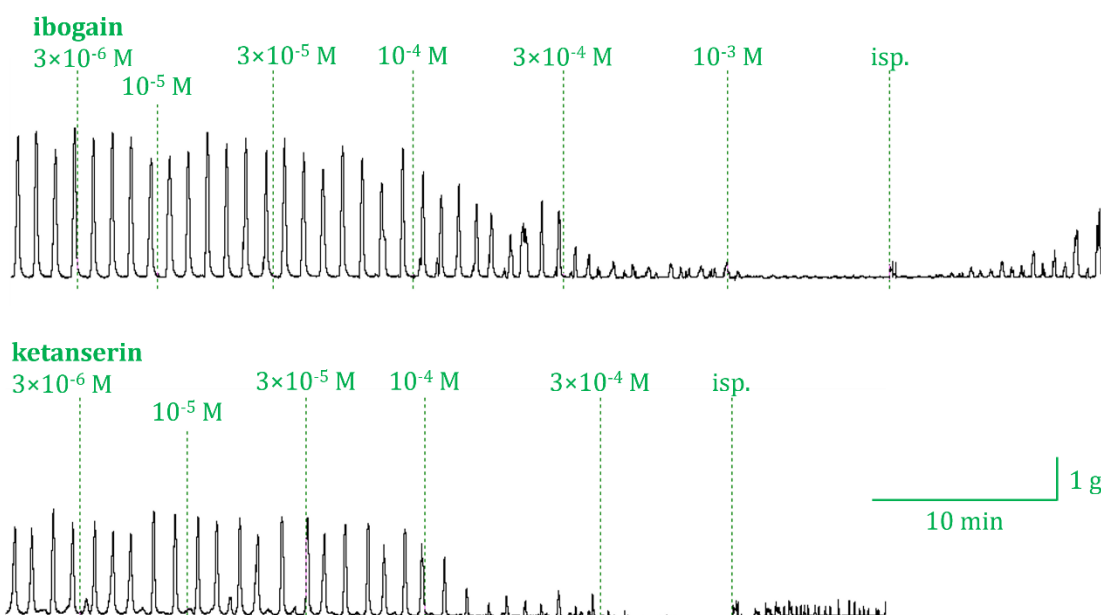
aktivnosti, povećanje širine pika, povećanje frekvencije kalijumskih faznih kontrakcija i delimična inhibicija kalijumske tonične kontrakcije) (Slika 22). U kvantitativnom smislu, ketanserin svoje stimulatorne (Slika 23A) i inhibitorne efekte (Slika 23B) ostvaruje pri nešto nižim koncentracijama od ibogaina (Slika 24; Tabela 22; Tabela 23). Stimulatorni efekti su poređeni u De Jalonovom izotoničnom rastvoru sa 0,4 mM Ca²⁺ a inhibitorni u rastvoru sa 0,95 mM Ca²⁺. Pošto je štok ketanserina pravljen rastvaranjem u DMSO, na isti način je ispitan i efekat odgovarajućih finalnih koncentracija DMSO a takođe i ibogaina u rastvoru sa odgovarajućom koncentracijom DMSO. Sam DMSO nije imao nikakav efekat na kontraktilnu aktivnost. Sigmoidne krive koje opisuju stimulatorne i inhibitorne efekte ibogaina (na amplitudu, frekvenciju i površinu ispod krive) sa i bez DMSO se u velikoj meri poklapaju, odnosno prisustvo DMSO u datim koncentracijama ne utiče bitno na efekte ibogaina. Sigmoidne krive koje opisuju stimulatorne i inhibitorne efekte ketanserina (sva tri parametra) su pomerene u levo u odnosu na ibogainske krive, odnosno polumaksimalne efektivne koncentracije za ketanserin su niže. Pošto se pokazalo da sigmoidni fit nije optimalan način za kvantifikovanje inhibitornih efekata ibogaina i ketanserina ni za jedan od tri ispitivana parametra (amplituda, frekvencija i površina ispod krive), urađena je dvofaktorska analiza varijanse koja je pokazala značajan efekat tretmana (sva tri parametra) zahvaljujući razlikama između efekata ketanserina sa jedne strane i efekata ibogaina (sa i bez DMSO) sa druge strane. Takođe, značajan je bio i efekat koncentracije, kao i interakcije, za sva tri ispitivana parametra.

Iako ibogain i ketanserin imaju izuzetno slične efekte na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova, za razliku od ibogaina, ketanserin ne utiče na aktivnost antioksidativnih enzima u kontraktilno aktivnom izolovanom uterusu. U preparatima izolovanog uterusa koji su se kontrahovali 2 sata u prisustvu ketanserina (29 µM, ekvimolarna koncentracija 10 mg/l ibogain hidrohlorida) nije došlo ni do kakvih značajnih promena u aktivnosti antioksidativnih enzima. Pošto je štok ketanserina pravljen rastvaranjem u DMSO, na isti način je ispitan i efekat odgovarajuće finalne koncentracije DMSO koji takođe nije doveo ni do kakvih značajnih promena (Slika 25; Tabela 24).

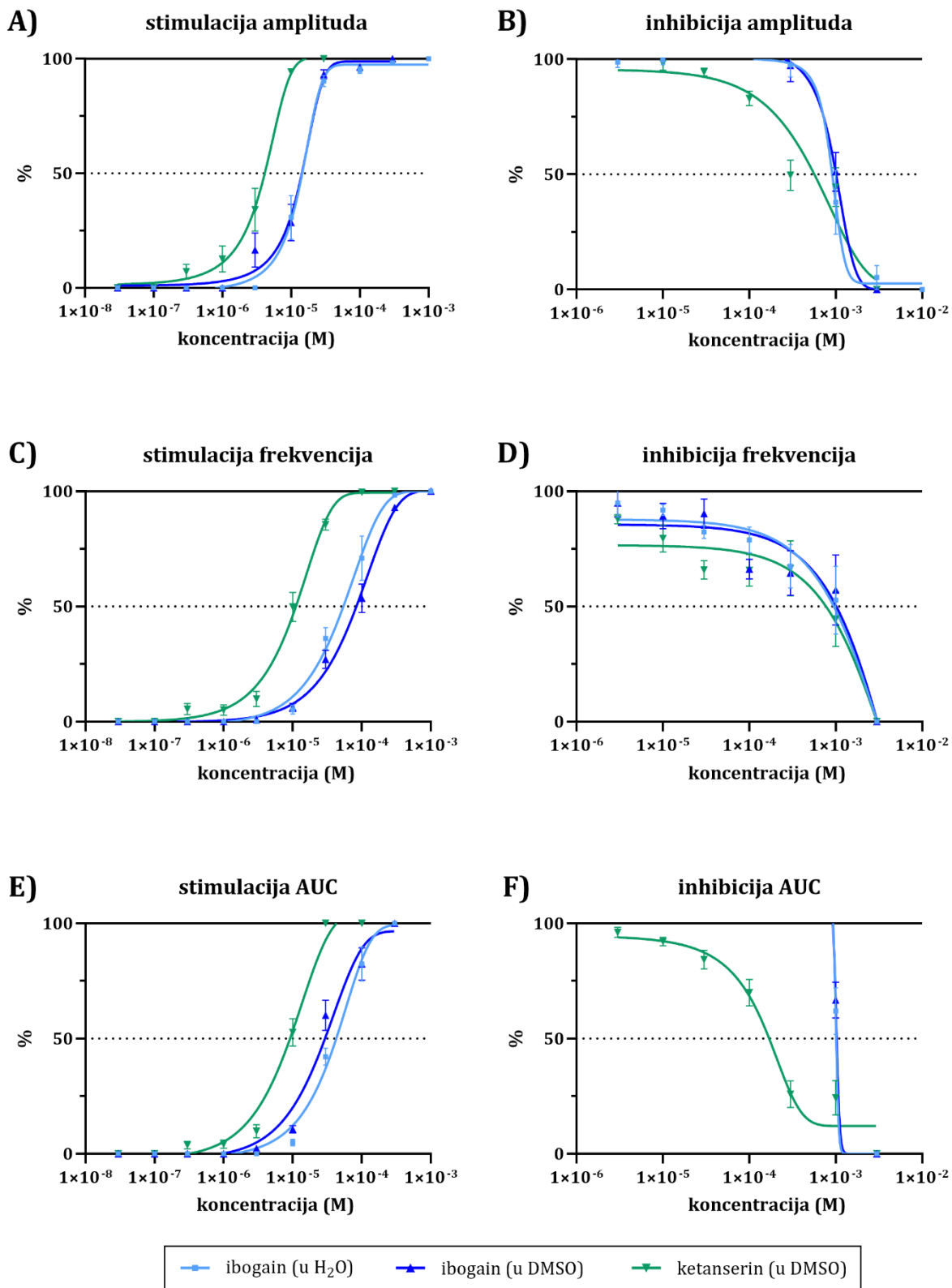
A) 0,4 mM Ca²⁺



B) 0,95 mM Ca²⁺



Slika 23. Reprezentativni zapisi efekta rastućih koncentracija ibogaina i ketanserina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova: **A)** De Jalonov izotonični rastvor sa 0,4 mM Ca²⁺ u kom se preparat ne kontrahuje; **B)** De Jalonov izotonični rastvor sa 0,95 mM Ca²⁺ u kom preparat ima pravilnu faznu kontraktilnu aktivnost; isp. – ispiranje.



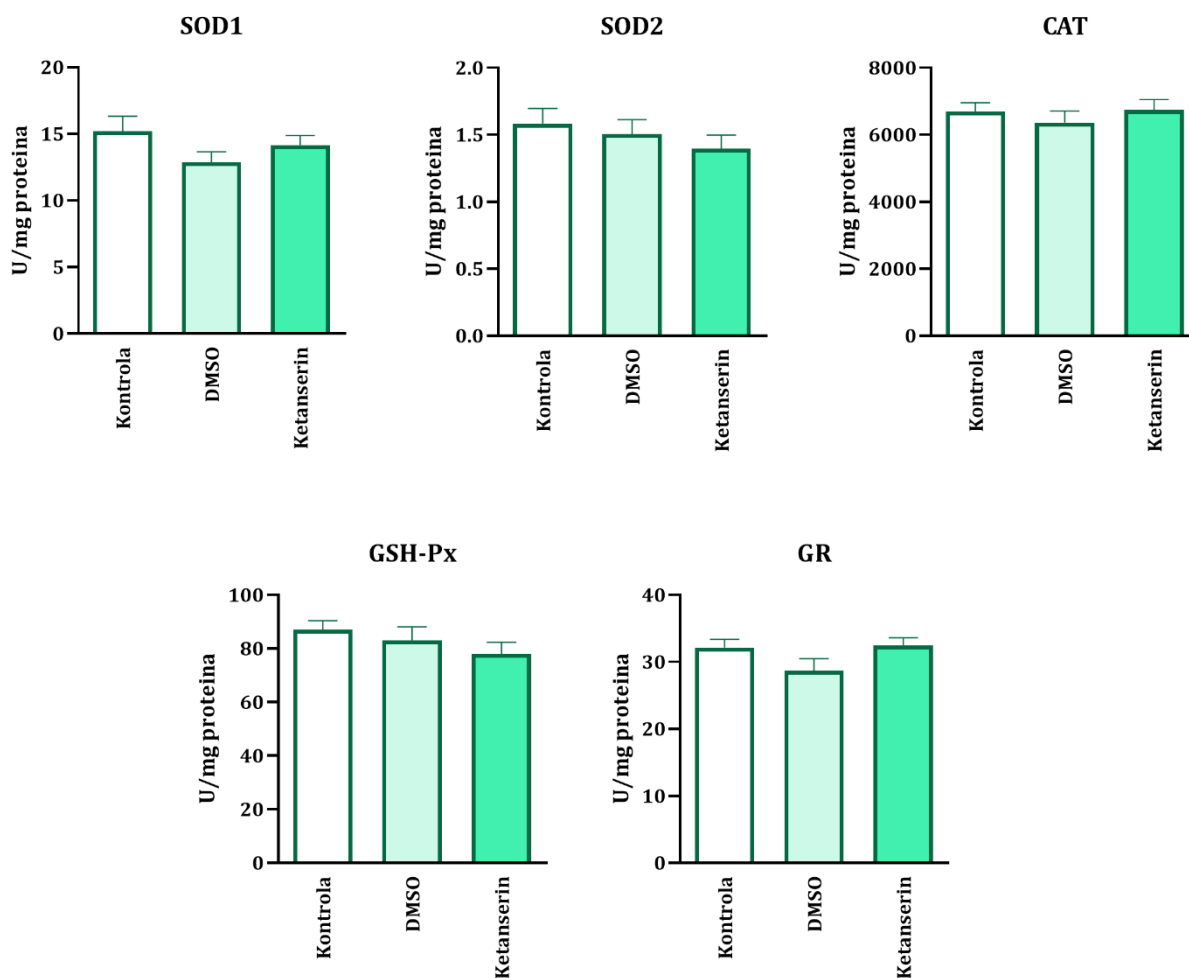
Slika 24. Stimulatorni i inhibitorni efekat ibogaina i ketanserina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova: **A, C i E**) De Jalonov izotonični rastvor sa 0,4 mM Ca²⁺ u kom se preparat ne kontrahuje (n = 5); **B, D i F**) De Jalonov izotonični rastvor sa 0,95 mM Ca²⁺ u kom preparat ima pravilnu faznu kontraktilnu aktivnost (n = 7-10). Štok ketanserina je pravljen rastvaranjem u DMSO pa je ispitan efekat odgovarajuće finalne koncentracije DMSO. Pošto nije bilo efekta, kriva nije prikazana.

Tabela 22. Stimulatorni i inhibitorni efekat ibogaina i ketanserina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova – polumaksimalna efektivna koncentracija: **A)** De Jalonov izotonični rastvor sa 0,4 mM Ca²⁺ u kom se preparat ne kontrahuje; **B)** De Jalonov izotonični rastvor sa 0,95 mM Ca²⁺ u kom preparat ima pravilnu faznu kontraktilnu aktivnost.

A) EC50 - stimulacija			
	Amplituda	Frekvencija	AUC
Ibogain (u H₂O)	1,34 × 10 ⁻⁵ M	4,81 × 10 ⁻⁵ M	3,78 × 10 ⁻⁵ M
Ibogain (u DMSO)	1,34 × 10 ⁻⁵ M	7,47 × 10 ⁻⁵ M	2,61 × 10 ⁻⁵ M
Ketanserin (u DMSO)	3,80 × 10 ⁻⁶ M	1,06 × 10 ⁻⁵ M	9,2 × 10 ⁻⁶ M
B) EC50 - inhibicija (IC50)			
	Amplituda	Frekvencija	AUC
Ibogain (u H₂O)	8,37 × 10 ⁻⁴ M	8,32 × 10 ⁻⁴ M	1,03 × 10 ⁻³ M
Ibogain (u DMSO)	9,86 × 10 ⁻⁴ M	6,61 × 10 ⁻⁴ M	1,06 × 10 ⁻³ M
Ketanserin (u DMSO)	4,16 × 10 ⁻⁴ M	8,62 × 10 ⁻⁴ M	1,78 × 10 ⁻⁴ M

Tabela 23. Inhibitorni efekat ibogaina i ketanserina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova u De Jalonovom izotoničnom rastvoru sa 0,95 mM Ca²⁺ u kom preparat ima pravilnu faznu kontraktilnu aktivnost – analiza varijanse; n = 7-10.

Dvofaktorska analiza varijanse - inhibicija			
	Amplituda	Frekvencija	AUC
Faktor: tretman	F = 31,23 p < 0,001	F = 19,89 p < 0,001	F = 31,4 p < 0,001
Faktor: koncentracija	F = 89,9 p < 0,001	F = 51,15 p < 0,001	F = 173,1 p < 0,001
Interakcija	F = 12,55 p < 0,001	F = 7,53 p < 0,001	F = 11,8 p < 0,001



Slika 25. Aktivnost antioksidativnih enzima u kontraktilno aktivnom izolovanom uterusu pacova u prisustvu ketanserina (29 μ M). Štok ketanserina je pravljen rastvaranjem u DMSO pa je ispitan efekat odgovarajuće finalne koncentracije DMSO.

Tabela 24. Aktivnost antioksidativnih enzima u kontraktilno aktivnom izolovanom uterusu pacova u prisustvu ketanserina (29 μ M) – analiza varijanse; n = 8.

Jednofaktorska analiza varijanse				
SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR
n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.

n.z. – nije značajno.

4.3.3. Uloga β -adrenergičkih receptora i K_{ATP} kanala u efektima ibogaina na kontraktilnu aktivnost uterusa

Pokazano je (Odeljak 4.3.1. Slika 21B) kako rastuće koncentracije ibogaina (1-60 mg/l, kumulativno do 153 mg/l) utiču na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova. Pretretmani propranololom (5 mg/l) i glibenklamidom (1 mg/l) nisu narušili dvojni efekat ibogaina u Krebs Henseleitovom rastvoru, odnosno stimulaciju pri nižim koncentracijama i inhibiciju pri višim (Slika 26). Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala značajan efekat koncentracije ibogaina na amplitudu, frekvenciju i površinu ispod krive (Tabela 25). Nakon dodavanje 40 mg/l, amplituda i površine ispod krive su bile značajno manje u odnosu na kontrolu, a nakon 60 mg/l (kumulativno 153 mg/l) kontraktilna aktivnost je prestala. Pretretmani nisu značajno uticali na amplitudu i frekvenciju, ali su imali značajan efekat na površinu ispod krive gde je pretretman propranololom doveo do značajnog povećanja u odnosu na ibogain. Pošto je štok glibenklamida pravljen rastvaranjem u DMSO, ispitani su i efekti ibogaina u prisustvu odgovarajuće finalne koncentracije DMSO i pokazano je da DMSO nije imao značajan efekat.

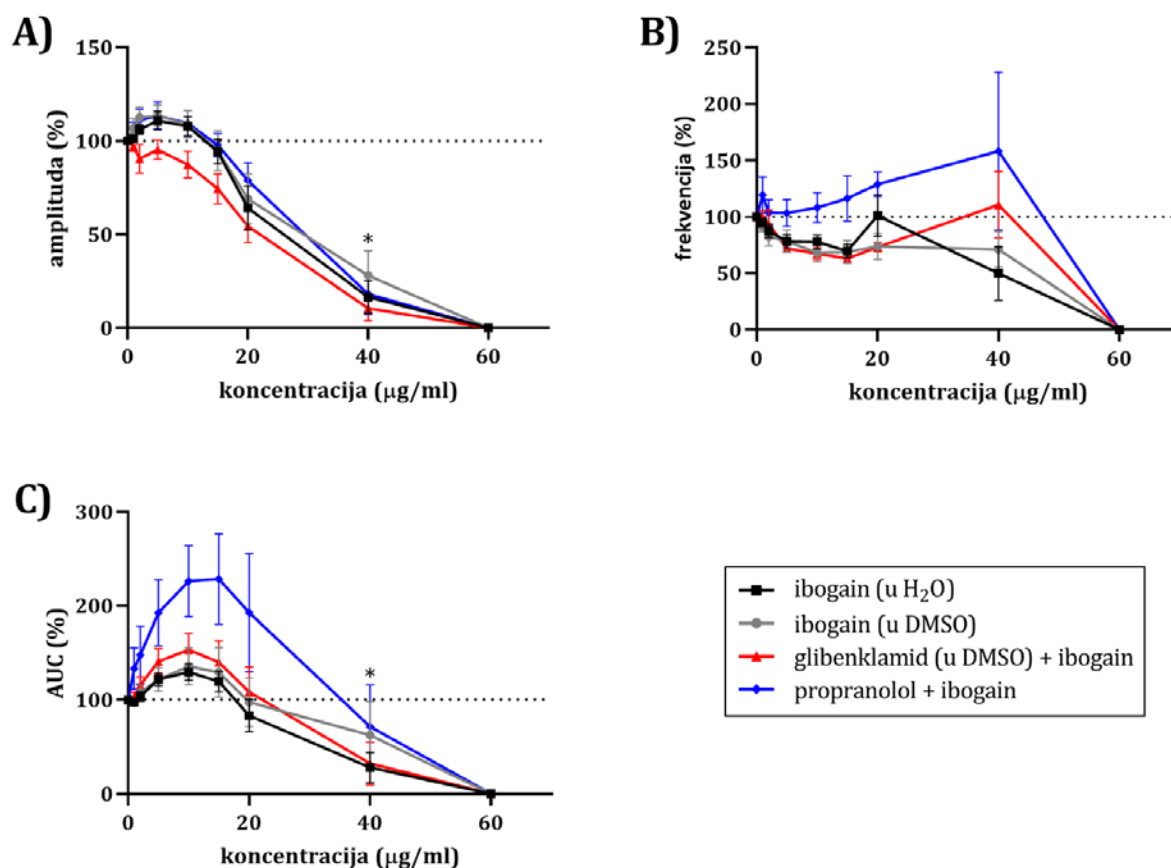
Prethodno je pokazano (4.3.1.) i da ibogain u koncentraciji od 10 mg/l stimuliše kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova. Ipak, stimulatorni efekat ove koncentracije ibogaina u velikoj meri zavisi od koncentracije Ca^{2+} u izotoničnom rastvoru. Pri visokoj koncentraciji Ca^{2+} (0,66 g/l) kada je kontraktilna aktivnost veoma visoka (velika amplituda i frekvencija) stimulatorni efekat izostaje. Takođe, dugoročni efekti (tokom 4 sata nakon dodavanja) primenjene koncentracije ibogaina imaju određenu vremensku dinamiku koja se razlikuje u zavisnosti od koncentracije Ca^{2+} (Slika 27; Slika 28A,B; Tabela 26A,B).

U De Jalonovom rastvoru sa niskom koncentracijom Ca^{2+} (0,06 g/l) dodavanje ibogaina je dovelo do brzog porasta amplitude kontrakcija. Amplitude su bile značajno veće od kontrolnog nivoa tokom prvog i drugog sata nakon dodavanja ibogaina ($p < 0,01$). Tokom naredna dva sata (do četvrtog) amplituda se nije značajno razlikovala od kontrolnog nivoa (Slika 28A; Tabela 26A). Takođe, došlo je i do porasta frekvencije koja je tokom drugog ($p < 0,01$) i do četvrtog sata ($p < 0,05$) bila značajno veća u odnosu na kontrolni nivo (Slika 28B; Tabela 26B). U De Jalonovom rastvoru sa visokom koncentracijom Ca^{2+} (0,66 g/l) ibogain nije izazvao promenu amplitude neposredno nakon dodavanja ali je došlo do značajnog pada amplitude tokom druga dva sata ($p < 0,01$). Takođe, nije došlo ni do porasta amplitude, koja je pri ovolikoj koncentraciji Ca^{2+} veoma visoka, već do njenog postepenog pada, tako da je tokom drugog sata ($p < 0,05$) kao i tokom naredna dva sata ($p < 0,01$) bila značajno manja od kontrolnog nivoa.

U De Jalonovom rastvoru sa niskom koncentracijom Ca^{2+} pretretmani glibenklamidom i propranololom su značajno uticali na efekte ibogaina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa (Slika 28C,D; Tabela 26C,D). Pretretman propranololom je sprečio porast amplitude nakon dodavanja ibogaina. Amplituda se tokom prva dva sata zadržala na početnom nivou a tokom poslednja dva sata je bila niža od 50% početnog nivoa i značajno se razlikovala u poređenju sa grupom koja je tretirana samo ibogainom ($p < 0,001$). Oba pretretmana su sprečila porast frekvencije nakon dodavanja ibogaina. Frekvencija je u oba slučaja tokom drugog sata ($p < 0,001$) i tokom poslednja dva sata ($p < 0,001$) bila značajno niža u poređenju sa grupom koja je tretirana samo ibogainom.

U De Jalonovom rastvoru sa visokom koncentracijom Ca^{2+} samo je propranolol uticao na promene kontraktilne aktivnosti nakon dodavanja ibogaina (Slika 28E,F; Tabela 26E,F). Pretretman propranololom je sprečio pad amplitude tokom poslednja dva sata ($p < 0,001$) dok glibenklamid nije imao nikakav efekat. Ni jedan od pretretmana nije značajno uticao na promenu

frekvencije pa je tokom eksperimenta došlo do značajnog pada kao i u grupi koja je tretirana samo ibogainom.

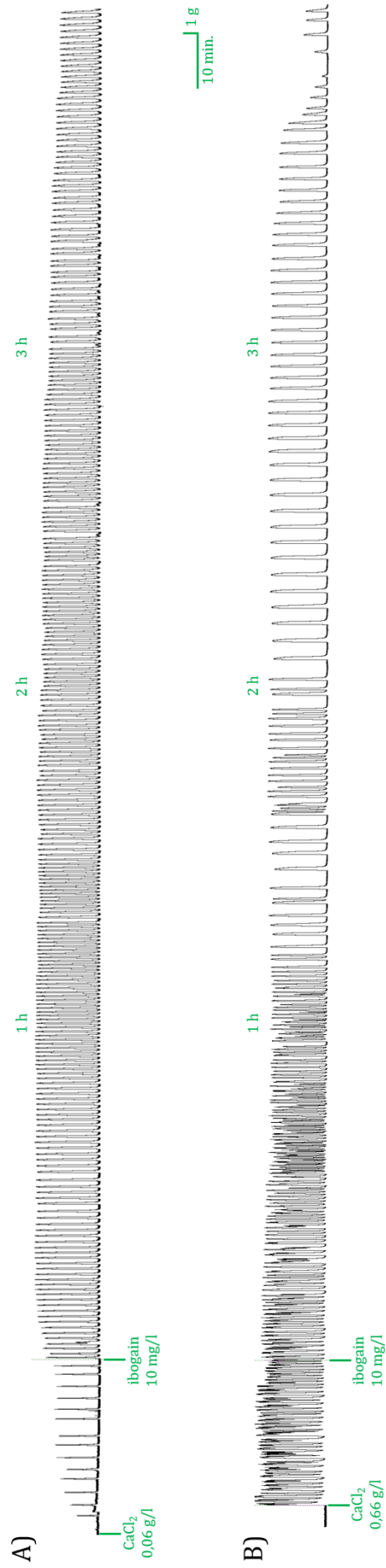


Slika 26. Efekat ibogaina (1, 2, 5, 10, 15, 20, 40 i 60 mg/l, kumulativno 153 mg/l) sa ili bez pretretmana propranololom (5 mg/l) ili glibenklamidom (1 mg/l) na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusu: **A)** amplituda kontrakcija uterusu; **B)** frekvencija kontrakcija uterusu; **C)** površina ispod krive (AUC). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna greška aritmetičke sredine. Takijev HSD test: * p < 0,05; n = 7.

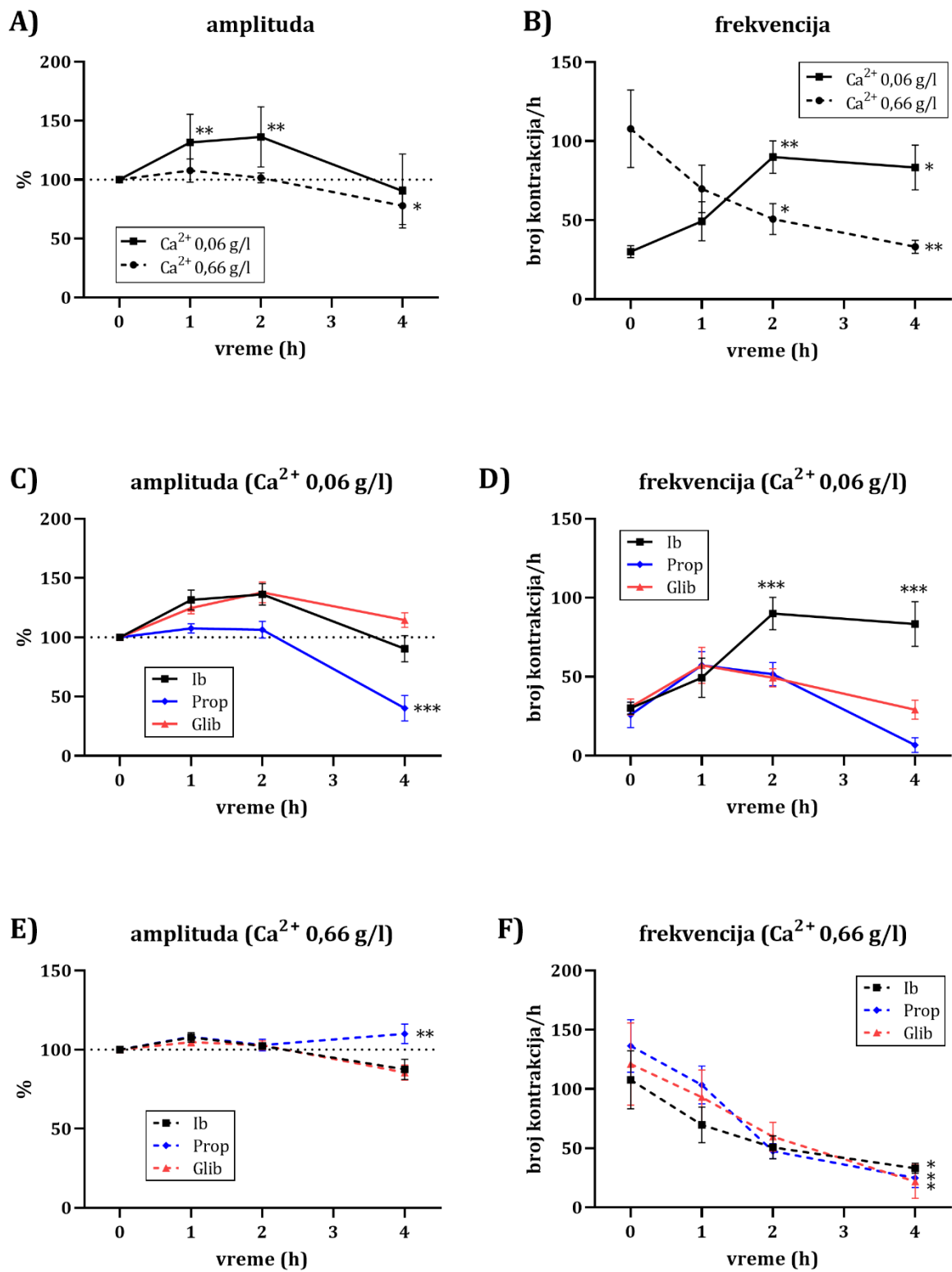
Tabela 25. Efekat ibogaina (1, 2, 5, 10, 15, 20, 40 i 60 mg/l, kumulativno 153 mg/l) sa ili bez pretretmana propranololom (5 mg/l) ili glibenklamidom (1 mg/l) na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusu – analiza varijanse (n = 7): **A)** amplituda kontrakcija uterusu; **B)** frekvencija kontrakcija uterusu; **C)** površina ispod krive (AUC).

Dvofaktorska analiza varijanse			
	A) Amplituda	B) Frekvencija	C) AUC
Faktor: tretman	n.z.	n.z.	F = 4,72 p < 0,01
Faktor: koncentracija	F = 51,93 p < 0,001	F = 5,04 p < 0,001	F = 27,56 p < 0,001
Interakcija	n.z.	n.z.	n.z.

n.z. – nije značajno.



Slika 27. Efekat ibogaina (10 mg/l) na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova 4 sata nakon dodavanja – reprezentativni zapisi: **A)** De Jalonov rastvor sa 0,06 g/l u kom preparat ima kontraktilnu aktivnost niskog intenziteta; **B)** De Jalonov rastvor sa 0,66 g/l u kom preparat ima kontraktilnu aktivnost visokog intenziteta.



Slika 28. Efekat ibogaina (10 mg/l) sa ili bez pretretmana propranololom (5 mg/l) ili glibenklamidom (1 mg/l) na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova tokom 4 sata, u De Jalonovom izotoničnom rastvoru sa niskom ili visokom koncentracijom Ca²⁺: **A)** amplituda kontrakcija uterusa; **B)** frekvencija kontrakcija uterusa; **C)** amplituda, 0,06 g/l Ca²⁺ sa ili bez pretretmana; **D)** frekvencija 0,06 g/l Ca²⁺ sa ili bez pretretmana; **E)** amplituda 0,66 g/l Ca²⁺ sa ili bez pretretmana; **F)** frekvencija 0,66 g/l Ca²⁺. Takijev HSD test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n = 7.

Tabela 26. Efekat ibogaina (10 mg/l) sa ili bez pretretmana propranololom (5 mg/l) ili glibenklamidom (1 mg/l) na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova tokom 4 sata, u De Jalonovom izotoničnom rastvoru sa niskom ili visokom koncentracijom Ca^{2+} – analiza varijanse (n = 7): **A)** amplituda kontrakcija uterusa; **B)** frekvencija kontrakcija uterusa; **C)** amplituda, 0,06 g/l Ca^{2+} sa ili bez pretretmana; **D)** frekvencija 0,06 g/l Ca^{2+} sa ili bez pretretmana; **E)** amplituda 0,66 g/l Ca^{2+} sa ili bez pretretmana; **F)** frekvencija 0,66 g/l Ca^{2+} .

Dvofaktorska analiza varijanse				
	A)	Amplituda	B)	Frekvencija
Faktor: koncentracija Ca^{2+}		F = 5,99 p < 0,05		n.z.
Faktor: vreme		F = 13,69 p < 0,001		n.z.
Interakcija		F = 4,59 p < 0,01		F = 13,50 p < 0,001
	C)	Amplituda	D)	Frekvencija
Faktor: tretman		F = 23,00 p < 0,001		F = 13,10 p < 0,001
Faktor: vreme		F = 24,30 p < 0,001		F = 10,30 p < 0,001
Interakcija		F = 7,25 p < 0,001		F = 6,40 p < 0,001
	E)	Amplituda	F)	Frekvencija
Faktor: tretman		F = 4,44 p < 0,01		n.z.
Faktor: vreme		F = 7,95 p < 0,001		F = 23,00 p < 0,001
Interakcija		F = 3,03 p < 0,05		n.z.

n.z. – nije značajno.

4.3.4. Uloga β -adrenergičkih receptora i K_{ATP} kanala u efektima ibogaina na aktivnost antioksidativnih enzima

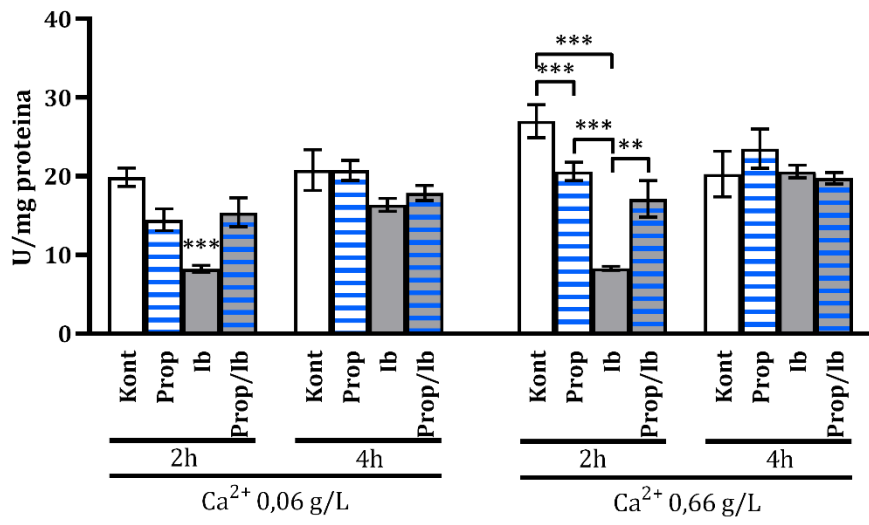
Ibogain u koncentraciji od 10 mg/l doveo je do promena u aktivnosti antioksidativnih enzima u kontraktilno aktivnim izolovanim uterusima pacova (Slika 29; Slika 30; Tabela 27). Najizraženija promena je veliko povećanje aktivnosti CAT u obe vremenske tačke (2 i 4 sata nakon dodavanja ibogaina u izotonični rastvor) i pri obe koncentracije Ca^{2+} . Pretretmani beta blokatorom propranololom i inhibitorom K_{ATP} kanala glibenklamidom su sprečili ibogain da dovede do bilo koje značajne promena u aktivnosti antioksidativnih enzima.

U De Jalonovom rastvoru sa niskom koncentracijom Ca^{2+} aktivnost CAT je bila višestruko povećana a aktivnost SOD1 smanjena 2 sata nakon dodavanje ibogaina. Nakon 4 sata aktivnost CAT je i dalje bila višestruko povećana, a povećana je bila i aktivnost GSH-Px. Aktivnost GR je bila smanjena, dok se aktivnost SOD1 više nije značajno razlikovala od kontrolne grupe. Ibogain nije doveo do značajnih promena u aktivnostima SOD2. U De Jalonovom rastvoru sa visokom koncentracijom Ca^{2+} ibogain je takođe izazvao višestruko povećanje aktivnosti CAT nakon 2 sata. Za razliku od niske koncentracije Ca^{2+} ovde je ibogain značajno smanjio aktivnost obe SOD. Nakon 4 sata aktivnost CAT je i dalje bila povećana, a povećana je bila i aktivnost GSH-Px. Aktivnost SOD1 se vratila na početni nivo ali je aktivnost SOD2 i dalje bila značajno niža od kontrole. Aktivnost GR, iako naizgled smanjena, nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolu.

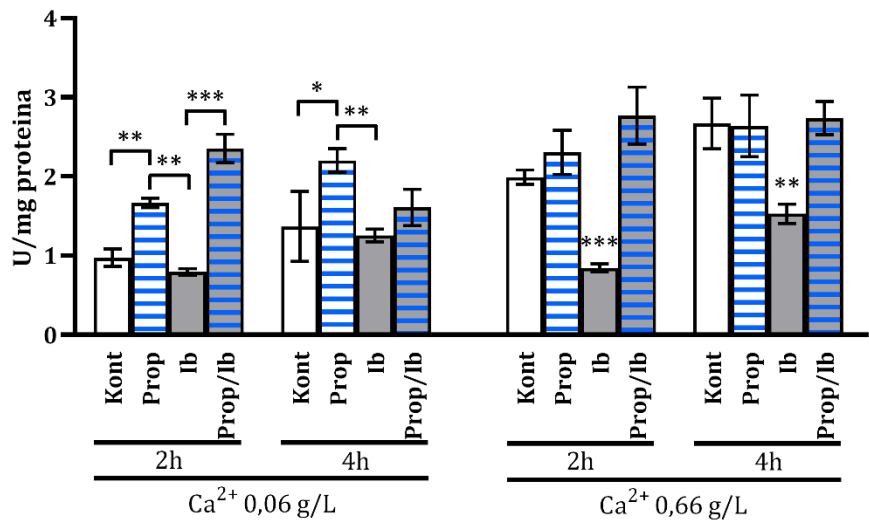
Pretretman propranololom je sprečio sve promene u aktivnostima antioksidativnih enzima do kojih je doveo ibogain (Slika 29; Tabela 27A). Osim toga, sam propranolol je uticao na aktivnost antioksidativnih enzima, odnosno izazvao je povećanje aktivnosti SOD2 nakon 2 i 4 sata pri niskoj koncentraciji Ca^{2+} . U uterusima koji su tretirani ibogainom, pretretman propranololom je doveo do značajnog povećanja aktivnosti SOD2 nakon 2 sata pri niskoj koncentraciji Ca^{2+} , kao i do povećanja aktivnosti GR nakon 4 sata pri obe koncentracije Ca^{2+} .

Pretretman glibenklamidom je takođe sprečio sve promene u aktivnostima antioksidativnih enzima do kojih je doveo ibogain (Slika 30; Tabela 27B). Slično propranololu, glibenklamid je pri niskoj koncentraciji Ca^{2+} doveo do povećanja aktivnosti SOD2 nakon 2 sata, ali 4 sata nakon tretmana aktivnost se vratila na početni nivo. Pri visokoj koncentraciji Ca^{2+} glibenklamid je smanjio aktivnost SOD1 nakon 2 sata i SOD2 nakon 4 sata. U uterusima koji su tretirani ibogainom, pretretman glibenklamidom je doveo do značajnog povećanja aktivnosti GR nakon 4 sata pri visokoj koncentraciji Ca^{2+} .

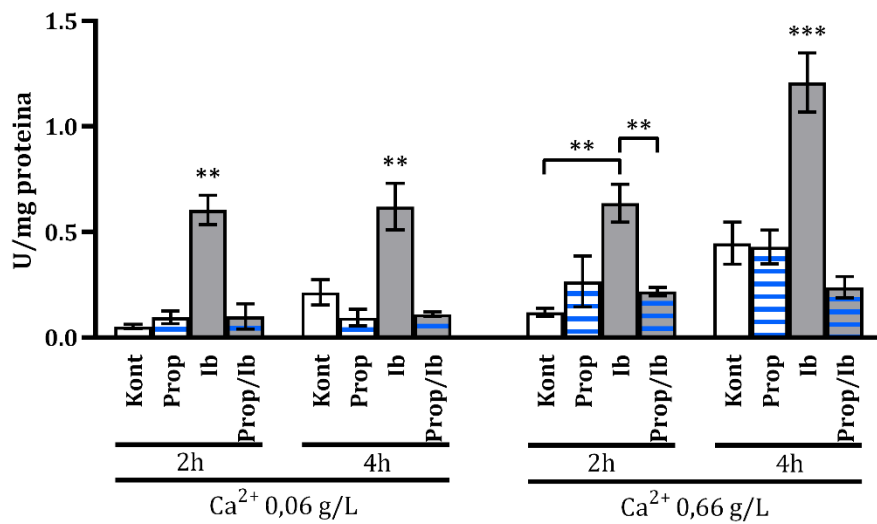
SOD1

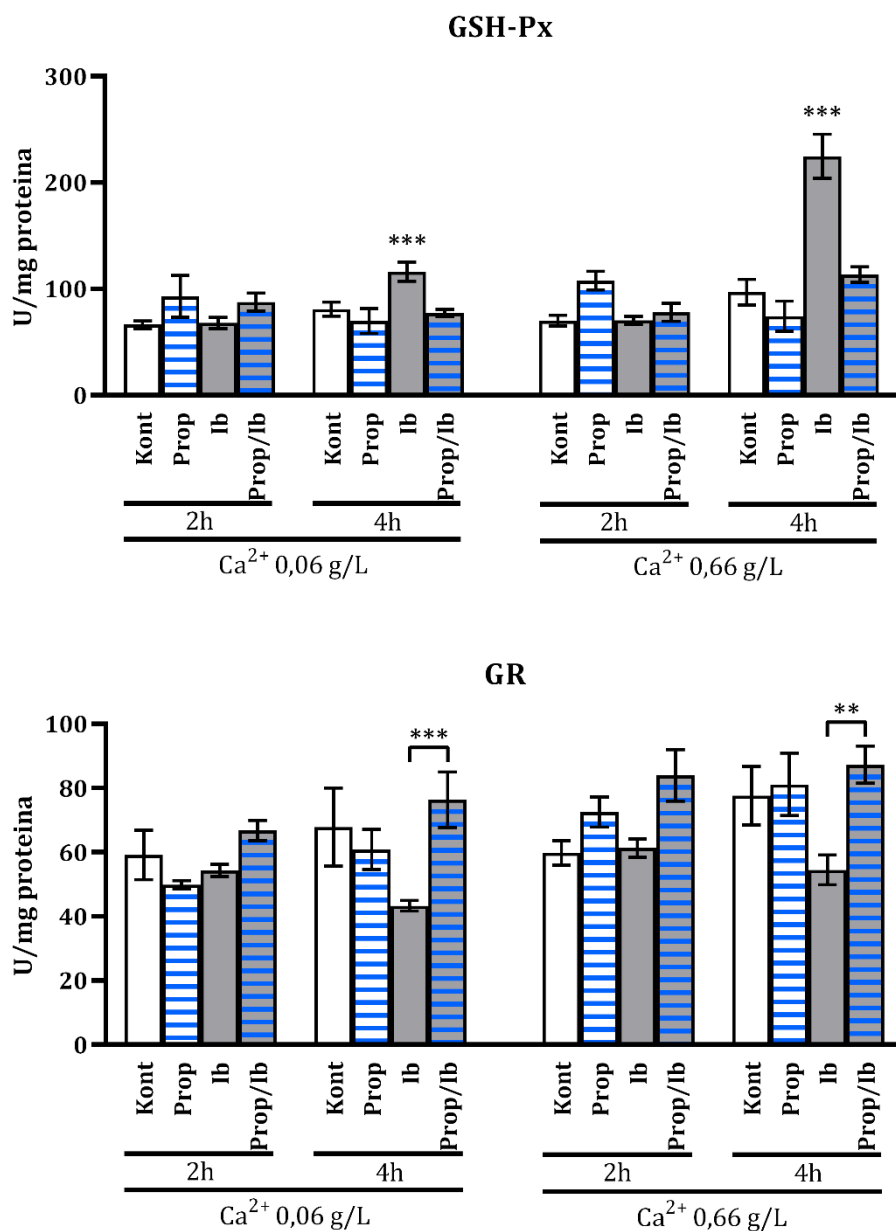


SOD 2



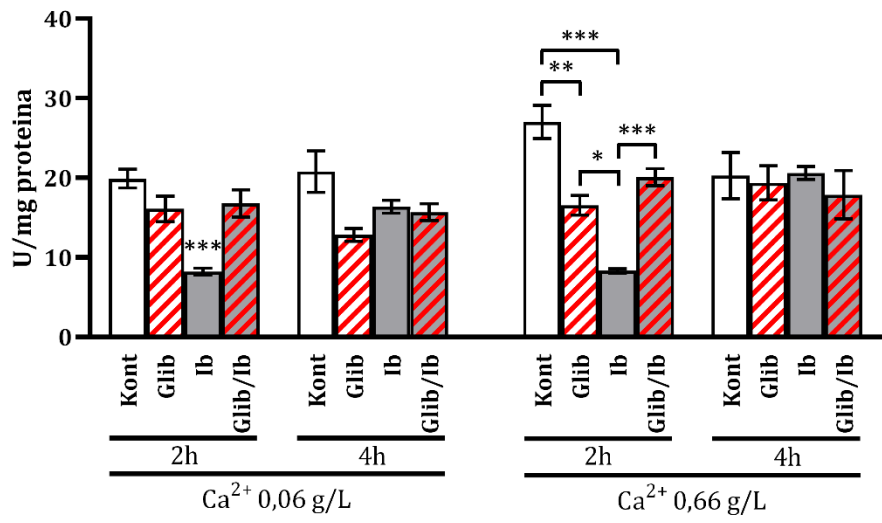
CAT



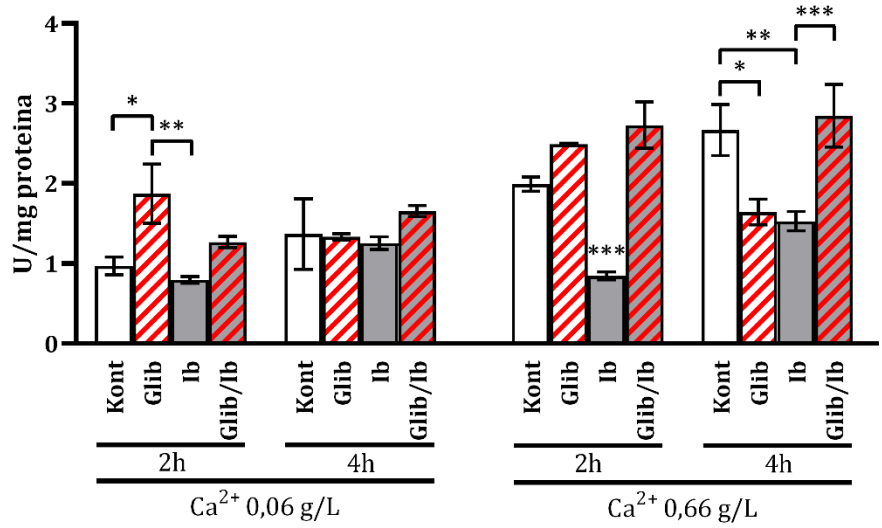


Slika 29. Aktivnost antioksidativnih enzima u uterusima koji se kontrahuju u De Jalonovom rastvoru sa niskom (0,06 g/l) ili visokom koncentracijom Ca²⁺ (0,66 g/l) u prisustvu ibogaina (10 mg/l) sa ili bez pretrretmana propranololom (5 mg/l). Takijev HSD test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n = 7.

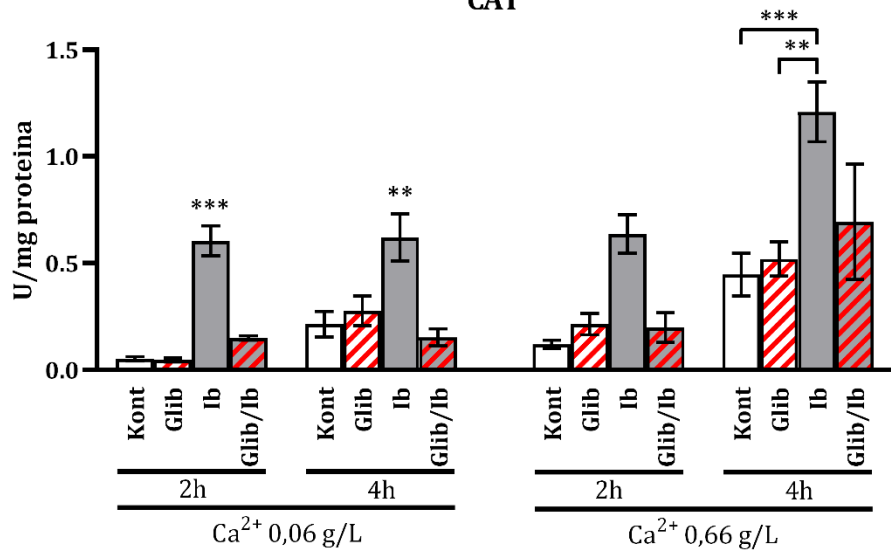
SOD1

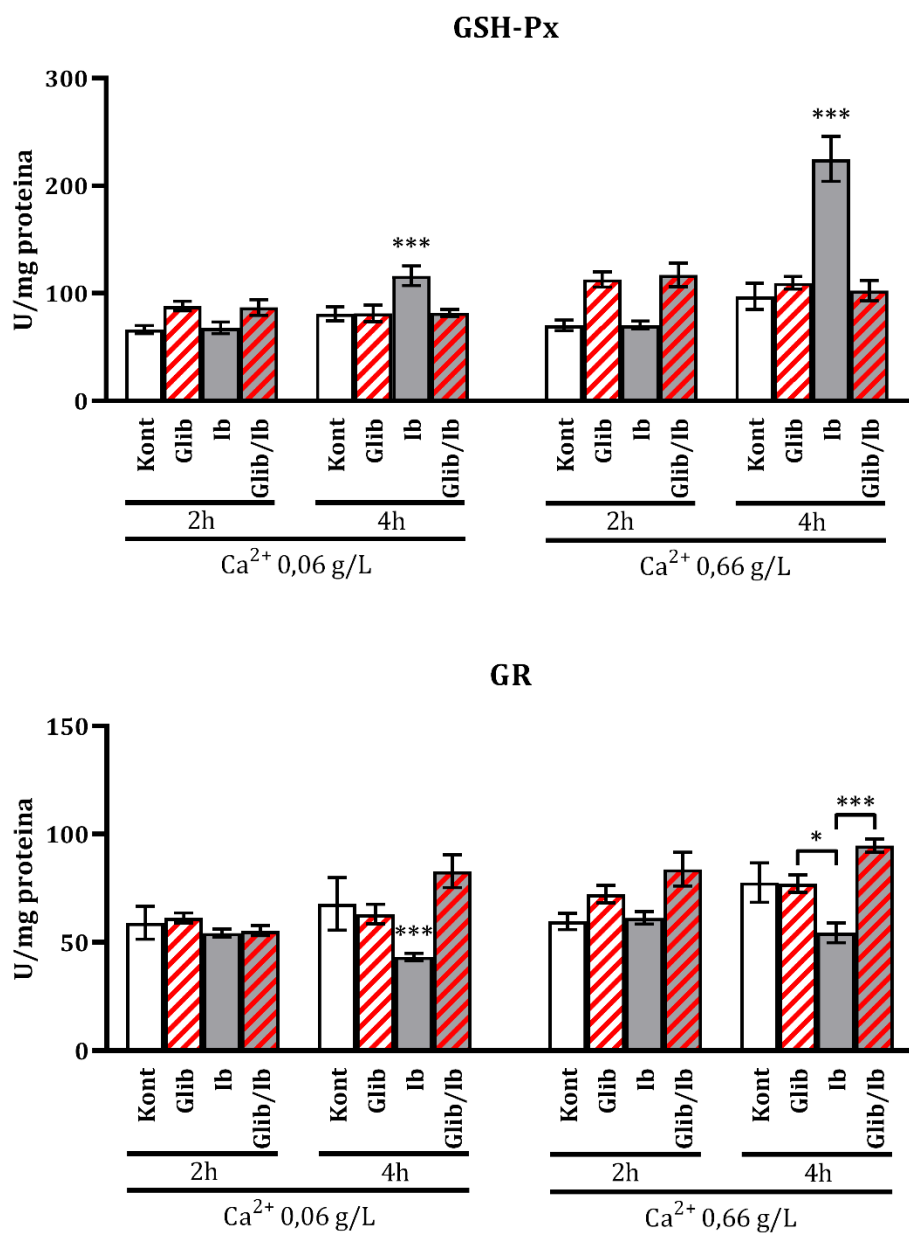


SOD2



CAT





Slika 30. Aktivnost antioksidativnih enzima u uterusima koji se kontrahuju u De Jalonovom rastvoru sa niskom (0,06 g/l) ili visokom koncentracijom Ca²⁺ (0,66 g/l) u prisustvu ibogaina (10 mg/l) sa ili bez pretretmana glibenklamidom (1 mg/l). Takijev HSD test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n = 7.

Tabela 27. Aktivnost antioksidativnih enzima u uterusima koji se kontrahuju u De Jalonovom rastvoru sa niskom (0,06 g/l) ili visokom koncentracijom Ca²⁺ (0,66 g/l) u prisustvu ibogaina (10 mg/l) sa ili bez pretretmana **A)** propranololom (5 mg/l) i **B)** glibenklamidom (1 mg/l) – analiza varijanse; n = 7.

A) Dvofaktorska analiza varijanse - propranolol										
	Ca ²⁺ 0,06 g/l					Ca ²⁺ 0,66 g/l				
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR
Faktor: tretman	F = 19,2 p < 0,001	F = 19,8 p < 0,001	F = 25,2 p < 0,001	n.z.	F = 8,3 p < 0,001	F = 16,5 p < 0,001	F = 12,9 p < 0,001	F = 18,3 p < 0,001	F = 12,5 p < 0,001	F = 10,8 p < 0,001
Faktor: vreme	F = 26,9 p < 0,001	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	F = 13,0 p < 0,001	n.z.
Interakcija	F = 4,63 p < 0,01	F = 6,76 p < 0,001	n.z.	F = 7,79 p < 0,001	F = 2,84 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	F = 22,0 p < 0,001	n.z.

B) Dvofaktorska analiza varijanse - glibenklamid										
	Ca ²⁺ 0,06 g/l					Ca ²⁺ 0,66 g/l				
	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR	SOD1	SOD2	CAT	GSH-Px	GR
Faktor: tretman	F = 17,7 p < 0,001	F = 5,22 p < 0,01	F = 19,6 p < 0,001	n.z.	F = 8,6 p < 0,001	F = 12,5 p < 0,001	F = 28,7 p < 0,001	F = 14,0 p < 0,001	F = 9,82 p < 0,001	F = 17,2 p < 0,001
Faktor: vreme	n.z.	n.z.	n.z.	F = 6,5 p < 0,05	n.z.	n.z.	n.z.	F = 22,8 p < 0,001	F = 18,9 p < 0,001	n.z.
Interakcija	F = 10,7 p < 0,001	F = 3,7 p < 0,05	n.z.	F = 8,66 p < 0,001	F = 6,29 p < 0,001	F = 15,3 p < 0,001	F = 6,8 p < 0,001	n.z.	F = 23,3 p < 0,001	F = 2,84 p < 0,05

n.z. – nije značajno.

5. DISKUSIJA

Ibogain je pluripotentan molekul koji svoje delovanje *in vivo* ostvaruje u dva pravca: metaboličkom, izazivajući pražnjenje rezervi ATP i posledično povećanje intenziteta energetskog metabolizma praćeno povećanjem proizvodnje ROS i narušavanjem redoks homeostaze; i farmakološkom, delovanjem na više tipova receptora, koji je zapravo i bio predmet prvih izučavanja ibogaina kao antiadiktivnog i halucinogenog agensa. Cilj disertacije je stoga bio da se utvrdi razlika između udela ova dva mehanizma i da se istraže efekti ibogaina na fiziološku homeostazu. Osim toga, literaturni podaci o predkliničkim ispitivanjima ibogaina na jedinkama ženskog pola su oskudni, a dostupni podaci o studijama slučaja i kliničkim ispitivanjima takođe se odnose mahom na muškarce. Iako su zavisnici, kao i korisnici ibogaina, pretežno muškog pola, utvrđeno postojanje polnih razlika u biološkoj raspoloživosti ibogaina i činjenica da su žene sklonije neželjenim reakcijama na farmakološka sredstva bili su jasan razlog da ovo istraživanje bude izvedeno na ženama.

U ovoj doktorskoj disertaciji je potvrđeno da su ibogain i njegov primarni metabolit noribogain u većoj koncentraciji prisutni u sistemskoj cirkulaciji ženki, odnosno da je biološka raspoloživost ibogaina kod ženki 2-3 puta veća nego kod mužjaka (Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Prilog 1). Odgovor antioksidativnog sistema zaštite na ibogain je izrazito tkivno specifičan. To je posledica distribucije ibogaina po tkivima koju odlikuju velike razlike u koncentracijama, ali i posledica metaboličkih osobenosti datih tkiva (Hough i sar. 1996; Kontrimaviciute i sar. 2006; Kubiliene i sar. 2017). Slika o odgovoru antioksidativnog sistema zaštite se dodatno usložnjava kada se u obzir uzmu različite doze i vremenski intervali. Histopatološkom analizom je pokazano da je hepatotoksičnost, kao i renalna toksičnost ibogaina relativno blaga, ali i da je kardiotoksičnost mnogo ozbiljnija. Srčane aritmije i iznenadni srčani zastoj su najozbiljnije neželjene reakcije na ibogain (Hoelen i sar. 2009; Pleskovic i sar. 2012; Paling i sar. 2012; Meisner i sar. 2016; Litjens i Brunt 2016; Koenig i Hilber 2015), zbog čega se preporučuje praćenje rada srca u dužem vremenskom periodu nakon primene ibogaina. Ranija istraživanja su uglavnom bila usmerena na ulogu kalijumovih kanala (Litjens i Brunt 2016) i adrenergički sistem (Maas i Strubelt 2006), dok ovo istraživanje ukazuje na kardiotoksičnu nekrozu kao mogući mehanizam neželjenog dejstva ibogaina na srce koji može da dovede do srčanog zastoja. Pokazano je i da ibogain utiče na tonus izolovanih arterija, što bi mogao da bude još jedan od pravaca budućih istraživanja. Ovaj rad otvara i pitanje vremena tretmana kod ženki/žena i uticaja reproduktivnog ciklusa na metaboličko/farmakološko dejstvo ibogaina i ukazuje na značaj fiziološkog i hormonskog statusa u trenutku terapije. *Ex vivo* eksperimenti u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da farmakološki efekti ibogaina mogu biti samo delimično posredovani ATP i promenama u redoks ravnoteži, a dominantno su vezani za direktnu interakciju sa receptorima, naročito serotoninским. Antagonist 5-HT₂ receptora, ketanserin pokazuje veliku sličnost sa ibogainom u delovanju na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusu pacova, i ukazuje na glavni mehanizam njegovog delovanja. Sa druge strane, ibogain za razliku od ketanserina može da naruši redoks ravnotežu što je praćeno promenama aktivnosti sistema antioksidativne zaštite. U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazana i uloga β-adrenergičkih receptora i K_{ATP} kanala u regulaciji aktivnosti antioksidativnih enzima. Naime, ibogain pod određenim uslovima dovodi do višestrukog porasta aktivnosti CAT i u manjoj meri GSH-Px, dok blokada β-adrenergičkih receptora i K_{ATP} kanala sprečava ovakav efekat ibogaina.

Koncentracije ibogaina i noribogaina u krvnoj plazmi izmerene u ovom eksperimentu su u skladu sa merenjima dobijenim u drugim istraživanjima. Kod sisara, nakon oralnog tretmana, ibogain se konvertuje u svoj takođe aktivni primarni metabolit noribogain (12-hidroksiibogamin) u procesu koji se odlikuje kompleksnom tkivno specifičnom farmakokinetikom (Mash i sar. 2000).

Zbog svoje lipofilne prirode ibogain se akumulira u masnom tkivu i mozgu i polako oslobađa u krv. U krvi ibogain biva brzo zamenjen noribogainom koji se eliminiše sporije od ibogaina (Mash i sar. 2000; Alper 2001). Raniji radovi pokazuju da nema značajnije razlike u farmakokinetici između mužjaka i ženki (Jeffcoat i sar. 1994). Pik koncentracije, površine ispod krive odnosa koncentracije i vremena, odnosno biološka raspoloživost nakon oralne primene su veće kod ženki u poređenju sa mužjacima (Jeffcoat i sar. 1994; Pearl i sar. 1997; Upton 1995 u revijskom radu Alper 2001), kod pacova dva do tri puta (Jeffcoat i sar. 1994), ali je apsorpcija oralne suspenzije kod pacova generalno promenjiva i nekompletna (Upton 1995 u revijskom radu Alper 2001). U ovom eksperimentu, proporcije ženki kod kojih su ibogain i noribogain detektovani u svakoj eksperimentalnoj grupi su vrlo slične u odnosu na mužjake (Vidonja Uzelac i sar. 2019a), što ukazuje na sličnu farmakokinetiku. S druge strane, koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi su bile 2-3 puta veće kod ženki u poređenju sa mužjacima (Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Prilog 1) što potvrđuje polne razlike u biološkoj raspoloživosti oralno unetog ibogaina. Dalje, koncentracije noribogaina su bile nekoliko puta veće nego koncentracije ibogaina u obe vremenske tačke, 6 i 24 sata nakon ingestije. Ranija istraživanja su pokazala da ibogain svoje farmakološke i fiziološke efekte ostvaruje relativno brzo (Paškulin i sar. 2010; Nikolić Kokić i sar. 2015a), pa rezultati našeg eksperimenta koji je za vremenske tačke postavio 6 i 24 sata mogu biti posledica brzog delovanja ibogaina, ali i delovanja noribogaina tokom dužeg vremenskog perioda, bar do 24 sata. Podaci o delovanju noribogaina na ćelijskom, molekularnom ili biohemijском nivou su veoma oskudni, izuzev podataka o farmakološkim svojstvima. Stoga bi efekti noribogaina posredovani receptorima i/ili izvesni indirektni metabolički efekti takođe mogli biti dodatni faktori koji utiču na promenu ROS i redoks homeostaze.

Ibogain izaziva promene u energetskom metabolizmu ćelija i prethodni rezultati na mužjacima pacova su pokazali značajnu glikogenolitičku aktivnost koja je povezana sa uticajem ibogaina na metabolizam glukoze (Vidonja Uzelac i sar. 2019a), bez uticaja na potrošnju hrane i vode. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je i kod ženki glikogenolitički potencijal ibogaina ispoljen, ali u manjem stepenu nego kod mužjaka. Ovo bi mogla biti posledica razlika u hormonskom statusu jer je u istraživanjima na životinjama pokazano da estrogen smanjuje oksidaciju glukoze, glukoneogenezu i glikogenolizu, i povećava oksidaciju masnih kiselina u jetri i skeletnim mišićima (Peterson i sar. 2007). Visoka glikogenolitička aktivnost u jetri (procenjena intenzitetom PAS bojenja) je ispoljena u 6 od 10 ispitanih životinja nakon 6 sati od tretmana, i u 5 od 9 posle 24 sata, ukazujući na individualne razlike u glikogenolitičkim efektima ibogaina. Iako udeo glikogen pozitivnih ćelija ukazuje na glikogenolitičku aktivnost kod pacova tretiranih ibogainom, nije nađena statistički značajna razlika u odnosu na kontrole. Procenti ćelija koje pokazuju glikogenolizu su u skladu sa rezultatima nađenim kod mužjaka pacova (Vidonja Uzelac i sar. 2019a) i sugerišu da ibogain indukuje glikogenolizu i kod ženki. I pored toga nivoi glukoze u krvi tretiranih životinja nisu bili statistički značajno drugačiji od kontrola. Takođe, efekat ibogaina nije bio praćen značajnim promenama u potrošnji hrane, dok je potrošnja vode bila značajno povećana jedino 24 sata nakon tretmana manjom dozom. Sve zajedno, ovi rezultati ukazuju da upotreba ibogaina *per os* u dozama od 1mg/kg i 20mg/kg uzrokuje promene u metabolizmu glukoze, ali rezerve glukoze i homeostatski kapacitet nisu značajno narušeni. Sa druge strane ovi rezultati ne isključuju mogućnost da se značajne promene nivoa metabolizma glukoze dešavaju ranije tokom prvih 6 sati nakon ingestije i da ne mogu biti detektovani posle 6 i 24 sata.

Ibogain dozno zavisno narušava ROS homeostazu (Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2012). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da nema promena u aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima 6 ili 24 sata posle bilo koje od primenjenih doza ibogaina. Promene u aktivnosti antioksidativnih enzima u eritrocitima takođe nisu zabeležene ni kod mužjaka (Vidonja Uzelac i sar. 2019a). Prethodno istraživanje *in vitro* (Nikolić-Kokić i sar. 2015a) je pokazalo da ibogain dovodi do povećanje aktivnosti SOD1 i GR u eritrocitima i do oslobađanja ATP jedan sat

posle inkubacije pune krvi sa 10 ili 20 μM ibogaina *in vitro*. Međutim, koncentracije ibogaina u plazmi ženki pacova 6 sati posle *per os* primene su bile uglavnom ispod granice detekcije (0,2 ng/l ili 0,644 nM) kod životinja tretiranih manjom dozom (1 mg/kg), i 7,6 ng/L (24,5 nM) u proseku kod životinja tretiranih većom dozom (20 mg/kg). Ove koncentracije ibogaina su najverovatnije suviše niske da bi ostvarile značajnije efekte na sistem antioksidativne zaštite ili oslobađanje ATP iz eritrocita *in vivo*. Kubiliene i sar. (2017) su pokazali da se maksimalna koncentracija i ibogaina i njegovog primarnog metabolita noribogaina u krvi miševa postiže za samo 30 min. Izostajanje efekta na antioksidativne enzime u eritrocitima posle 6 sati može takođe biti posledica brzog metabolizma ibogaina, pa postoji mogućnost da su se takvi efekti ispoljili mnogo ranije. Literaturni podaci ukazuju da su koncentracije ibogaina u punoj krvi veće nego u plazmi i da bi za ovu razliku mogli biti odgovorni trombociti koji služe kao depo ibogaina u krvi (Glick i Maisonneuve 1998). Međutim, ne postoje podaci o koncentraciji ibogaina niti noribogaina u eritrocitima kao ni o efektima noribogaina na antioksidativne enzime u eritrocitima.

U jetri, prema prikazanim rezultatima, 6 sati nakon ingestije ibogaina dolazi do izvesnog povećanja koncentracije neproteinskih tiola, što bi se moglo objasniti kao redoks regulacija koja uključuje glutation i ostale male molekule koji sadrže -SH grupe, a u koje spadaju i metabolički kofaktori kao što su koenzim A (uključen u biosintezu i degradaciju masnih kiselina). U slučaju pražnjenja rezervi ATP i pomeranja ćelijskog redoks stanja prema oksidativnom, povećanje sinteze neproteinskih molekula koji sadrže -SH bi moglo predstavljati adaptivni odgovor. Međutim, kako sinteza GSH zahteva energiju i redukujuće agense (ATP, NADPH) čini se da povećanje koncentracije tiola u ovom slučaju ne dolazi od povećanja sinteze GSH već od drugih klasa tiola i metaboličkih izvora. Kako u ovom eksperimentu nema razlike u aktivnosti enzima zavisnih od GSH (GPx, GR i GST) čini se da ukupni metabolizam glutationa nije promenjen. Iako postoje literaturni podaci o brzom efektu ibogaina *in vitro*, čini se da u *in vivo* eksperimentu ove disertacije znatan deo antioksidativnog odgovora u jetri nastupa kasnije. Aktivnost CAT je povećana 24 sata posle tretmana manjom dozom ibogaina što ukazuje na intenzivno uklanjanje H_2O_2 , dugo nakon eliminacije ibogaina i skoro potpune eliminacije noribogaina iz plazme. Uz to, aktivnost XO u isto vreme je niža sugerišući niži katabolički metabolizam purinskih nukleotida. Kod mužjaka, aktivnost XO pod dejstvom ibogaina je povećana, što može da ukazuje na intenzivnije kataboličke procese u jetri mužjaka, istovremeno sa povećanjem koncentracije lipidnih peroksida (Vidonja Uzelac i sar. 2019a). Prethodni rezultati su pokazali da se nakon tretmana ibogainom povećanje ekspresije SOD događa nakon 24 sata u mozgu mužjaka pacova i posle 6 sati u kvascu (Paškulin i sar. 2006; Paškulin i sar. 2010). Čini se da ibogain podstiče različite energetske metaboličke procese kako bi se obnovile rezerve ATP, a koje su praćene promenama aktivnosti antioksidativnih enzima. Kako nismo našli statistički značajne promene u rezervama glikogena kod ženki pacova posle oralne primene ibogaina čini se da nije došlo ni do intenzivne resinteze glikogena. Sa druge strane, ibogain iz plazme se akumulira u adipoznom tkivu (Hough i sar. 1996) i mogao bi i u ovom tkivu da izazove pražnjenje rezervi ATP, što bi moglo biti praćeno oslobađanjem masnih kiselina u krv. Masne kiseline se mogu koristiti za obnavljanje rezervi ATP u jetri, preko β -oksidacije u peroksizomima što je praćeno stvaranjem H_2O_2 (Foerster i sar. 1981). Stoga, povećanje aktivnosti CAT (koja se uglavnom i nalazi u peroksizomima) se može pripisati i ovim procesima. Indikator lipidne peroksidacije, koncentracija TBARS, je bila najveća 24 sata nakon tretmana većom dozom ali se nije značajno razlikovala od kontrole. Dakle efekti ibogaina na jetru ženki pacova uočeni u ovom istraživanju se razlikuju od rezultata dobijenih na mužjacima (Vidonja Uzelac i sar. 2019a), što ide u prilog polnoj različitosti molekularnih i fizioloških mehanizama dejstava ibogaina. Čini se da kod mužjaka ibogain u jetri primarno stimuliše metaboličke procese vezane za glikogen, što nije slučaj kod ženki, kod kojih bi procesi vezani za lipide mogli da imaju značajniju ulogu.

Histopatološka analiza je pokazala dilataciju centralne vene i manjih grana vene porte u jetri ženki pacova posle tretmana ibogainom za obe doze u oba vremenska intervala. Uočene promene su relativno niskog intenziteta i mogu biti reverzibilne. Kod mužjaka koji su na isti način tretirani ibogainom nisu uočene nikakve histopatološke promene u jetri (Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Vidonja Uzelac 2019). Hepatotoksičnost kod ženki pacova je još jedna bitna razlika u efektima ibogaina u odnosu na mužjake koja bi mogla biti posledica veće biološke raspoloživosti ibogaina i noribogaina ili veće osetljivosti ženki.

U bubrezima, obe doze ibogaina dovode do smanjenja aktivnosti GR, što može biti posledica manje dostupnosti NADPH koja traje bar 24 sata. Slični rezultati su nađeni kod mužjaka (Vidonja Uzelac i sar. 2019b) ukazujući na slične metaboličke efekte ibogaina i procese u bubrezima. Povišena aktivnost CAT u bubrezima 6 sati posle tretmana ibogainom ukazuje na povećanu proizvodnju H₂O₂. Povećanje intenziteta metaboličkih procesa u bubrezima uključuje i porast aktivnosti XO. Ovo nam ukazuje na povećan katabolizam purinergičkih nukleotida i povećanu razgradnju adenina što nije bio slučaj u jetri. Porast aktivnosti XO je veći pri višoj dozi ibogaina. Sve zajedno, čini se da su bubrezi izloženi značajnom oksidativnom opterećenju 6 sati nakon primene ibogaina, posebno pri većoj dozi koja potencijalno dovodi i do manjeg povećanja koncentracije tiola. To bi mogla biti posledica povećanja koncentracije glutationa ali i drugih malih molekula koji sadrže -SH grupe. Posle 24 sata, aktivnost XO je takođe bila viša nego u kontrolnoj grupi, a aktivnost GR je i dalje bila niža ukazujući da su katabolički procesi i dalje aktivni. Niža aktivnost GR u bubrezima, koja je uočena i kod mužjaka posle primene ibogaina, ukazuje da su smanjena dostupnost NADPH i sporiji metabolizam GSH zajednički za oba pola.

U bubrezima su prisutne blage do umerene histopatološke promene na nivou proksimalnih tubula koje su izraženije nakon tretmana većom dozom ibogaina. Analiza urina nije pokazala značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Slične promene su pronađene i kod mužjaka (Vidonja Uzelac i sar. 2019b), sa tom razlikom što je veća doza izazvala uglavnom blage promene posle 6 sati, dok je kod svih ženki koje su tretirane u estrusnoj fazi veća doza izazvala umerene patološke promene. To nam ukazuje da bi i renalna toksičnost ibogaina, pod određenim okolnostima, mogla biti nešto veća kod ženki nego kod mužjaka.

U srcu ženki pacova, ibogain je takođe izazvao promene u aktivnostima antioksidativnih enzima koje bi se mogle smatrati odgovorom na promene u koncentraciji ROS i redoks procese. Pošto nema značajnih promena u pokazateljima oksidativnih oštećenja u odnosu na kontrolnu grupu, uočene promene bi mogle da ukazuju na prolazno narušavanje redoks homeostaze. Jednokratni oralni tretman ibogainom je doveo do značajnog smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD1 i GR nakon tretmana većom dozom u oba vremenska intervala. Aktivnost CAT i GSH-Px su bile donekle smanjene 6 odnosno 24 sata nakon tretmana većom dozom. Uočene su i razlike u koncentraciji neproteinskih -SH grupa i TBARS između pojedinih tretiranih grupa, koje ukazuje na prolazni disbalans u redoks homeostazi. U prethodnim istraživanjima je pokazano da su efekti ibogaina tkivno specifični, kao i da zavise od doze i vremena koje je proteklo od tretmana (Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Vidonja Uzelac i sar. 2019b; Vidonja Uzelac 2019). Promene uočene u srcu se takođe odlikuju određenom vremenskom dinamikom i zavisnošću od doze, pri čemu se izdvaja smanjenje aktivnosti SOD1, GSH-Px i GR 24 sata nakon tretmana većom dozom. Ipak veća doza i duže vreme delovanja nisu dovele do jasnih indikacija oksidativnih oštećenja u srcu (odsustvo razlika u koncentraciji -SH grupa i TBARS u odnosu na kontrolu). Takođe, efekti ibogaina na enzimski sistem antioksidativne zaštite u srcu, jetri i bubrezima, ne prate dosledno neki generalni obrazac u smislu zavisnosti od doze i vremena, već postoje veoma izražene razlike između tkiva.

Najvažniji histopatološki nalaz u ovom istraživanju je prisustvo nekroze kardiomiocita nakon tretmana ibogainom. Ovaj kardiotoksični efekat ibogaina je bio zavisen od doze, odnosno

veća doza je dovela do izraženije, tj. difuzne nekroze. Dakle u eksperimentalnim grupama u kojima je bila značajno smanjena aktivnost SOD i GR, i u manjoj meri CAT i GSH-Px, bila je prisutna i difuzna nekroza, što ukazuje na potencijalnu blokadu aktivnosti koja može biti posledica visoke koncentracije ROS, koja prevazilazi kapacitet antioksidativne odbrane. Manja doza, koja nije uticala na aktivnost antioksidativnih enzima, je kod nekih životinja dovela do fokalne nekroze, dok je kod nekih životinja nekroza bila odsutna. Ipak treba imati u vidu da je histološka analiza rađena na relativno malom delu kaudo-lateralnog zida leve komore. Najčešća mesta na kojima nastaju fokalne lezije su papilarni mišići leve komore i subendokardijalni miokardium (Miller i Gal 2017), tako da na osnovu rezultata našeg eksperimenta ne možemo da isključimo mogućnost da je nekroza (makar fokalna) prisutna u miokardu svih tretiranih životinja. Iako je nekroza kardiomiocita uočena kod skoro svih tretiranih pacova, ni u jednom preparatu nije primećen zapaljenski proces u miokardu (nije bilo infiltracije zapaljenskih ćelija između kardiomiocita), odnosno primena ibogaina je izazvala akutnu nekrozu kardiomiocita bez pridružene inflamacije. Akutne srčane lezije se uglavnom odlikuju raštrkanim degenerativnim promenama malih grupa ćelija, za razliku od ishemijske povrede srca za koju je karakteristična koagulaciona nekroza velikih regiona miokarda. Ovakve lezije se zovu miocitoliza. Oštećenje ćelija u ovom slučaju nije posledica smanjene perfuzije nego direktnog oštećenja kardiomiocita putem biohemijskih ili metaboličkih mehanizama (Lau i Fishbein 2022; Schlatmann i Becker 1977). Kardiotoksična nekroza je ireverzibilan proces indukovana ozbiljnim narušavanjem homeostaze kardiomiocita putem više mehanizama, koji uključuju visoku koncentraciju ROS, narušenu Ca^{2+} signalizaciju, inhibiciju sinteze proteina, i druge. Agensi koji najčešće izazivaju akutnu ćelijsku smrt kardiomiocita spadaju u kategoriju simpatomimetika, kao što je kokain, ali i mnogi drugi agensi kao što su kateholamini, interleukin-2, ciklofosfamid, emetin, litijum, fenotiazini, antimoni i jedinjenja koja sadrže arsen (Lau i Fishbein 2022). Osim nekroze kardiomiocita, ibogain je izazvao i vaskulitis, i to u većoj meri kod životinja tretiranih većom dozom, kao i perikarditis kod tri životinje.

Osim kod tkiva sa karakteristično intenzivnim metabolizmom, ibogain je narušio homeostazu i u drugim ispitivanim tkivima. Odgovor na nivou antioksidativnih enzima je tkivno specifičan, nije ni vremenski ni dozno zavisano. U ileumu su obe doze ibogaina dovele do smanjenja aktivnosti GSH-Px u oba vremenska intervala. U plućima je manja doza smanjila aktivnost SOD1 i GR nakon 6 sati, a velika doza je smanjila aktivnost CAT nakon 6 i 24 sata, i koncentraciju proteinskih -SH grupa nakon 6 sati. U slezini je ibogain izazvao smanjenje aktivnosti CAT, GST i XO u nekim grupama, ali i povećanje koncentracije TBARS u većini tretiranih grupa. U mozgu, 24 sata nakon tretmana velikom dozom, došlo je do povećanja aktivnosti XO i smanjenja koncentracije neproteinskih -SH grupa, koja je takođe bila značajno manja nego kod životinja tretiranih malom dozom. Smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima može se tumačiti na dva načina: ili smanjenjem prisustva oksidativnog pritiska ili inhibicijom koja je posledica prisustva ROS koji prevazilazi kapacitet antioksidativne odbrane i vodi ka nekrozi ili apoptozi. Ovo bi se generalno moglo primeniti na rezultate dobijene nakon tretmana ibogainom u ileumu, plućima i slezini. U mozgu, visoka aktivnost XO pokazuje na intenzivnu degradaciju purinskih nukleotida, a smanjenje slobodnih neproteinskih tiola i pomenost ka oksidovanom stanju.

U uterusu je veća doza ibogaina izazvala smanjenje aktivnosti SOD1 nakon 6 sati samo kod životinja tretiranih u estrusu, a aktivnosti CAT nakon 6 sati samo kod životinja tretiranih u metestrusu, kao i nakon 24 sata. Ovaj rezultat jasno ukazuje na uticaj faze ciklusa na metaboličke efekte ibogaina u uterusu. Razumljivo je da promene u aktivnostima antioksidativnih enzima u uterusu zabeležene u *in vivo* eksperimentu nisu uporedive sa onima u *ex vivo* eksperimentu. Za razliku od *ex vivo* eksperimenta, *per os* tretman ibogainom je praćen određenom farmakokinetikom, odnosno metabolisanjem ibogaina u noribogain, njihovom raspodelom po tkivima i eliminacijom. Iako nemamo podatak o koncentraciji ibogaina i noribogaina u uterusu, na

osnovu koncentracija izmerenih u plazmi i literaturnih podataka o raspodeli ibogaina (Kontrimaviciute i sar. 2006) možemo pretpostaviti da su koncentracije ibogaina kojima je izložen uterus u *in vivo* eksperimentu manje od onih u *ex vivo* eksperimentu.

Faza estrusnog ciklusa (estrus ili metestrus) u trenutku tretmana je značajno uticala na efekte ibogaina na neke od merenih parametara u različitim tkivima. U srcu i bubrezima, na primer, faza ciklusa nije imala skoro nikakav bitan efekat, dok je sasvim očekivano najveći efekat bio u uterusu gde su zabeležene značajne razlike u aktivnostima SOD1, CAT, GSH-Px i GR u zavisnosti od faze estrusnog ciklusa. Primećena je i jedna interesantna pravilnost u ovim razlikama. Naime, u tkivima u kojima je postojala značajna razlika, aktivnost enzima koji učestvuju u eliminaciji $O_2^{\cdot-}$ je bila veća kod životinja tretiranih u metestrusu, i to SOD1 u uterusu, plućima i srcu, i SOD2 u mozgu. Sa druge strane, aktivnost enzima koji učestvuju u razgradnji H_2O_2 , zatim GST, XO i koncentracija neproteinskih -SH grupa su bili veći kod životinja tretiranih u estrusu. Ovo se konkretno odnosi na CAT u uterusu, bubregu i plućima; GSH-Px u uterusu, ileumu i mozgu; GR u uterusu; GST u slezini; XOD u jetri i ileumu; neproteinske -SH grupe u jetri i plućima. Jedini izuzetak je aktivnost CAT u slezini koja je bila veća u metestrusu. Naravno, bez odgovora je ostalo pitanje kakve bi promene bile u preostale dve faze estrusnog ciklusa. Uticaj reproduktivnog ciklusa ženki na metabolizam ukazuje na jasnu potrebu za ispitivanje tog uticaja na nivou fizioloških efekata farmakološki aktivnih jedinjenja koja osim klasičnog farmakološkog nivoa dejstva apsorpcija-interakcija sa receptorima-eliminacija/ekskrecija imaju i izražene efekte na ćelijski metabolizam.

Kontraktilna aktivnost glatkih mišićnih ćelija je osetljiva na promene u unutarćelijskoj (Ohya i Sperelakis 1989; Okashiro i sar. 1992; Koh i sar. 1998; Tinker i sar. 2014) i vanćelijskoj (Matsuo i sar. 1997; Mounkaila i sar. 2005; Kwon i sar. 2015; Babou Kammoe i sar. 2021) koncentraciji ATP. Potrošnja unutarćelijskih rezervi energije može da dovede do narušavanja pravilnog ritma i reverzibilne inhibicije kontraktilne aktivnosti, dok porast vanćelijske koncentracije ATP stimuliše kontraktilnu aktivnost uterusa. Kontraktilna tkiva su osetljiva i na promene u nivoima ROS, naročito H_2O_2 . Sve ovo čini izolovana kontraktilna tkiva dobrim modelom za ispitivanje farmakodinamike ibogaina, odnosno efekata kako na kontraktilnu aktivnost tako i redoks ravnotežu. Zbog toga su u ovom istraživanju korišćena dva modela, izolovani uterus i izolovane arterije pacova.

Pokazali smo da ibogain ima relaksantno dejstvo na izolovanu aortu i mezenteričnu arteriju pacova. Dobijeni rezultati ukazuju i na moguće mehanizme vazorelaksantnog dejstva ibogaina *in vitro*, ali i na eventualne mehanizme vazorelaksantnog dejstva *in vivo*. Pošto je ibogain lipofilni molekul koji lako prolazi kroz ćelijske membrane, u preparatu krvnog suda može ostvariti svoje dejstvo kako u ćelijama endotela tako i u glatkim mišićnim ćelijama. Glavni mehanizam vazodilatacije, naročito u velikim krvnim sudovima, je relaksacija glatkih mišića u zidu krvnog suda izazvana dejstvom NO oslobođenog iz ćelija endotela u odgovoru na različite stimuluse, uključujući neuralne i humoralne signalne molekule kao što su acetilholin, bradikinin, ATP, pa i hipoksija i stres. Vezivanje odgovarajućih signalnih molekula za receptore na ćelijama endotela dovodi do ulaska Ca^{2+} koji se vezuje za kalmodulin i aktivira NO sintazu. NO je dobro rastvorljiv i u vodi, i u lipidima pa lako difunduje u okolne endotelske i glatke mišićne ćelije. Najvažniji signalni put u vazorelaksantnom delovanju NO je aktiviranje rastvorljive guanilat ciklaze u glatkim mišićnim ćelijama koje je praćeno povećanjem koncentracije cGMP-a. cGMP aktivira protein kinazu C (PKC) koja fosforiliše veliki broj proteina uključenih u regulaciju unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} i osetljivosti na Ca^{2+} , a takođe izaziva hiperpolarizaciju ćelijske membrane posredstvom K^+ kanala, i tako dovodi do relaksacije glatkih mišićnih ćelija (Vanhoutte i sar. 2017; Krüger-Genge i sar. 2019; Hall i Hall 2020). Ibogain interaguje sa velikim brojem receptora, transportera i enzima, a njegova primarna ciljna molekulska struktura u farmakološkom smislu su svakako 5-HT receptori.

Prikazani rezultati pokazuju da relaksantno dejstvo ibogaina zavisi od očuvanosti endotela. Na osnovu toga se može pretpostaviti da je dejstvo ibogaina posredovano aktivacijom sinteze NO i drugih vazorelaksantnih molekula u ćelijama endotela. Poznato je da su u endotelu prisutni 5-HT receptori. Raniji radovi su pokazali da endotelni 5-HT receptori posreduju u relaksaciji različitih tipova krvnih sudova, kao što su svinjska vena kava (Sumner i sar. 1991), jugularna vena zamorca (Gupta 1992), svinjska pulmonalna arterija (Glusa i Roos 1996; Glusa i Pertz 2000) i svinjska koronarna arterija (Molderings i sar. 1989). Pokazano je i da 5-HT receptori aktiviraju i konstitutivne i inducibilne NO sintaze, u različitim tipovima ćelijskih linija (Manivet i sar. 2000). Sve navedeno ukazuje da bi jedan od mehanizama relaksantnog dejstva ibogaina mogao biti posredovan njegovim vezivanjem za 5-HT receptore u endotelu koji aktiviraju sintezu NO koji zatim difunduje u glatke mišićne ćelije i izaziva njihovu relaksaciju. Funkcija NO u krvnim sudovima je sinergistički povezana sa vazodilatatornim prostaglandinima i hiperpolarizacijom zavisnom od endotela (EDH, eng. endothelium-dependent hyperpolarization). NO ima dominantnu ulogu u vazodilataciji relativno velikih krvnih sudova, dok EDH ima dominantnu ulogu u manjim krvnim sudovima. Veći broj molekula, među kojima je i ADP, bi mogli da budu važni EDHF ali skorija istraživanja su pokazala da je H₂O₂ jedan od najznačajnijih EDHF. Na primer H₂O₂ proizveden u endotelu funkcioniše kao jedan od ključnih EDHF u koronarnoj mikrocirkulaciji (Larsen i sar. 2008; Garland i Dora 2017; Vanhoutte i sar. 2017; Ikumi i sar. 2020; Nappi i sar. 2022). Glavni izvor H₂O₂ u endotelu je NOX4. H₂O₂, kao i NO, svoje vazodilatatorno dejstvo ostvaruje aktiviranjem PKG ali i alternativnim c-GMP nezavisnim putem. PKG funkcioniše kao redoks senzor, tj. aktivnost ovog enzima je direktno redoks regulisana. U prisustvu H₂O₂ dolazi do oksidacije dve cisteinske -SH grupe i formiranja disulfidne veze između dve subjedinice izoforme PKG-I α i aktivacije njene kinazne aktivnosti usled povećanja afiniteta za supstrat (Burgoyne i sar. 2007; Prysyzhna i sar. 2012; Friederich-Persson 2017). Tako da je moguće da ibogain ostvaruje svoje vazorelaksantno dejstvo i preko modulacije redoks stanja endotela, prvenstveno sa H₂O₂ i ADP kao medijatorima.

U glatkim mišićnim ćelijama su prisutni različiti podtipovi 5-HT receptora čija aktivacija može proizvesti suprotne efekte. Na primer, za 5-HT_{2B} je poznato da posreduje u kontrakciji glatkih mišića (Wouters i sar. 2007), a 5-HT₄ i 5-HT₇ posreduje u njihovoj relaksaciji (Prins i sar. 1999; Terrón i Falcón-Neri 1999; Wouters i sar. 2007). Raniji radovi su pokazali da: 5-HT_{2A} posreduje u kontrakciji isečaka svinjskog želuca (Janssen i sar. 2002) i kontrakciji glatkih mišića disajnih puteva goveda (Da Costa Guevara i Trejo 2021), ali kod ljudi i zamorca ta kontrakcija je praćena relaksacijom (Campos-Bedolla i sar. 2008). 5-HT_{1B}/5-HT_{1D} su prisutni u glatkim mišićnim ćelijama renalne arterije zečeva i povezani su sa aktivacijom MAP kinaze (Hinton i sar. 2000). Dakle efekti ibogaina na neko ciljno tkivo zavise od podtipova 5-HT receptora koji su prisutni u datom tkivu i od njihove relativne zastupljenosti. Interakcija ibogaina sa 5-HT receptorima u glatkim mišićnim ćelijama bi svakako mogla da bude jedan od puteva relaksantnog delovanja ibogaina na arterije i to bi mogao da bude predmet daljih istraživanja.

Prisustvo ibogaina izaziva pad tonusa arterija koji se odlikuje određenom vremenskom dinamikom, odnosno tonus se značajno menja tokom vremena. Zapaženoj vremenskoj dinamici promene tonusa verovatno doprinosi plejotropna priroda ibogaina koji interaguje sa velikim brojem signalnih puteva i dovodi do brojnih promene u metabolizmu ćelije, kao što su promena koncentracije ATP i energetskeg metabolizma. Pokazano je da je redoks signalizacija izuzetno važna za regulisanje aktivnosti ćelija endotela (Song i Zou 2014), pa bi i ovo mogao biti jedan od mehanizama kojim ibogain utiče na tonus krvnih sudova.

Aorta se svrstava u elastične arterije a mezenterična arterija u elastično-mišićne arterije. Pošto nisu uočene značajne razlike u ponašanju ova dva tipa krvnih sudova u prisustvu ibogaina, moguće je da oni poseduju slične setove receptora i signalnih puteva sa kojima interaguje ibogain. Takođe, postoji mogućnost da su ovi receptori i signalni putevi prisutni i u drugim tipovima krvnih

sudova. Zbog toga bi bilo interesantno ispitati dejstvo ibogaina na mišićne arterije, kao što je renalna arterija, kao i na druge manje arterije i vene.

U ranijim radovima je pokazano da eritrociti oslobađaju ATP iz membranski vezanih depoa (Chu i sar. 2012) pod dejstvom različitih vrsta stimulusa (Ellswort i sar. 2009). Eritrociti imaju nekoliko membranski vezanih depoa ATP (Chu i sar. 2012). Efekat ibogaina na nivo ATP u ćelijama je brz i dešava se u roku od nekoliko minuta (Paškulin i sar. 2010). Oslobađanje ATP iz eritrocita u vanćelijski prostor je jedan od postuliranih mehanizama prenosa signala kojim se reguliše snabdevanje kiseonikom prema lokalnim potrebama tkiva na nivo malih krvnih sudova (Ellswort i sar. 2009). Kontrolisano oslobađanje ATP iz eritrocita dešava se u odgovoru na fiziološke i farmakološke stimuluse, hipoksiju i hiperkapniju (Bergfeld i Forrester 1992), smanjenje oksidativnog pritiska (González-Alonso i sar. 2002) ili čak mehaničku deformaciju (Sprague i sar. 2001). Količina oslobođenog ATP generalno zavisi od intenziteta stimulusa, pa tako zavisi i od koncentracije ibogaina. Koncentracije ATP izmerene u plazmi 10 min nakon inkubacije krvi sa ibogainom su bile 86 pM (pri koncentraciji ibogaina od 10 μ M) i 126 pM (pri koncentraciji ibogaina od 20 μ M), dok je koncentracija u kontrolnim uzorcima bila 60 pM (Nikolić-Kokić i sar. 2015a). U prikazanom eksperimentu, tretirane su izolovane torakalne aorte rastućim koncentracijama ibogaina i pokazano je da ATP ostvaruje relaksantni efekat skoro isključivo u prisustvu endotela. To bi moglo da znači da ATP reguliše protok krvi i u velikim arterijama, a ne samo u malim krvnim sudovima i to u koncentracijama koje eritrociti oslobađaju u krv kada su izloženi koncentraciji ibogaina koja odgovara terapijskoj, odnosno farmakološki relevantnoj dozi. Stepen relaksacije do kog dovodi ATP je manji u poređenju s odgovarajućom koncentracijom ibogaina, pa bi makar u torakalnoj aorti ovaj eventualni mehanizam posredovan ATP iz eritrocita, imao manji udeo u ukupnom vazoaktivnom efektu od direktne interakcije ibogaina sa endotelom i glatkim mišićnim ćelijama. Ipak ovde se mora postaviti pitanje validnosti ekstrapolacija na *in vivo* sistem. Naime najveći deo relaksantnog efekta u našem eksperimentu je ostvaren pri jako niskim koncentracijama i malom opsegu promena koncentracija ATP, od 0 do 5, odnosno 20 pM. Hemijski sastav izotoničnog rastvora u kom su izvođeni eksperimenti na izolovanim arterijama se prilično razlikuje od sastava krvi, pa tako ne sadrži ATP, odnosno početna koncentracija je 0, dok je u krvi početna koncentracija ATP bez prisustva ibogaina bila 60 pM. U svakom slučaju ovo je interesantan potencijalni mehanizam delovanja ibogaina na kardiovaskularni sistem koji zahteva dalja istraživanja naročito na nivou malih krvnih sudova koji su odgovorni za veći deo periferne rezistencije.

Za razliku od izolovanih arterija i ileuma (Vidonja Uzelac 2019) koji su tretirani ibogainom u prekontrahovanom stanju, izolovani uterus može da ispoljava širi spektar kontraktilne aktivnosti, kako tonične tako i fazne, različitog intenziteta u zavisnosti od osobina izotoničnog rastvora, odnosno koncentracija jona. Ovo nam između ostalog omogućava da ispitamo ne samo inhibitorni nego i stimulatorni efekat ispitivane supstance, odnosno da steknemo bolji uvid u farmakokinetiku date supstance u većem opsegu koncentracija. Osetljivost kontraktilne aktivnosti na nivoe ATP i ROS, i mogućnost eksperimentalnog manipulisanja različitim režimima kontraktilne aktivnosti, uz još neke praktične pogodnosti kao što su relativno lako izolovanje i rukovanje preparatom i dovoljno velika količina tkiva za biohemijska ispitivanja kao što je merenje aktivnosti antioksidativnih enzima, čine izolovani uterus pacova veoma pogodnim modelom za istovremeno proučavanje farmakodinamike ibogaina, odnosno sprege kontraktilnosti, energetskog metabolizma i redoks ravnoteže na koje on utiče.

U našem prethodnom istraživanju smo pokazali da ibogain ima dvojako dejstvo na faznu kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa pacova. Niske koncentracije ibogaina stimulišu kontraktilnu aktivnost a visoke je inhibiraju (Oreščanin-Dušić i sar. 2018). Tada je pretpostavljeno da bi stimulatorni efekat ibogaina bar delimično mogao biti posledica eventualnog povećanja vanćelijske koncentracije ATP. U istom istraživanju je pokazano da ibogain dovodi do promena u

aktivnostima antioksidativnih enzima koje ukazuju na veoma veliki porast nivoa H_2O_2 u prisustvu većih koncentracija ibogaina. Pretpostavljeno je da bi inhibitorni efekat ibogaina na kontraktilnu aktivnost bar delimično mogao da bude posledica narušavanja redoks ravnoteže. Na kraju postavlja se pitanje načina na koji je ibogain doveo do ovako velikog narušavanja redoks ravnoteže?

U ovoj disertaciji je, korišćenjem eksperimentalnog modela izolovanog uterusa pacova, pokušano da se donekle razjasne mehanizmi delovanja ibogaina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa, odnosno da se utvrdi da li su ti efekti dominantno farmakološki ili metabolički, a zatim i da se istraže mehanizmi delovanja ibogaina na redoks ravnotežu.

Poređenjem efekata ibogaina i ATP pri različitim eksperimentalnim uslovima (različite koncentracije Ca^{2+} i K^+ u izotoničnom rastvoru) pokazano je da postoje velike kvalitativne razlike u njihovim efektima. Pokazali smo da ATP može da deluje stimulatorno na kontraktilnost izolovanog uterusa, ali da se stimulatorni (pa i inhibitorni) efekti ibogaina potpuno razlikuju. Za razliku od ibogaina, pri niskoj koncentraciji Ca^{2+} kada se uterus ne kontrahuje, ATP nema pejsmejkerski efekat odnosno ne uspostavlja pravilnu kontraktilnu aktivnost. Sa druge strane, pri većim koncentracijama Ca^{2+} kada uterus poseduje pravilnu faznu aktivnost, ibogain povećava trajanje pojedinačnih kontrakcija, tj. usporava repolarizaciju, dok ATP povećava amplitudu i frekvenciju, bez efekta na brzinu repolarizacije. Efekti ibogaina i ATP se potpuno razlikuju i pri povećanim koncentracijama K^+ . Dok ibogain povećava frekvenciju faznih kontrakcija i delimično relaksira tonične kontrakcije, ATP ne pokazuje ni jedno od ova dva dejstva. Dakle, porast vanćelijske koncentracije ATP nakon dodavanja ibogaina bi mogao da ima samo mali udeo u efektima ibogaina na kontraktilnu aktivnost, ali stimulatorni efekat se u veoma velikoj meri, ili isključivo, ostvaruje na drugi način. Daljim istraživanjima je pokazano da antagonist 5-HT₂ receptora ketanserin, pri svim eksperimentalnim uslovima, ima skoro identične efekte kao ibogain u približno ekvimolarnim koncentracijama. Pri niskim koncentracijama Ca^{2+} ketanserin uspostavlja pravilnu faznu aktivnost, pri višim koncentracijama Ca^{2+} produžava trajanje faznih kontrakcija, dok pri povećanim koncentracijama K^+ povećava frekvenciju faznih kontrakcija i delimično relaksira tonične kontrakcije. Dalje je pokazano da ketanserin, kao i ibogain ima dvojak efekat na kontraktilnost izolovanog uterusa, odnosno da je pri nižim koncentracijama stimuliše, a pri višim inhibira. Kvantitativnim poređenjem stimulatornih i inhibitornih efekata pri rastućim ekvimolarnim koncentracijama ibogaina i ketanserina, dodatno je pokazana velika sličnost u njihovim efektima. Sigmoidne krive koje opisuju stimulatorne efekte ibogaina i ketanserina na amplitudu, frekvenciju i površinu ispod krive imaju isti oblik, odnosno nagib, što ukazuje na sličnost u mehanizmima kojima se ovi efekti ostvaruju. Sigmoidna kriva za ketanserin je pomerena ulevo, tj. ka nižim koncentracijama. EC₅₀ vrednost za ketanserin je približno 3-5 puta manja u poređenju sa ibogainom, odnosno ketanserin ostvaruje iste efekte pri nešto nižim koncentracijama.

Kada je u pitanju inhibitorni efekat viših koncentracija, takođe se uočava velika sličnost između ibogaina i ketanserina. Ketanserin i ovaj efekat ostvaruje pri nešto nižim koncentracijama od ibogaina. Obzirom na osobenosti eksperimentalnog modela i promene kontraktilnosti pri izabranim eksperimentalnim uslovima i pri izabranom opsegu koncentracija ibogaina, kvalitet sigmoidnih krivih ne dozvoljava validno izračunavanje i poređenje EC₅₀, pa je značajnost ovih razlika ispitana i potvrđena dvofaktorskom analizom varijanse. Za razliku od ibogaina, inkubacija kontraktilno aktivnog izolovanog uterusa sa ketanserinom u koncentraciji od 29 μ M (ekvimolarna koncentracija 10 mg/l ibogain hidrohlorida) nije dovela ni do kakvih promena u aktivnosti antioksidativnih enzima. Dakle, ketanserin ostvaruje skoro identične efekte na kontraktilnost izolovanog uterusa kao i ibogain, bez ikakve naznake da pri tom dovodi do značajnog porasta unutarćelijske koncentracije H_2O_2 . Na osnovu toga možemo da isključimo porast unutarćelijske

koncentracije H₂O₂ kao značajan faktor u relaksantnom dejstvu ibogaina, u ovakvim eksperimentalnim uslovima.

Na osnovu ovoga mogu se izvesti dva zaključka. Prvi, da ibogain svoje neposredne farmakološke efekte na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa najverovatnije ostvaruje interakcijom sa receptorima za koje deli visok afinitet sa ketanserinom, a to su na prvom mestu serotoninski receptori, naročito 5-HT₂. Drugi zaključak je da ibogain dovodi do promena u redoks ravnoteži i aktivnosti antioksidativnih enzima u izolovanom uterusu pacova putevima koji ne uključuju receptore za koje deli visok afinitet sa ketanserinom.

U ovoj disertaciji je pokazano da su ROS/redoks procesi koje pokreće ibogain posredovani β-adrenergičkim receptorima i K_{ATP} kanalima. To je postignuto upotrebom selektivnog antagoniste β1 i β2-adrenergičkih receptora propranolola i blokatora K_{ATP} kanala glibenklamida, jer je ranije pokazano da su ovi receptori i jonski kanali modulatori cirkulacije ROS u ćelijama.

Kada je izolovani uterus tretiran rastućim koncentracijama ibogaina, pretretmani propranololom i glibenklamidom nisu narušili dvojaki efekat ibogaina, odnosno njegovo svojstvo da stimuliše kontraktilnu aktivnost pri nižim koncentracijama i da je inhibira pri višim. Blokada β-adrenergičkih receptora propranololom ili K_{ATP} kanala glibenklamidom nije značajno uticala na amplitudu i frekvenciju, ali je blokada β-adrenergičkih receptora povećala površinu ispod krive, u odnosu na sam ibogain. Kako bi bila ispitana uloga β-adrenergičkih receptora i K_{ATP} kanala u efektima ibogaina na redoks ravnotežu, izolovani uterusi su inkubirani u prisustvu ibogaina 10 mg/ml (29 μM) sa ili bez pretretmana propranololom i glibenklamidom. Identični eksperimentalni postupci su sprovedeni pri dve različite koncentracije Ca²⁺ u izotoničnom rastvoru, odnosno pri niskom i visokom intenzitetu početne kontraktilne aktivnosti. Aktivnost antioksidativnih enzima je merena 2 i 4 sata nakon tretmana ibogainom. Takođe, parametri kontraktilne aktivnosti su praćeni 4 sata.

Pri nižoj koncentraciji Ca²⁺ ibogain je doveo do povećanja kontraktilnosti izolovanog uterusa. Dva sata nakon dodavanja ibogaina i amplituda i frekvencija su bili povećani. Četiri sata nakon dodavanja ibogaina amplituda se vratila na početni nivo ali je frekvencija i dalje bila veća u poređenju sa netretiranim kontrolama, pa se može smatrati da je efekat ove koncentracije ibogaina bio stimulatoran. Pošto je do povećanja kontraktilne aktivnosti, a pre svega amplitude, došlo neposredno nakon dodavanja ibogaina, uočena stimulacija kontraktilnosti se može pripisati direktnim farmakološkim efektima ibogaina, odnosno najverovatnije interakciji sa 5-HT receptorima. Sa druge strane najveći porast frekvencije se ostvaruje mnogo kasnije, odnosno nakon 2 sata, što bi se moglo pripisati metaboličkim efektima ibogaina. Naime, ranija istraživanja su pokazala da ibogain dovodi do potrošnje ili oslobađanja ATP neposredno nakon primene, kao i do porasta intenziteta oksidativnog metabolizma koji je praćen porastom količine ROS u ćelijama (Paškulin i sar. 2012; Nikolić-Kokić i sar. 2015a). U literaturi je već opisano da ibogain pojačava spontanu kontraktilnu aktivnost glatkih mišića, kao i da je ova pojava povezana sa P2X purinoceptorima (Munday i sar. 2000). Takođe je pokazano da ATP i/ili slični purini indukuju kontrakcije glatkih mišića aktivirajući signalne puteve koji dovode do povećanja unutarćelijske koncentracije i mobilizacije Ca²⁺ (Zizzo i sar. 2007; Zizzo i sar. 2008). Pošto je u ovoj disertaciji već pokazano da dodavanje ATP pri skoro identičnim eksperimentalnim uslovima (slična koncentracija Ca²⁺ i već uspostavljena kontraktilna aktivnost) dovodi do značajnog povećanja frekvencije, moguće je da je i ovaj „zakasneli” porast frekvencije u određenoj meri posledica porasta intenziteta energetskeg metabolizma. Dalje, pretretmani propranololom i glibenklamidom, odnosno blokada β-adrenergičkih receptora i K_{ATP} kanala su sprečili da ibogain dovede do povećanja frekvencije kontrakcija, što bi moglo da ide u prilog ovoj pretpostavci. Za membranske K_{ATP} kanale se smatra da bi mogli da predstavljaju vezu između unutarćelijskih energetskih molekula sa električnom aktivnošću (Akrouh i sar. 2009). Na primer, u ćelijama

pankreasu kada je metabolizam visok, smanjena aktivnost K_{ATP} kanala pospešuje depolarizaciju membrane, i pokreće ćelijske odgovore (Ashcroft 2005). Sa druge strane, β -adrenergički receptori mogu da interaguju strukturno i funkcionalno sa purinergičkim receptorima, pa bi indirektni uticaj na purinergičke signalne puteve mogao da bude jedan od načina na koje blokada β -adrenergičkih receptora sprečava uočeni porast frekvencije. Pretretman propranololom je takođe doveo i do smanjenja amplitude 4 sata nakon dodavanja ibogaina, što bi se isto moglo dovesti u vezu sa metaboličkim efektima.

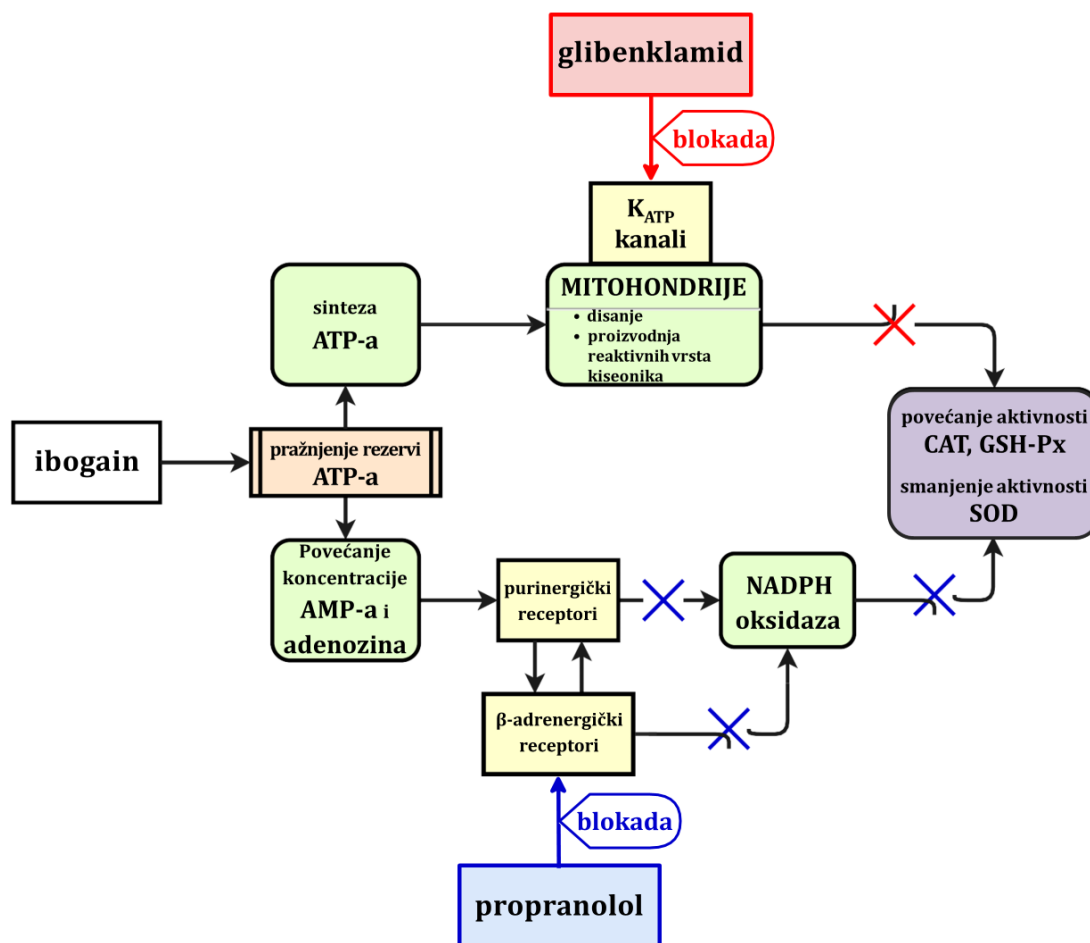
Kao i u ranijim eksperimentima, pri visokoj koncentraciji Ca^{2+} ibogain nije uticao na kontraktilnu aktivnost neposredno nakon dodavanja. Pri ovakvim eksperimentalnim uslovima amplituda i frekvencija su već visoke pa dodavanje ibogaina (10 mg/ml, 29 μ M) nema neposredni efekat. Sa druge strane, tokom 4 sata koliko je trajao eksperiment, ibogain je delovao inhibitory na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusa. Pri tome, nije doveo do značajnih promena amplitude ali jeste do značajnog smanjenja frekvencije. Pokazalo se i da su efekti pretretmana bili različiti u zavisnosti od spoljašnje koncentracije Ca^{2+} . Kada je u pitanju amplituda, propranolol je sprečio da dodavanje ibogaina dovede do njenog smanjenja, odnosno blokada β -adrenergičkih receptora u prisustvu visoke koncentracije Ca^{2+} i ibogaina omogućava održavanje visoke amplitude kontrakcija. Ipak, treba imati u vidu da su ovde razlike u amplitudi, u apsolutnim vrednostima, prilično male. Kada je u pitanju frekvencija, pretretmani propranololom i glibenklamidom nisu imali nikakav efekat, odnosno pad frekvencije je isti kao i u njihovom odsustvu. Pošto indukcija kontraktilne aktivnosti izolovanog uterusa dodavanjem Ca^{2+} u izotonični rastvor omogućava stabilne kontrakcije i unutarćelijske nivoe Ca^{2+} , izgleda da metabolički efekti ibogaina i eventualne promene u koncentraciji i/ili lokalizaciji ATP nemaju stimulatorni efekat na kontraktilnost. Prema rezultatima prethodnih istraživanja, vreme pražnjenja rezervi ATP je oko jedan sat nakon dodavanja ibogaina (Paškulin i sar. 2010), a u ovom eksperimentu ibogain je pri visokim koncentracijama Ca^{2+} doveo do pada intenziteta kontrakcija, tj. frekvencije u istom vremenskom periodu. Moguće je i da su drugi ćelijski procesi, odnosno efektori doveli do smanjenja kontraktilnosti. Određenu ulogu u ovoj pojavi bi mogao da ima i H_2O_2 . Na osnovu aktivnosti antioksidativnih enzima mogli bismo da zaključimo da je koncentracija H_2O_2 povećana pri obe koncentracije Ca^{2+} , 2 i 4 sata nakon tretmana, u vreme kada dolazi do smanjenja kontraktilne aktivnosti. Ipak ovo smanjenje kontraktilne aktivnosti je značajno samo pri visokoj koncentraciji Ca^{2+} .

Dakle u ovom eksperimentu aktivnost CAT je bila povećana 2 i 4 sata nakon dodavanja ibogaina. Šta više, 4 sata nakon dodavanja ibogaina, aktivnost oba antioksidativna enzima koji katalizuju redukciju H_2O_2 (CAT i GSH-Px) je bila povećana. Takođe, aktivnost SOD1 je bila smanjena 2 sata nakon dodavanja ibogaina pri obe koncentracije Ca^{2+} . I ovo ide u prilog pretpostavci o visokoj koncentraciji H_2O_2 jer je poznato da aktivnost SOD može biti inhibirana porastom koncentracije proizvoda reakcije koju katalizuje, odnosno H_2O_2 (Silverman i Nick 2002). Pri visokoj koncentraciji Ca^{2+} , osim SOD1 smanjena je i aktivnost SOD2 što ukazuje na povećanje koncentracije H_2O_2 u mitohondrijama. Na osnovu aktivnosti antioksidativnih enzima, može se zaključiti da je intenzitet oksidativnih procesa nakon inkubacije sa ibogainom veoma visok pri čemu je u prisustvu visoke koncentracije Ca^{2+} još viši i sa nešto drugačijom dinamikom. Ovi rezultati su u saglasnosti sa našim prethodnim rezultatima koji su pokazali da ibogain dovodi do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima (Orešćanin-Dušić i sar. 2018) koje nije bilo posledica njihove povećane biosinteze nego posledica promena na posttranslacionom nivou. Pošto su prethodna istraživanja (Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2012; Nikolić-Kokić i sar. 2015a) pokazala da se redoks aktivnost ibogaina ne ostvaruje direktnim vezivanjem za receptore koji posreduju u psihoaktivnim/neuralnim efektima ibogaina, i da deluje kao pro-antioksidant, u ovom istraživanju je fokus bio na njegovim efektima na antioksidativne enzime i ROS/redoks procese posredovane receptorima. Nakon ranijih istraživanja koja su pokazala da ibogain utiče na

metaboličke puteve povezane sa ATP i ROS (Paškulin i sar. 2006; Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2012; Nikolić-Kokić i sar. 2015; Oreščanin-Dušić i sar. 2018; Vidonja Uzelac i sar. 2019a; Vidonja Uzelac i sar. 2019b; Vidonja Uzelac 2019), u ovom eksperimentu smo ponovo pokazali da njegova primena značajno povećava aktivnost antioksidativnih enzima u relativno kratkom vremenskom periodu. Naime, ATP se vezuje za P2Y2 receptore i tako aktivira DUOX1-zavisnu proizvodnju H₂O₂ koji dalje aktivira ATP-zavisnu ćelijsku signalizaciju (Hristova i sar. 2014). Ranije je pokazano da ibogain deluje delimično preko purinergičkih signalnih puteva (Munday i sar. 2000) ali u to vreme nije bio poznat uticaj ibogaina na metabolizam ATP. Sa druge strane, adrenergički receptori su povezani sa ROS signalizacijom putem aktiviranja Nox i proizvodnje O₂^{•-} (Xu i sar. 2011; Di Lisa i sar. 2011). Blokada β-adrenergičke signalizacije propranololom verovatno je smanjila signalnu ulogu proizvodnje H₂O₂ i sprečila kompenzatorno povećanje aktivnosti CAT i GSH-Px. Osim toga, postoji sprema mitohondrijskih i citoplazmatičnih reaktivnih vrsta kiseonika i azota (poreklom od NADPH oksidaze) koja je regulisana K_{ATP} kanalima (Daiber 2010; Wenzel i sar. 2008). Blokiranje ovih kanala glibenklamidom je sprečilo porast nivoa H₂O₂ pa su i aktivnosti CAT i GSH-Px ostale na kontrolnom nivou. Aktivnost CAT je regulisana tirozin-kinaznim c-Alb/Arg signalnim putem koji favorizuje fosforilaciju CAT i povećanje njene aktivnosti prilikom porasta koncentracije H₂O₂ do određenog nivoa (Cao i sar. 2003). Koordinisana ekspresija i/ili nishodna regulacija CAT u peroksizomima i GSH-Px u citoplazmi su izgleda pod kontrolom FoxO regulatornih elemenata (Klotz i sar. 2015). Ovo ukazuje da su primenjeni pretretmani sprečili porast koncentracije H₂O₂ u više ćelijskih odeljaka istovremeno. Dakle pretretmani bilo propranololom ili glibenklamidom, odnosno blokada različitih receptora pre dodavanja ibogaina, smanjila je proizvodnju H₂O₂ i aktivnosti CAT i GSH-Px su ostale na kontrolnom nivou. Poznato je da endogeni agonisti β-adrenergičkih receptora deluju kao otvarači K_{ATP} kanala, pa bi to moglo da bude jedno od objašnjenja uočene pojave, odnosno moguće je da se u ovom slučaju blokadom β-adrenergičkih receptora smanjuje provodljivosti K_{ATP} kanala. Prikazani rezultati ukazuju da se pro-antioksidativno dejstvo ibogaina postiže ćelijskim ROS procesima koji uključuju K_{ATP} kanale, kao i adrenergičku/purinergičku/Nox signalizaciju. Šta više, visoke potrebe za energijom nakon pražnjenja rezervi ATP izazvanih ibogainom pokreću intenzivno ćelijsko disanje u mitohondrijama koji uključuju kontrolu membranskog potencijala, jonsku izmenu i Ca²⁺ regulisane procese u kojima mitohondrijski K_{ATP} kanali igraju značajnu ulogu omogućavajući uspostavljanje optimalnog nivoa ATP. ROS (O₂^{•-} i H₂O₂) su sastavni deo tih procesa. Ibogain izaziva značajne poremećaje nivoa ATP i ROS koji su praćeni regulisanjem aktivnosti antioksidativnih enzima što za uzvrat reguliše dinamiku ROS u smeru optimalne redoks/H₂O₂ signalizacije i zaštite od oksidativnih oštećenja. Promene u antioksidativnoj zaštiti ukazuju da ibogain narušava energetska, redoks i ROS homeostazu u ćelijama što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Paškulin i sar. 2010; Paškulin i sar. 2012; Oreščanin-Dušić i sar. 2018). U oba režima kontraktilne aktivnosti uterusa koji su ovde ispitivani (pri nižoj i višoj koncentraciji Ca²⁺) aktivnost SOD1 je bila smanjena nakon 2 sata, a aktivnost GSH-Px povećana nakon 4 sata, što ukazuje na povećanu koncentraciju H₂O₂ u ćelijama. Poznato je da H₂O₂ inhibira SOD1 i tako smanjuje sopstvenu proizvodnju (Hodgson i Fridovich 1975; Mavelli i sar. 1983). Povećana aktivnost GSH-Px mogla bi biti posledica povećane koncentracije H₂O₂. Sa druge strane, nizak nivo NADPH u ćelijama pogoduje smanjenju aktivnosti GR (Deponte 2013). Niska aktivnost GR 4 sata nakon izlaganja ibogainu mogla bi da bude upravo posledica smanjene koncentracije NADPH koji se pojačano troši za uspostavljanje optimalnog nivoa ATP. Moguće je da su pretretmani propranololom i glibenklamidom sprečili ove procese i tako sprečili značajne promene aktivnosti antioksidativnih enzima što ukazuje na značajnu ulogu β-adrenergičkih receptora i K_{ATP} kanala u regulaciji ROS homeostaze i delovanja ibogaina.

Rezultati ovog *ex vivo* istraživanja na modelu izolovanog uterusa pacova pokazuju da su β-adrenergički receptori kao i K_{ATP} kanali uključeni u pro-antioksidativno dejstvo ibogaina (Slika 31). Primenom ibogaina kao pro-antioksidativnog agensa u ovom eksperimentu su pokazani neki

mehanizmi ćelijskih procesa posredovanih reaktivnim vrstama kiseonika i regulacije aktivnosti antioksidativnih enzima, koji potencialno imaju širi značaj, nezavisno od ibogaina.



Slika 31. Šematski prikaz pretpostavljene uloge β-adrenergičkih receptora i K_{ATP} kanala u pro-antioksidativnom delovanju ibogaina.

6. ZAKLJUČCI

1) Koncentracije ibogaina i njegovog primarnog metabolita noribogaina u krvnoj plazmi ženki pacova nakon jednokratnog *per os* tretmana ibogainom:

- Koncentracije ibogaina i noribogaina u plazmi su u skladu sa literaturnim podacima o farmakokinetici ibogaina. Ibogain u plazmi relativno brzo biva zamenjen svojim primarnim metabolitom noribogainom koji se eliminiše znatno sporije.

2) Efekti ibogaina na energetske metabolizam, enzimski sistem antioksidativne zaštite i pokazatelje oksidativnih oštećenja u različitim tkivima ženki pacova nakon jednokratnog *per os* tretmana:

- Ibogain u dozama od 1mg/kg i 20mg/kg uzrokuje promene u metabolizmu glukoze, ali rezerve glukoze nisu značajno narušene 6 i 24 sata nakon ingestije.
- Ibogain u različitim tkivima u manjoj ili većoj meri narušava redoks homeostazu, a odgovor sistema antioksidativne zaštite je izrazito tkivno specifičan. Efekte ibogaina na aktivnost antioksidativnih enzima ne odlikuje jasna zavisnost od doze ili trajanja tretmana.
- Faza estrusnog ciklusa (estrus ili metestrus) u trenutku tretmana je značajno uticala na efekte ibogaina na neke od merenih antioksidativnih parametara u različitim tkivima.

3) Efekti ibogaina na histomorfologiju jetre, bubrega i srca ženki pacova nakon jednokratnog *per os* tretmana:

- Histopatološke promene u jetri i bubrezima su relativno niskog intenziteta i mogu biti reverzibilne;
- Ibogain u srcu izaziva akutnu nekrozu kardiomiocita bez pridružene inflamacije. Efekat ibogaina je zavisan od doze, odnosno veća doza dovodi do izražene nekroze. Uočene lezije mogle bi da dovedu do potencijalno fatalnih aritmija.

4) Vazoaktivni efekti ibogaina na izolovane krvne sudove pacova:

- Ibogain ima relaksantno dejstvo na prekontrahovanu izolovanu aortu i mezenteričnu arteriju pacova, koje se ostvaruje posredstvom regulacije funkcije endotela, kao i direktnim delovanjem na glatke mišićne ćelije;
- Uočeno smanjenje tonusa izolovanih arterija se odlikuje vremenskom dinamikom koja ukazuje na moguću ulogu redoks signalizacije.

5) Mehanizmi uticaja ibogaina na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusu pacova:

- Ibogain svoje neposredne farmakološke efekte na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusu ostvaruje interakcijom sa receptorima za koje deli relativno visok afinitet sa ketanserinom, a to su na prvom mestu 5-HT receptori, naročito 5-HT₂.

6) Mehanizmi uticaja ibogaina na enzimski sistem antioksidativne zaštite u izolovanom uterusu pacova:

- Ibogain dovodi do promena u redoks ravnoteži i aktivnosti antioksidativnih enzima u izolovanom uterusu pacova putevima koji ne uključuju receptore za koje deli visok afinitet sa ketanserinom;
- ROS/redoks procesi koje pokreće ibogain posredovani su β -adrenergičkim receptorima i K_{ATP} kanalima. Njihovom blokadom/inhibicijom sprečava se povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima.

7) Opšti zaključci:

- Rezultati ove disertacije ukazuju na važnost zastupljenosti jedinki oba pola u predkliničkim i kliničkim ispitivanjima zbog polnih razlika u biološkoj raspoloživosti ibogaina i noribogaina, metaboličkim efektima, kao i hepato-, renalnoj i kardiotoksičnosti, koji bi mogli potencijalno da utiču na ishod terapije i/ili neželjena dejstva. Naime, u primenjenom eksperimentalnom modelu, ibogain i njegov primarni metabolit noribogain su u većoj koncentraciji prisutni u sistemskoj cirkulaciji ženki, odnosno biološka raspoloživost ibogaina kod ženki je oko 2-3 puta veća nego kod mužjaka. Glikogenolitički potencijal ibogaina je kod ženki ispoljen u manjoj meri nego kod mužjaka, dok su hepatotoksičnost i renalna toksičnost relativno niskog intenziteta ali nešto izraženije kod ženki nego kod mužjaka.
- Ibogain u srcu izaziva akutnu nekrozu kardiomiocita koja bi mogla da bude uzrok potencijalno fatalnih aritmija.
- Najvažniju ulogu u efektima ibogaina na kontraktilnu aktivnost glatkih mišićnih ćelija miometrijuma imaju 5-HT receptori. Sa druge strane, efekti ibogaina na redoks procese u izolovanom uterusu se ostvaruju preko signalnih puteva i efektorskih mehanizama koji su povezani sa β -adrenergičkim receptorima i K_{ATP} kanalima, koji imaju važnu ulogu u regulaciji količine ROS i porastu aktivnosti AOS.

7. LITERATURA

- Abdulle AE, Bourgonje AR, Kieneker LM, et al. Serum free thiols predict cardiovascular events and all-cause mortality in the general population: a prospective cohort study. *BMC Med.* 2020;18(1):130. Published 2020 May 27. doi:10.1186/s12916-020-01587-w
- Aćimović T, Atanasijević T, Denić K, Lukić V, Popović V, Bogdanović M. Death due to consumption of ibogaine: case report. *Forensic Sci Med Pathol.* 2021;17(1):126-129. doi:10.1007/s12024-020-00342-0
- Aguilar-Bryan L, Clement JP 4th, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J. Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol Rev.* 1998;78(1):227-245. doi:10.1152/physrev.1998.78.1.227
- Akopova OV. On the impact of K(ATP) channel opening on mitochondrial reactive oxygen species production. *Histol Cytol Embryol.* 2017;1(3):2-2. doi:10.15761/HCE.1000115
- Akrouh A, Halcomb SE, Nichols CG, Sala-Rabanal M. Molecular biology of K(ATP) channels and implications for health and disease. *IUBMB Life.* 2009;61(10):971-978. doi:10.1002/iub.246
- Alberici LC, Oliveira HC, Paim BA, et al. Mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels as redox signals to liver mitochondria in response to hypertriglyceridemia. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(10):1432-1439. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.013
- Ali SF, Newport GD, Slikker W Jr, Rothman RB, Baumann MH. Neuroendocrine and neurochemical effects of acute ibogaine administration: a time course evaluation. *Brain Res.* 1996;737(1-2):215-220. doi:10.1016/0006-8993(96)00734-2
- Alper KR, Lotsof HS, Frenken GM, Luciano DJ, Bastiaans J. Treatment of acute opioid withdrawal with ibogaine. *Am J Addict.* 1999;8(3):234-242. doi:10.1080/105504999305848
- Alper KR. Ibogaine: a review. *Alkaloids Chem Biol.* 2001;56:1-38. doi:10.1016/s0099-9598(01)56005-8
- Alper KR, Lotsof HS, Kaplan CD. The ibogaine medical subculture. *J Ethnopharmacol.* 2008;115(1):9-24. doi:10.1016/j.jep.2007.08.034
- Anantharaman-Barr HG, Decombaz J. The effect of wheel running and the estrous cycle on energy expenditure in female rats. *Physiol Behav.* 1989;46(2):259-263. doi:10.1016/0031-9384(89)90265-5
- Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD. Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(5):H2067-H2074. doi:10.1152/ajpheart.00272.2006
- Antonio T, Childers SR, Rothman RB, et al. Effect of Iboga alkaloids on μ -opioid receptor-coupled G protein activation. *PLoS One.* 2013;8(10):e77262. Published 2013 Oct 16. doi:10.1371/journal.pone.0077262
- Aoyama K, Nakaki T. Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules.* 2015;20(5):8742-8758. Published 2015 May 14. doi:10.3390/molecules20058742
- Appiah I, Milovanovic S, Radojicic R, et al. Hydrogen peroxide affects contractile activity and antioxidant enzymes in rat uterus. *Br J Pharmacol.* 2009;158(8):1932-1941. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00490.x
- Appiah I. Uticaj vodonik peroksida na kontraktilnu aktivnost izolovanog uterusu pacova i aktivnost endogenog antioksidativnog sistem. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2011.

- Appiah I, Nikolic-Kokic A, Orescanin-Dusic Z, et al. Reversible oxidation of myometrial voltage-gated potassium channels with hydrogen peroxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:105820. doi:10.1155/2012/105820
- Arnal JF, Fontaine C, Billon-Galés A, et al. Estrogen receptors and endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(8):1506-1512. doi:10.1161/ATVBAHA.109.191221
- Ashcroft FM. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2047-2058. doi:10.1172/JCI25495
- Atkinson HJ, Babbitt PC. Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry*. 2009;48(46):11108-11116. doi:10.1021/bi901180v
- Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J*. 2011;434(2):201-210. doi:10.1042/BJ20101695
- Aziz Q, Li Y, Tinker A. Endothelial biology and ATP-sensitive potassium channels. *Channels (Austin)*. 2018;12(1):45-46. doi:10.1080/19336950.2017.1412151
- Babou Kammoe RB, Kauffenstein G, Pelletier J, Robaye B, Sévigny J. NTPDase1 Modulates Smooth Muscle Contraction in Mice Bladder by Regulating Nucleotide Receptor Activation Distinctly in Male and Female. *Biomolecules*. 2021;11(2):147. doi:10.3390/biom11020147
- Badio B, Padgett WL, Daly JW. Ibogaine: a potent noncompetitive blocker of ganglionic/neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*. 1997;51(1):1-5. doi:10.1124/mol.51.1.1
- Banne AF, Amiri A, Pero RW. Reduced level of serum thiols in patients with a diagnosis of active disease. *J Anti Aging Med*. 2003;6(4):327-334. doi:10.1089/109454503323028920
- Barnes PJ. Beta-adrenoceptors on smooth muscle, nerves and inflammatory cells. *Life Sci*. 1993;52(26):2101-2109. doi:10.1016/0024-3205(93)90725-i
- Baumann MH, Rothman RB, Ali SF. Neurochemical and neuroendocrine effects of ibogaine in rats: comparison to MK-801. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;844:252-264.
- Baumann MH, Rothman RB, Ali SF. Comparative neurobiological effects of ibogaine and MK-801 in rats. *Drug Alcohol Depend*. 2000;59(2):143-151. doi:10.1016/s0376-8716(99)00113-1
- Baumann MH, Pablo J, Ali SF, Rothman RB, Mash DC. Comparative neuropharmacology of ibogaine and its O-desmethyl metabolite, noribogaine. *Alkaloids Chem Biol*. 2001;56:79-113. doi:10.1016/s0099-9598(01)56009-5
- Benwell ME, Holtom PE, Moran RJ, Balfour DJ. Neurochemical and behavioural interactions between ibogaine and nicotine in the rat. *Br J Pharmacol*. 1996;117(4):743-749. doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15253.x
- Bergfeld GR, Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res*. 1992;26(1):40-47. doi:10.1093/cvr/26.1.40
- Beutler E. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods, 3rd edition, *Grune and Stratton*, New York, NY, USA, 1982.
- Blagojević D. Redox regulation: from redox congeners to a systemic molecular physiology approach. In: FEBS3+ Meeting "Molecules of Life" and 11th Meeting of the Slovenian Biochemical Society, Portorož, Slovenia, September 16th-19th 2015. Book of Abstracts: L8, pp. 54, ISBN 978-961-93879-1-7
- Bocher DPM, Naranjo C. (1969) Nouveau médicament agissant au niveau du système nerveux central utilisable dans les traitements psychothérapeutiques et comme antidrogue [A New CNS-active Medication for Use Against Drugs]. Bulletin Officiel de la Propriété Industrielle, No. 35 (Special Drug Patent P.V. No. 138.081, No. 7131M, Int. Class. A 61k)
- Bolt HM. Human GSH-Transferase in Risk Assessment. Editor(s): Snyder R. et al. Biological Reactive Intermediates V. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1996, vol 387, *Springer*. doi:10.1007/978-1-4757-9480-9_49

- Bolton TB, Large WA. Are junction potentials essential? Dual mechanism of smooth muscle cell activation by transmitter released from autonomic nerves. *Q J Exp Physiol*. 1986;71(1):1-28. doi:10.1113/expphysiol.1986.sp002960
- Borgusz MJ, Althoff H, Mash DC, Hearn WL. Ibogaine-associated death in a female heroin addict: forensic and toxicological aspects. In: Presented at the Annual Meeting of the Society of Forensic Toxicologists, Albuquerque, NM, October 8. 1998. Abstract 85 (kako je preneto u: Corkery JM. Ibogaine as a treatment for substance misuse: Potential benefits and practical dangers. *Prog Brain Res*. 2018;242:217-257. doi:10.1016/bs.pbr.2018.08.005)
- Bortolotti M, Polito L, Battelli MG, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks. *Redox Biol*. 2021;41:101882. doi:10.1016/j.redox.2021.101882
- Bottari SP, Vokaer A, Kaivez E, Lescrainier JP, Vauquelin G. Regulation of alpha- and beta-adrenergic receptor subclasses by gonadal steroids in human myometrium. *Acta Physiol Hung*. 1985;65(3):335-346.
- Brandstetter Y, Kaplanski J, Leibson V, Ben-Zvi Z. The effects of estrus cycle on drug metabolism in the rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1986;11(4):251-254. doi:10.1007/BF03189109
- Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):951-965. doi:10.1016/s0891-5849(99)00173-2
- Brown TK. Ibogaine in the treatment of substance dependence. *Curr Drug Abuse Rev*. 2013;6(1):3-16. doi:10.2174/15672050113109990001
- Bulling S, Schicker K, Zhang YW, et al. The mechanistic basis for noncompetitive ibogaine inhibition of serotonin and dopamine transporters. *J Biol Chem*. 2012;287(22):18524-18534. doi:10.1074/jbc.M112.343681
- Burgoyne JR, Madhani M, Cuello F, et al. Cysteine redox sensor in PKGIa enables oxidant-induced activation. *Science*. 2007;317(5843):1393-1397. doi:10.1126/science.1144318
- Bylund DB. Alpha- and beta-adrenergic receptors: Ahlquist's landmark hypothesis of a single mediator with two receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(6):E1479-E1481. doi:10.1152/ajpendo.00664.2007
- Campos-Bedolla P, Vargas MH, Segura P, et al. Airway smooth muscle relaxation induced by 5-HT(2A) receptors: role of Na(+)/K(+)-ATPase pump and Ca(2+)-activated K(+) channels. *Life Sci*. 2008;83(11-12):438-446. doi:10.1016/j.lfs.2008.07.006
- Cao C, Leng Y, Kufe D. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *J Biol Chem*. 2003;278(32):29667-29675. doi:10.1074/jbc.M301292200
- Carroll RG. Chapter 5 - Musculoskeletal System, Editor(s): Carroll RG., Elsevier's Integrated Physiology, *Mosby*, 2007, Pages 43-55, ISBN 9780323043182. doi:10.1016/B978-0-323-04318-2.50011-X
- Cardoso LA, Ferreira ST, Hermes-Lima M. Reductive inactivation of yeast glutathione reductase by Fe(II) and NADPH. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008;151(3):313-321. doi:10.1016/j.cbpa.2007.03.025
- Chandy KG, Gutman GA. Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci*. 1993;14(12):434. doi:10.1016/0165-6147(93)90181-i
- Chu H, Puchulu-Campanella E, Galan JA, Tao WA, Low PS, Hoffman JF. Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(31):12794-12799. doi:10.1073/pnas.1209014109
- Coleman JA, Yang D, Zhao Z, et al. Serotonin transporter-ibogaine complexes illuminate mechanisms of inhibition and transport. *Nature*. 2019;569(7754):141-145. doi:10.1038/s41586-019-1135-1

- Collier R, Noronha G, Romano C. Serotonin 5-HT_{1A} Receptor Agonists in Oxidative Stress and Retinal Disease. Editor(s): Stratton, R., Hauswirth, W., Gardner, T. Studies on Retinal and Choroidal Disorders. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, *Humana Press*, 2012. doi:10.1007/978-1-61779-606-7_22
- Cordeaux Y, Pasupathy D, Bacon J, Charnock-Jones DS, Smith GC. Characterization of serotonin receptors in pregnant human myometrium. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(3):682-691. doi:10.1124/jpet.108.143040
- Corkery JM. Ibogaine as a treatment for substance misuse: Potential benefits and practical dangers. *Prog Brain Res*. 2018;242:217-257. doi:10.1016/bs.pbr.2018.08.005
- Cortese-Krott MM, Koning A, Kuhnle GGC, et al. The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine. *Antioxid Redox Signal*. 2017;27(10):684-712. doi:10.1089/ars.2017.7083
- Craig TJ, Ashcroft FM, Proks P. How ATP inhibits the open K(ATP) channel. *J Gen Physiol*. 2008;132(1):131-144. doi:10.1085/jgp.200709874
- Csordás G, Renken C, Várnai P, et al. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*. 2006;174(7):915-921. doi:10.1083/jcb.200604016
- Curley M, Cairns MT, Friel AM, McMeel OM, Morrison JJ, Smith TJ. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(10):941-945. doi:10.1093/molehr/8.10.941
- Da Costa Guevara D, Trejo E. 5-HT_{2A}, 5-HT_{1B/D}, 5HT₃ and 5-HT₇ receptors as mediators of serotonin-induced direct contractile response of bovine airway smooth muscle. *J Smooth Muscle Res*. 2021;57(0):79-93. doi:10.1540/jsmr.57.79
- Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6-7):897-906. doi:10.1016/j.bbabi.2010.01.032
- D'Almeida V, Hipólido DC, da Silva-Fernandes ME. Lack of sex and estrous cycle effects on the activity of three antioxidant enzymes in rats. *Physiol Behav*. 1995;57(2):385-387. doi:10.1016/0031-9384(94)00234-v
- Denysenko N, Yemelyanenko V, Fomenko I, Sklyarov A. Nitroso-oxidative stress after activation of 5-HT₄ receptors under conditions of colitis in rats. *Curr Issues in Pharm Med Sci*. 2019;32:57-62. doi:10.2478/cipms-2019-0011
- Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3217-3266. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.018
- Dhar-Chowdhury P, Malester B, Rajacic P, Coetzee WA. The regulation of ion channels and transporters by glycolytically derived ATP. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(23):3069-3083. doi:10.1007/s00018-007-7332-3
- Di Lisa F, Kaludercic N, Paolocci N. β_2 -Adrenoceptors, NADPH oxidase, ROS and p38 MAPK: another 'radical' road to heart failure?. *Br J Pharmacol*. 2011;162(5):1009-1011. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01130.x
- Drabkin D, Austin J. Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells: Nitric oxide haemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem*. 1935;112: 51-55. doi:10.1016/S0021-9258(18)74965-X

- Drakul D. Značaj kalijumskih kanala i antioksidativnog sistema u efektima pinacidila i magnezijum sulfata na izolovanim humanim umbilikalnim krvnim sudovima. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Foča, Univerzitet u Istočnom Sarajevu, 2018.
- Dutheil F, Dauchy S, Diry M, et al. Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(7):1528-1538. doi:10.1124/dmd.109.027011
- Donnelly JR. The need for ibogaine in drug and alcohol addiction treatment. *J Leg Med.* 2011;32(1):93-114. doi:10.1080/01947648.2011.550832
- Downing SJ, Porter DG, Redstone CD. Myometrial activity in rats during the oestrous cycle and pseudopregnancy: interaction of oestradiol and progesterone. *J Physiol.* 1981;317:425-433. doi:10.1113/jphysiol.1981.sp013834
- Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(10):1351-1371. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.011
- Eduard LA, Golubev YY, Puzikov AM. Serotonin Receptors Mediate Contractile Activity of Rat's Esophagus in-vivo. *Arch Organ Transplant.* 2017;019-022. doi:10.17352/aot.000007
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6
- Ellsworth ML, Ellis CG, Goldman D, Stephenson AH, Dietrich HH, Sprague RS. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology (Bethesda).* 2009;24:107-116. doi:10.1152/physiol.00038.2008
- Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(7):1039-1048. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.001
- Fang XL, Shu G, Yu JJ, et al. The anorexigenic effect of serotonin is mediated by the generation of NADPH oxidase-dependent ROS. *PLoS One.* 2013;8(1):e53142. doi:10.1371/journal.pone.0053142
- Feher J. Chapter 3.8 - Smooth Muscle, Editor(s): Feher J., Quantitative Human Physiology (2nd edition), *Academic Press*, 2017, Pages 351-361, ISBN 9780128008836. doi:10.1016/B978-0-12-800883-6.00032-X
- Fernandez JW. *Bwiti: An ethnography of the religious imagination in Africa.* Princeton, NJ: Princeton University Press, 1982, ISBN: 9780691101224
- Fernandez JW, Fernandez RL. "Returning to the path": the use of iboga[ine] in an equatorial African ritual context and the binding of time, space, and social relationships. *Alkaloids Chem Biol.* 2001;56:235-247. doi:10.1016/s0099-9598(01)56017-4
- Fernhoff NB, Derbyshire ER, Marletta MA. A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(51):21602-21607. doi:10.1073/pnas.0911083106
- Filipovic DM, Reeves WB. Hydrogen peroxide activates glibenclamide-sensitive K⁺ channels in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol.* 1997;272(2 Pt 1):C737-C743. doi:10.1152/ajpcell.1997.272.2.C737
- Flohé L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3139-3142. doi:10.1016/j.bbagen.2012.10.020
- Foerster EC, Fahrenkemper T, Rabe U, Graf P, Sies H. Peroxisomal fatty acid oxidation as detected by H₂O₂ production in intact perfused rat liver. *Biochem J.* 1981;196(3):705-712. doi:10.1042/bj1960705

- Forman HJ, Fridovich I. Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Arch Biochem Biophys.* 1973;158(1):396-400. doi:10.1016/0003-9861(73)90636-x
- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978;201(4359):875-880. doi:10.1126/science.210504
- Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1986;58:61-97. doi:10.1002/9780470123041.ch2
- Friederich-Persson M, Nguyen Dinh Cat A, Persson P, Montezano AC, Touyz RM. Brown Adipose Tissue Regulates Small Artery Function Through NADPH Oxidase 4-Derived Hydrogen Peroxide and Redox-Sensitive Protein Kinase G-1 α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(3):455-465. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308659
- Fryer JD, Lukas RJ. Noncompetitive functional inhibition at diverse, human nicotinic acetylcholine receptor subtypes by bupropion, phencyclidine, and ibogaine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288(1):88-92.
- Gabashvili IS, Sokolowski BH, Morton CC, Giersch AB. Ion channel gene expression in the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2007;8(3):305-328. doi:10.1007/s10162-007-0082-y
- Gam CMBF, Larsen LH, Mortensen OH, et al. Unchanged mitochondrial phenotype, but accumulation of lipids in the myometrium in obese pregnant women. *J Physiol.* 2017;595(23):7109-7122. doi:10.1113/JP274838
- Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219(1):152-161. doi:10.1111/apha.12649
- Garlid KD, Beavis AD, Ratkje SK. On the nature of ion leaks in energy-transducing membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1989;976(2-3):109-120. doi:10.1016/s0005-2728(89)80219-1
- Garlid KD. Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol.* 2000;95(4):275-279. doi:10.1007/s003950070046
- Garlid KD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1606(1-3):23-41. doi:10.1016/s0005-2728(03)00108-7
- Garlid KD, Costa AD, Quinlan CL, Pierre SV, Dos Santos P. Cardioprotective signaling to mitochondria. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(6):858-866. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.11.019
- Garlid KD, Halestrap AP. The mitochondrial K(ATP) channel--fact or fiction?. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(3):578-583. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.12.011
- Gaston B. Nitric oxide and thiol groups. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411(2-3):323-333. doi:10.1016/s0005-2728(99)00023-7
- Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia.* 1974;30(6):665-667. doi:10.1007/BF01921531
- Glick SD, Maisonneuve IS. Mechanisms of antiaddictive actions of ibogaine. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;844:214-226.
- Glick SD, Maisonneuve IM, Szumlinski KK. Mechanisms of action of ibogaine: relevance to putative therapeutic effects and development of a safer iboga alkaloid congener. *Alkaloids Chem Biol.* 2001;56:39-53. doi:10.1016/s0099-9598(01)56006-x
- Glick SD, Maisonneuve IM, Kitchen BA, Fleck MW. Antagonism of alpha 3 beta 4 nicotinic receptors as a strategy to reduce opioid and stimulant self-administration. *Eur J Pharmacol.* 2002;438(1-2):99-105. doi:10.1016/s0014-2999(02)01284-0
- Global ibogaine therapy alliance. Clinical Guidelines for Ibogaine-Assisted Detoxification. 1st edition, Version 1.1. Available online: <https://ibogaineguidelines.com/> (pristupljeno: 1.11.2023.)

- Glue P, Winter H, Garbe K, et al. Influence of CYP2D6 activity on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single 20 mg dose of ibogaine in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2015;55(6):680-687. doi:10.1002/jcph.471
- Glue P, Cape G, Tunnicliff D, et al. Ascending Single-Dose, Double-Blind, Placebo-Controlled Safety Study of Noribogaine in Opioid-Dependent Patients. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2016;5(6):460-468. doi:10.1002/cpdd.254
- Glusa E, Roos A. Endothelial 5-HT receptors mediate relaxation of porcine pulmonary arteries in response to ergotamine and dihydroergotamine. *Br J Pharmacol.* 1996;119(2):330-334. doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb15990.x
- Glusa E, Pertz HH. Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT(2B) receptors. *Br J Pharmacol.* 2000;130(3):692-698. doi:10.1038/sj.bjp.0703341
- Go YM, Jones DP. Thiol/disulfide redox states in signaling and sensing. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013;48(2):173-181. doi:10.3109/10409238.2013.764840
- Gómez-Zubeldia MA, Corrales S, Arbués J, Nogales AG, Millán JC. Influence of estradiol and gestagens on oxidative stress in the rat uterus. *Gynecol Oncol.* 2002;86(3):250-258. doi:10.1006/gyno.2002.6753
- González J, Prieto JP, Rodríguez P, et al. Ibogaine Acute Administration in Rats Promotes Wakefulness, Long-Lasting REM Sleep Suppression, and a Distinctive Motor Profile. *Front Pharmacol.* 2018;9:374. Published 2018 Apr 27. doi:10.3389/fphar.2018.00374
- González-Alonso J, Olsen DB, Saltin B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP [published correction appears in *Circ Res.* 2003 Apr 29;92(6):61e]. *Circ Res.* 2002;91(11):1046-1055. doi:10.1161/01.res.0000044939.73286.e2
- Gopisankar MG. CYP2D6 pharmacogenomics. *Egypt J Med Hum Genet.* 2017;18(4):309-313. doi:10.1016/j.ejmhg.2017.03.001
- Goutarel R, Gollnhofer O, Sillans R. Pharmacodynamics and therapeutic applications of iboga and ibogaine. *Psychedelic Monographs and Essays.* 1993;6:70-111.
- Gravina FS, Parkington HC, Kerr KP, et al. Role of mitochondria in contraction and pacemaking in the mouse uterus. *Br J Pharmacol.* 2010;161(6):1375-1390. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00949.x
- Gresch PJ. Serotonin Receptor Signaling. Editor(s): William J. Lennarz, M. Daniel Lane, Encyclopedia of Biological Chemistry (2nd edition), *Academic Press*, 2013, Pages 224-228, ISBN 9780123786319. doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00340-6
- Gupta P. An endothelial 5-HT receptor that mediates relaxation in guinea-pig isolated jugular vein resembles the 5-HT1D subtype. *Br J Pharmacol.* 1992;106(3):703-709. doi:10.1111/j.1476-5381.1992.tb14398.x
- Guševac Stojanović I. Regionalno specifičan neuroprotektivan efekat progesterona u modelu hipoperfuzije mozga pacova. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2020. <https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/17513>
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-7139.
- Hafen BB, Burns B. Physiology, Smooth Muscle. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 14, 2023.

- Halestrap AP. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1989;973(3):355-382. doi:10.1016/s0005-2728(89)80378-0
- Hall JE, Hall ME. Guyton and Hall textbook of medical physiology (14th edition) *Elsevier Inc.*, 2020, Hardback, ISBN 9780323597128, 9780323640039
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine (5th edition) Oxford, 2015; online edition, *Oxford Academic*, 22 Oct. 2015. doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231-255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776
- Hansen RE, Roth D, Winther JR. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(2):422-427. doi:10.1073/pnas.0812149106
- Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30(6):445-600. doi:10.3109/10409239509083491
- Haynes MP, Sinha D, Russell KS, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res*. 2000;87(8):677-682. doi:10.1161/01.res.87.8.677
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857
- Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(2):531-554. doi:10.1164/ajrccm/140.2.531
- Helsley S, Fiorella D, Rabin RA, Winter JC. Behavioral and biochemical evidence for a nonessential 5-HT_{2A} component of the ibogaine-induced discriminative stimulus. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998;59(2):419-425. doi:10.1016/s0091-3057(97)00451-6
- Henriquez M, Fonseca M, Perez-Zoghbi JF. Purinergic receptor stimulation induces calcium oscillations and smooth muscle contraction in small pulmonary veins. *J Physiol*. 2018;596(13):2491-2506. doi:10.1113/JP274731
- Hinkle E, Wiersma W, Jurs G. Applied statistics for behavioral sciences, 5th Edition, *Houghton Mifflin Company*, Boston, MA, USA, 2002.
- Hinton JM, Hill P, Jeremy J, Garland C. Signalling pathways activated by 5-HT(1B)/5-HT(1D) receptors in native smooth muscle and primary cultures of rabbit renal artery smooth muscle cells. *J Vasc Res*. 2000;37(6):457-468. doi:10.1159/000054078
- Hodgson EK, Fridovich I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry*. 1975;14(24):5299-5303. doi:10.1021/bi00695a011
- Hoelen DW, Spiering W, Valk GD. Long-QT syndrome induced by the antiaddiction drug ibogaine. *N Engl J Med*. 2009;360(3):308-309. doi:10.1056/NEJMc0804248
- Hong SH, Kyeong KS, Kim CH, et al. Regulation of myometrial contraction by ATP-sensitive potassium (KATP) channel via activation of SUR2B and Kir 6.2 in mouse. *J Vet Med Sci*. 2016;78(7):1153-1159. doi:10.1292/jvms.15-0700
- Hood KY, Mair KM, Harvey AP, Montezano AC, Touyz RM, MacLean MR. Serotonin Signaling Through the 5-HT_{1B} Receptor and NADPH Oxidase 1 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(7):1361-1370. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308929

- Hough LB, Pearl SM, Glick SD. Tissue distribution of ibogaine after intraperitoneal and subcutaneous administration. *Life Sci.* 1996;58(7):PL119-PL122. doi:10.1016/0024-3205(95)02322-4
- Hoyer D. 5-Hydroxytryptamine Receptors. Editor(s): S.J. Enna, David B, Bylund. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Elsevier, 2007; Pages 1-7, ISBN 9780080552323. doi:10.1016/B978-008055232-3.60122-9
- Hristova M, Veith C, Habibovic A, Lam YW, Deng B, Geiszt M, Janssen-Heininger YM, van der Vliet A. Identification of DUOX1-dependent redox signaling through protein S-glutathionylation in airway epithelial cells. *Redox Biol.* 2014;2:436–446
- Huang Z, Xie N, Illes P, et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):162. Published 2021 Apr 28. doi:10.1038/s41392-021-00553-z
- Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem.* 2005;80(2):79-87. doi:10.1080/10520290500138422
- Ikumi Y, Shiroto T, Godo S, et al. Important Roles of Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Coronary Microcirculation and Cardiac Diastolic Function in Mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2020;75(1):31-40. doi:10.1097/FJC.0000000000000763
- Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:395-418. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090938
- Inagaki N, Gonoi T, Clement JP 4th, et al. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science.* 1995;270(5239):1166-1170. doi:10.1126/science.270.5239.1166
- Ishikawa M, Fuchs AR. Electrical and mechanical activity of rat uterus in vivo during the estrous cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 1978;132(6):611-619. doi:10.1016/0002-9378(78)90852-9
- Isomoto S, Kurachi Y. Function, regulation, pharmacology, and molecular structure of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1997;8(12):1431-1446. doi:10.1111/j.1540-8167.1997.tb01040.x
- Ivanova H, Vervliet T, Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, Bultynck G. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(10):2164-2183. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.03.007
- Jaimes L, Vinet R, Knox M, et al. A Review of the Actions of Endogenous and Exogenous Vasoactive Substances during the Estrous Cycle and Pregnancy in Rats. *Animals (Basel).* 2019;9(6):288. Published 2019 May 29. doi:10.3390/ani9060288
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515-540. doi:10.1016/0891-5849(90)90131-2
- Janssen P, Prins NH, Meulemans AL, Lefebvre RA. Smooth muscle 5-HT_{2A} receptors mediating contraction of porcine isolated proximal stomach strips. *Br J Pharmacol.* 2002;137(8):1217-1224. doi:10.1038/sj.bjp.0704992
- Jeffcoat R, Cook C, Hill J, Coleman D, Pollack G. Disposition of [3H] ibogaine in the rat. In: NIDA Research Monograph Series, Editor(s): Harris L-S, National Institute on Drug Abuse: Rockville, MD, USA, 1994;141:309. <https://archives.drugabuse.gov/sites/default/files/monograph141.pdf> (pristupljeno: 1.11.2023.)

- Jovanović-Galović A. Antioksidativni sistem kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.): subćelijska distribucija i uloga antioksidanata u metamorfozi. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 1998.
- Katerji M, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1279250. Published 2019 Mar 12. doi:10.1155/2019/1279250
- Karlsson C, Bodelsson G, Bodelsson M, Stjernquist M. 5-Hydroxytryptamine contracts human uterine artery smooth muscle predominantly via 5-HT₂ receptors. *Hum Reprod*. 1997;12(2):361-367. doi:10.1093/humrep/12.2.361
- Kenakin T. Current Protocols in Pharmacology, Chapter 4.4. Isolated Blood Vessel Assays. *John Wiley & Sons, Inc*. 1998.
- Kenakin T. Current Protocols in Pharmacology, Chapter 4.0. Isolated Tissues. *John Wiley & Sons, Inc*, 2002.
- Kilanczyk E, Saraswat Ohri S, Whittemore SR, Hetman M. Antioxidant Protection of NADPH-Depleted Oligodendrocyte Precursor Cells Is Dependent on Supply of Reduced Glutathione. *ASN Neuro*. 2016;8(4):1759091416660404. Published 2016 Jul 21. doi:10.1177/1759091416660404
- Klotz LO, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H, Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol*. 2015;6:51-72. doi:10.1016/j.redox.2015.06.019
- Koenig X, Kovar M, Rubi L, et al. Anti-addiction drug ibogaine inhibits voltage-gated ionic currents: a study to assess the drug's cardiac ion channel profile. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;273(2):259-268. doi:10.1016/j.taap.2013.05.012
- Koenig X, Hilber K. The anti-addiction drug ibogaine and the heart: a delicate relation. *Molecules*. 2015;20(2):2208-2228. Published 2015 Jan 29. doi:10.3390/molecules20022208
- Koh SD, Bradley KK, Rae MG, Keef KD, Horowitz B, Sanders KM. Basal activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cell. *Biophys J*. 1998;75(4):1793-1800. doi:10.1016/S0006-3495(98)77621-0
- Koning AM, Meijers WC, Pasch A, et al. Serum free thiols in chronic heart failure. *Pharmacol Res*. 2016;111:452-458. doi:10.1016/j.phrs.2016.06.027
- Kontrimavičiūtė V, Mathieu O, Mathieu-Daudé JC, et al. Distribution of ibogaine and noribogaine in a man following a poisoning involving root bark of the *Tabernanthe iboga* shrub. *J Anal Toxicol*. 2006;30(7):434-440. doi:10.1093/jat/30.7.434
- Koželj, G. Razvoj analizne metode za določanje alkaloidov v bioloških vzorcih. Doktorska disertacija, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2015.
- Krenz M, Oldenburg O, Wimpee H, et al. Opening of ATP-sensitive potassium channels causes generation of free radicals in vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*. 2002;97(5):365-373. doi:10.1007/s003950200045
- Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4411. Published 2019 Sep 7. doi:10.3390/ijms20184411
- Kubiliene A, Sveikata A, Zevzikovas A, Sadauskiene I, Ivanov L. Investigation into pharmacokinetic properties of active alkaloid ibogaine and its metabolite noribogaine. *Acta Poloniae Pharm - Drug Res*. 2017;74:1591-1597.
- Kwon TH, Jung H, Cho EJ, Jeong JH, Sohn UD. The Signaling Mechanism of Contraction Induced by ATP and UTP in Feline Esophageal Smooth Muscle Cells. *Mol Cells*. 2015;38(7):616-623. doi:10.14348/molcells.2015.2357

- Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.* 2010;17(9):1373-1380. doi:10.1038/cdd.2010.80
- Labuda J, Bowater R, Fojta M, et al. Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018). *Pure Appl Chem.* 2018;90(7):1121-1198. doi:org/10.1515/pac-2016-1120
- Larsen BT, Gutterman DD, Sato A, et al. Hydrogen peroxide inhibits cytochrome p450 epoxygenases: interaction between two endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 2008;102(1):59-67. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.159129
- Laskowski M, Augustynek B, Kulawiak B, et al. What do we not know about mitochondrial potassium channels?. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1857(8):1247-1257. doi:10.1016/j.bbabi.2016.03.007
- Lau RP, Fishbein MC. Chapter 12 - Toxins and the heart. Editor(s): Buja ML, Butany J. Cardiovascular Pathology, 5th edition, *Academic Press*, Cambridge, MA, USA, 2022 ISBN: 9780323912587.
- Leal MB, de Souza DO, Elisabetsky E. Long-lasting ibogaine protection against NMDA-induced convulsions in mice. *Neurochem Res.* 2000;25(8):1083-1087. doi:10.1023/a:1007665911622
- Leal MB, Michelin K, Souza DO, Elisabetsky E. Ibogaine attenuation of morphine withdrawal in mice: role of glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2003;27(5):781-785. doi:10.1016/S0278-5846(03)00109-X
- Lee CI, Liu X, Zweier JL. Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem.* 2000;275(13):9369-9376. doi:10.1074/jbc.275.13.9369
- Lee SY, Lee JY, Oh SJ, Kim HC, Kim SK. Expression of hepatic and ovarian antioxidant enzymes during estrous cycle in rats. *Toxicol Lett.* 2012;212(3):329-336. doi:10.1016/j.toxlet.2012.06.006
- Li L, Wu J, Jiang C. Differential expression of Kir6.1 and SUR2B mRNAs in the vasculature of various tissues in rats. *J Membr Biol.* 2003;196(1):61-69. doi:10.1007/s00232-003-0625-z
- Litjens RP, Brunt TM. How toxic is ibogaine?. *Clin Toxicol (Phila).* 2016;54(4):297-302. doi:10.3109/15563650.2016.1138226
- Liu HN, Ohya S, Nishizawa Y, et al. Serotonin augments gut pacemaker activity via 5-HT3 receptors. *PLoS One.* 2011;6(9):e24928. doi:10.1371/journal.pone.0024928
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275. doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
- Luna LG. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd edition, *McGraw-Hill*, New York, NY, USA, 1968.
- Lynch RM, Paul RJ. Compartmentation of carbohydrate metabolism in vascular smooth muscle: evidence for at least two functionally independent pools of glucose 6-phosphate. *Biochim Biophys Acta.* 1986;887(3):315-318. doi:10.1016/0167-4889(86)90159-x
- Ma D. Applications of yeast in drug discovery. *Prog Drug Res.* 2001;57:117-162. doi:10.1007/978-3-0348-8308-5_3
- Maas U, Strubelt S. Fatalities after taking ibogaine in addiction treatment could be related to sudden cardiac death caused by autonomic dysfunction. *Med Hypotheses.* 2006;67(4):960-964. doi: 10.1016/j.mehy.2006.02.050
- Mačiulaitis R, Kontrimaviciute V, Bressolle FM, Briedis V. Ibogaine, an anti-addictive drug: pharmacology and time to go further in development. A narrative review. *Hum Exp Toxicol.* 2008;27(3):181-194. doi:10.1177/0960327107087802

- Maguire MH, Satchell DG. Purinergic Receptors in Visceral Smooth Muscle. Editor(s): Burnstock, G. Purinergic Receptors, *Springer*, Dordrecht, 1981. doi:10.1007/978-94-009-5816-6_2
- Maillet EL, Milon N, Heghinian MD, et al. Noribogaine is a G-protein biased κ -opioid receptor agonist. *Neuropharmacology*. 2015;99:675-688. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.08.032
- Manivet P, Mouillet-Richard S, Callebert J, et al. PDZ-dependent activation of nitric-oxide synthases by the serotonin 2B receptor. *J Biol Chem*. 2000;275(13):9324-9331. doi:10.1074/jbc.275.13.9324
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62(4A):609-614. doi:10.1590/s1519-69842002000400008
- Mash DC, Staley JK, Pablo JP, Holohean AM, Hackman JC, Davidoff RA. Properties of ibogaine and its principal metabolite (12-hydroxyibogamine) at the MK-801 binding site of the NMDA receptor complex. *Neurosci Lett*. 1995;192(1):53-56. doi:10.1016/0304-3940(95)11608-y
- Mash DC, Kovera CA, Buck BE, et al. Medication development of ibogaine as a pharmacotherapy for drug dependence. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;844:274-292. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08242.x
- Mash DC, Kovera CA, Pablo J, et al. Ibogaine: complex pharmacokinetics, concerns for safety, and preliminary efficacy measures. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;914:394-401. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb05213.x
- Mash DC. IUPHAR - invited review - Ibogaine - A legacy within the current renaissance of psychedelic therapy. *Pharmacol Res*. 2023;190:106620. doi:10.1016/j.phrs.2022.106620
- Masoro EJ, Austad SN (Editors). In Handbooks of Aging, Handbook of the Biology of Aging (6th edition), *Academic Press*, 2006, ISBN 9780120883875. doi: 10.1016/B978-0-12-088387-5.X5000-6
- Matsuo K, Katsuragi T, Fujiki S, Sato C, Furukawa T. ATP release and contraction mediated by different P2-receptor subtypes in guinea-pig ileal smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1997;121(8):1744-1748. doi:10.1038/sj.bjp.0701329
- Mavelli I, Ciriolo MR, Rotilio G. Multiple electrophoretic variants of Cu, Zn superoxide dismutase as expression of the enzyme aging. Effects of H₂O₂, ascorbate and metal ions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;117(3):677-681. doi:10.1016/0006-291x(83)91650-9
- McCarron JG, Muir TC. Mitochondrial regulation of the cytosolic Ca²⁺ concentration and the InsP₃-sensitive Ca²⁺ store in guinea-pig colonic smooth muscle. *J Physiol*. 1999;516 (Pt 1)(Pt 1):149-161. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.149aa.x
- Meisner JA, Wilcox SR, Richards JB. Ibogaine-associated cardiac arrest and death: case report and review of the literature. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2016;6(2):95-98. doi:10.1177/2045125315626073
- Mijušković A. Mehanizmi relaksantnog efekta natrijum-sulfida na uterus pacova in vitro. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2015. <https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/5637>
- Miller LM, Gal A. Cardiovascular System and Lymphatic Vessels. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 2017;561-616.e1. doi:10.1016/B978-0-323-35775-3.00010-2
- Minosyan TY, Lu R, Eghbali M, Toro L, Stefani E. Increased 5-HT contractile response in late pregnant rat myometrium is associated with a higher density of 5-HT_{2A} receptors. *J Physiol*. 2007;581(Pt 1):91-97. doi:10.1113/jphysiol.2007.129726
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-3175. doi:10.1016/S0021-9258(19)45228-9

- Mitrović M. Uticaj apsorbovane doze zračenja na stepen oksidativnog stresa u organima kunića nakon kompjuterizovane tomografije obavljene upotrebom različitih parametara snimanja. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, 2018. <https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/10352>
- Miyoshi H, Yamaoka K, Urabe S, Kodama M, Kudo Y. Functional expression of purinergic P2X7 receptors in pregnant rat myometrium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(4):R1117-R1124. doi:10.1152/ajpregu.00507.2009
- Miyoshi H, Yamaoka K, Urabe S, Kudo Y. ATP-induced currents carried through P2X7 receptor in rat myometrial cells. *Reprod Sci*. 2012;19(12):1285-1291. doi:10.1177/1933719112450333
- Molderings GJ, Engel G, Roth E, Göthert M. Characterization of an endothelial 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor mediating relaxation of the porcine coronary artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1989;340(3):300-308. doi:10.1007/BF00168514
- Morrow JD, Roberts LJ 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(1):1-9. doi:10.1016/0006-2952(95)02072-1
- Munday MK, Blaylock NA, Mason R, Glick SD, Maisonneuve IM, Wilson VG. Pharmacological comparison of the effect of ibogaine and 18-methoxycoronaridine on isolated smooth muscle from the rat and guinea-pig. *Br J Pharmacol*. 2000;129(8):1561-1568. doi:10.1038/sj.bjp.0703227
- Mounkaïla B, Marthan R, Roux E. Biphasic effect of extracellular ATP on human and rat airways is due to multiple P2 purinoceptor activation. *Respir Res*. 2005;6(1):143. doi:10.1186/1465-9921-6-143
- Nappi F, Fiore A, Masiglat J, et al. Endothelium-Derived Relaxing Factors and Endothelial Function: A Systematic Review. *Biomedicines*. 2022;10(11):2884. Published 2022 Nov 10. doi:10.3390/biomedicines10112884
- Naranjo C. Psychotherapeutic Possibilities of New Fantasy-Enhancing Drugs. *Clin Toxicol*. 1969;2(2):209-224. doi:10.3109/15563656908990930
- Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors. *Chem Rev*. 2008;108(5):1614-1641. doi:10.1021/cr078224o
- Nikolić AL. Biohemijski efekti tkivno lokalizovanog oksidacionog stresa u telesnim tečnostima ljudi. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2004.
- Nikolic-Kokic A, Blagojević D, Spasic M. Complexity of free radical Metabolism in human Erythrocytes. *J Med Biochem*. 2010;29:189-195. doi:10.2478/v10011-010-0018-7.
- Nikolić-Kokić A, Oreščanin-Dušić Z, Spasojević I, et al. Ex vivo effects of ibogaine on the activity of antioxidative enzymes in human erythrocytes. *J Ethnopharmacol*. 2015;164:64-70. doi:10.1016/j.jep.2015.01.037
- Nikolic-Kokic A, Oreščanin-Dušić Z, Spasojevic I, Blagojević D, Stevic Z, Andjus P, Spasic M. The effects of wild-type and mutant SOD1 on smooth muscle contraction. *Arch Biol Sci*. 2015;67:187-192. doi:10.2298/ABS141006023N.
- Ninkov M. Intestinalni i sistemski imunski efekti oralnog unosa kadmijuma kod pacova. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2016. <https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/7713>
- Obach RS, Pablo J, Mash DC. Cytochrome P4502D6 catalyzes the O-demethylation of the psychoactive alkaloid ibogaine to 12-hydroxyibogamine. *Drug Metab Dispos*. 1998;26(8):764-768.

- Ohya Y, Sperelakis N. ATP regulation of the slow calcium channels in vascular smooth muscle cells of guinea pig mesenteric artery. *Circ Res.* 1989;64(1):145-154. doi:10.1161/01.res.64.1.145
- Okashiro T, Tokuno H, Fukumitsu T, Hayashi H, Tomita T. Effects of intracellular ATP on calcium current in freshly dispersed single cells of guinea-pig portal vein. *Exp Physiol.* 1992;77(5):719-731. doi:10.1113/expphysiol.1992.sp003638
- Oldenburg O, Yang XM, Krieg T, et al. P1075 opens mitochondrial K(ATP) channels and generates reactive oxygen species resulting in cardioprotection of rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35(9):1035-1042. doi:10.1016/s0022-2828(03)00151-2
- Oreščanin Dušić Z. Značaj antioksidativnog sistema u mehanizmu relaksantnog efekta protamin sulfata na izolovanom uterusu pacova. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2008.
- Oreščanin-Dušić Z, Tatalović N, Vidonja-Uzelac T, et al. The Effects of Ibogaine on Uterine Smooth Muscle Contractions: Relation to the Activity of Antioxidant Enzymes. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:5969486. Published 2018 Feb 11. doi:10.1155/2018/5969486
- Oropeza MV, Ponce Monter H, Reynoso Isla M, Campos MG. The ovarian and cervical regions of the rat uterus display a different contractile response to serotonin and prostaglandin F2alpha. I. The estrous cycle. *Life Sci.* 2000;66(25):PL345-PL351. doi:10.1016/s0024-3205(00)80010-7
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315-424. doi:10.1152/physrev.00029.2006
- Paccola C, Resende CG, Stumpp T, Miraglia S, Cipriano I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim Reprod.* 2013;10:677-683.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-169.
- Pajović SB, Saičić ZS. Regulation of antioxidant enzyme activities in female rat brain by ovarian steroids. *Period. Biol.* 2008;110(1):31-34.
- Pajović SB, Saičić ZS. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. *Physiol Res.* 2008;57(6):801-811. doi:10.33549/physiolres.931377
- Paling FP, Andrews LM, Valk GD, Blom HJ. Life-threatening complications of ibogaine: three case reports. *Neth J Med.* 2012;70(9):422-424.
- Parker GC, McKee ME, Bishop C, Coscina DV. Whole-body metabolism varies across the estrous cycle in Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav.* 2001;74(3):399-403. doi:10.1016/s0031-9384(01)00599-6
- Pastore D, Trono D, Laus MN, Di Fonzo N, Flagella Z. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. *J Exp Bot.* 2007;58(2):195-210. doi:10.1093/jxb/erl273
- Paškulin R, Jamnik P, Živin M, Raspor P, Štrukelj B. Ibogaine affects brain energy metabolism. *Eur J Pharmacol.* 2006;552(1-3):11-14. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.008
- Paškulin R, Jamnik P, Obermajer N, Slavić M, Štrukelj B. Induction of energy metabolism related enzymes in yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ibogaine is adaptation to acute decrease in ATP energy pool. *Eur J Pharmacol.* 2010;627(1-3):131-135. doi:10.1016/j.ejphar.2009.10.032
- Paškulin R, Jamnik P, Danevčić T, et al. Metabolic plasticity and the energy economizing effect of ibogaine, the principal alkaloid of *Tabernanthe iboga*. *J Ethnopharmacol.* 2012;143(1):319-324. doi:10.1016/j.jep.2012.06.039

- Paul RJ, Krisanda JM, Lynch RM. Vascular smooth muscle energetics. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984;6 Suppl 2:S320-S327. doi:10.1097/00005344-198406002-00006
- Pearl SM, Johnson DW, Glick SD. Prior morphine exposure enhances ibogaine antagonism of morphine-induced locomotor stimulation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995;121(4):470-475. doi:10.1007/BF02246495
- Pearl SM, Hough LB, Boyd DL, Glick SD. Sex differences in ibogaine antagonism of morphine-induced locomotor activity and in ibogaine brain levels and metabolism. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997;57(4):809-815. doi:10.1016/s0091-3057(96)00383-8
- Peterson LR, Soto PF, Herrero P, Schechtman KB, Dence C, Gropler RJ. Sex differences in myocardial oxygen and glucose metabolism. *J Nucl Cardiol*. 2007;14(4):573-581. doi:10.1016/j.nuclcard.2007.03.001
- Pleskovic A, Gorjup V, Brvar M, Kozelj G. Ibogaine-associated ventricular tachyarrhythmias. *Clin Toxicol (Phila)*. 2012;50(2):157. doi:10.3109/15563650.2011.647031
- Pohl HA. The nature of "masked" and "free" sulfhydryl groups in proteins. *J Biol Phys*. 1976;4:144-150. doi:10.1007/BF02330671
- Popik P, Layer RT, Skolnick P. 100 years of ibogaine: neurochemical and pharmacological actions of a putative anti-addictive drug. *Pharmacol Rev*. 1995;47(2):235-253.
- Popik P, Skolnick P. Chapter 3 - Pharmacology of Ibogaine and Ibogaine-Related Alkaloids, Editor(s): Geoffrey A. Cordell. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. Academic Press, Volume 52, 1999, Pages 197-231. doi:10.1016/S0099-9598(08)60027-9
- Prins NH, Briejer MR, Van Bergen PJ, Akkermans LM, Schuurkes JA. Evidence for 5-HT7 receptors mediating relaxation of human colonic circular smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1999;128(4):849-852. doi:10.1038/sj.bjp.0702762
- Prysyazhna O, Rudyk O, Eaton P. Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nat Med*. 2012;18(2):286-290. Published 2012 Jan 15. doi:10.1038/nm.2603
- Radić I. Dejstvo surutke i tikvinog ulja (*Cucurbita pepo l.*) na oštećenja jetre pacova indukovanih alkoholom. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici, 2018. <https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/9094>
- Rambacher KM, Moniri NH. Cysteine redox state regulates human β 2-adrenergic receptor binding and function. *Sci Rep*. 2020;10(1):2934. doi:10.1038/s41598-020-59983-4
- Rambacher KM, Moniri NH. The β 2-adrenergic receptor-ROS signaling axis: An overlooked component of β 2AR function?. *Biochem Pharmacol*. 2020;171:113690. doi:10.1016/j.bcp.2019.113690
- Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, Westerberg E, Siesjö BK. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺- and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem*. 1980;34(6):1630-1638. doi:10.1111/j.1471-4159.1980.tb11254.x
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*. 1998;280(5370):1763-1766. doi:10.1126/science.280.5370.1763
- Sarikaya E. Functions of Purinergic Receptors. *IntechOpen*. 2020. doi:10.5772/intechopen.88251
- Sato J, Nasu M, Tsuchitani M. Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals. *J Toxicol Pathol*. 2016;29(3):155-162. doi:10.1293/tox.2016-0021

- Savio LEB, Leite-Aguiar R, Alves VS, Coutinho-Silva R, Wyse ATS. Purinergic signaling in the modulation of redox biology. *Redox Biol.* 2021;47:102137. doi:10.1016/j.redox.2021.102137
- Scheid CR, Honeyman TW, Fay FS. Mechanism of beta-adrenergic relaxation of smooth muscle. *Nature.* 1979;277(5691):32-36. doi:10.1038/277032a0
- Schep LJ, Slaughter RJ, Galea S, Newcombe D. Ibogaine for treating drug dependence. What is a safe dose?. *Drug Alcohol Depend.* 2016;166:1-5. doi:10.1016/j.drugalcdep.2016.07.005
- Schlatmann TJ, Becker AE. Pathogenesis of dissecting aneurysm of aorta. Comparative histopathologic study of significance of medial changes. *Am J Cardiol.* 1977;39(1):21-26. doi:10.1016/s0002-9149(77)80005-2
- Schneider JA, Sigg EB. Neuropharmacological studies on ibogaine, an indole alkaloid with central-stimulant properties. *Ann N Y Acad Sci.* 1957;66(3):765-776. doi:10.1111/j.1749-6632.1957.tb40765.x
- Schneider AS, Nagel JE, Mah SJ. Ibogaine selectively inhibits nicotinic receptor-mediated catecholamine release. *Eur J Pharmacol.* 1996;317(2-3):R1-R2. doi:10.1016/s0014-2999(96)00815-1
- Schultes RE. The Botanical and Chemical Distribution of Hallucinogens. *Annu Rev Plant Physiol.* 1970;21(1):571-598. doi:10.1146/annurev.pp.21.060170.003035
- Sershen H, Hashim A, Lajtha A. Ibogaine and cocaine abuse: pharmacological interactions at dopamine and serotonin receptors. *Brain Res Bull.* 1997;42(3):161-168. doi:10.1016/s0361-9230(96)00296-1
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001;360(Pt 1):1-16. doi:10.1042/0264-6021:3600001
- Sherwood L. Human physiology: from cells to systems. *Cengage Learning*, 2016, ISBN: 9781285866932
- Sheppard SG. A preliminary investigation of ibogaine: case reports and recommendations for further study. *J Subst Abuse Treat.* 1994;11(4):379-385. doi:10.1016/0740-5472(94)90049-3
- Shyng SL. K_{ATP} Channel Function: More than Meets the Eye. *Function (Oxf).* 2022;3(1):zqab070. Published 2022 Jan 10. doi:10.1093/function/zqab070
- Sies H, Jones D. Oxidative Stress, Editor(s): George Fink, Encyclopedia of Stress (2nd edition), *Academic Press*, 2007, Pages 45-48, ISBN 9780123739476. doi:10.1016/B978-012373947-6.00285-3
- Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017;11:613-619. doi:10.1016/j.redox.2016.12.035
- Silverman DN, Nick HS. Catalytic pathway of manganese superoxide dismutase by direct observation of superoxide. *Methods Enzymol.* 2002;349:61-74. doi:10.1016/s0076-6879(02)49321-4
- Slavić M. Direktni farmakološki efekti fulerenola C60(OH)24 na modelu izolovanog glatkog mišića pacova i uloga antioksidativnog sistema. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2011. <https://radar.ibiss.bg.ac.rs/handle/123456789/4135>
- Sokolović D. Uticaj heksoprenalina i nikorandila na kontraktilnu aktivnost i antioksidativni sistem izolovanog uterusu. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Foča, Univerzitet u Istočnom Sarajevu, 2018.
- Song P, Zou MH. Redox regulation of endothelial cell fate. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(17):3219-3239. doi:10.1007/s00018-014-1598-z

- Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ. Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281(4):C1158-C1164. doi:10.1152/ajpcell.2001.281.4.C1158
- Srivastava S, Chandrasekar B, Gu Y, et al. Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to beta-adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. *Cardiovasc Res*. 2007;74(3):445-455. doi:10.1016/j.cardiores.2007.02.016
- Staley JK, Ouyang Q, Pablo J, et al. Pharmacological screen for activities of 12-hydroxyibogamine: a primary metabolite of the indole alkaloid ibogaine. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996;127(1):10-18. doi:10.1007/BF02805969
- Steinberg SF. The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res*. 1999;85(11):1101-1111. doi:10.1161/01.res.85.11.1101
- Sumner MJ. Characterization of the 5-HT receptor mediating endothelium-dependent relaxation in porcine vena cava. *Br J Pharmacol*. 1991;102(4):938-942. doi:10.1111/j.1476-5381.1991.tb12280.x
- Sweetnam PM, Lancaster J, Snowman A, et al. Receptor binding profile suggests multiple mechanisms of action are responsible for ibogaine's putative anti-addictive activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995;118(4):369-376. doi:10.1007/BF02245936
- Szabo I, Zoratti M. Mitochondrial channels: ion fluxes and more. *Physiol Rev*. 2014;94(2):519-608. doi:10.1152/physrev.00021.2013
- Szent-Györgyi A. Electronic Biology and Cancer: A New Theory of Cancer. *M. Dekker*, 1976, ISBN 082476434X, 9780824764340
- Szeto V, Chen NH, Sun HS, Feng ZP. The role of K_{ATP} channels in cerebral ischemic stroke and diabetes. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(5):683-694. doi:10.1038/aps.2018.10
- Talo A, Kärki AE. Electric activity of the rat myometrium in vivo during the estrous cycle. *Acta Physiol Scand*. 1976;97(4):495-500. doi:10.1111/j.1748-1716.1976.tb10289.x
- Tanaka Y, Horinouchi T, Koike K. New insights into beta-adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(7):503-514. doi:10.1111/j.1440-1681.2005.04222.x
- Taylor C, Crosby I, Yip V, Maguire P, Pirmohamed M, Turner RM. A Review of the Important Role of *CYP2D6* in Pharmacogenomics. *Genes (Basel)*. 2020;11(11):1295. Published 2020 Oct 30. doi:10.3390/genes11111295
- Terada LS, Leff JA, Repine JE. Measurement of xanthine oxidase in biological tissues. *Methods Enzymol*. 1990;186:651-656. doi:10.1016/0076-6879(90)86161-n
- Teramoto N. Physiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle. *J Physiol*. 2006;572(Pt 3):617-624. doi:10.1113/jphysiol.2006.105973
- Terrón JA, Falcón-Neri A. Pharmacological evidence for the 5-HT₇ receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries. *Br J Pharmacol*. 1999;127(3):609-616. doi:10.1038/sj.bjp.0702580
- Tian J, Liu J, Garlid KD, Shapiro JI, Xie Z. Involvement of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species in the inotropic action of ouabain on cardiac myocytes. A potential role for mitochondrial K(ATP) channels. *Mol Cell Biochem*. 2003;242(1-2):181-187. doi:10.1007/978-1-4757-4712-6_23
- Tinker A, Aziz Q, Thomas A. The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2014;171(1):12-23. doi:10.1111/bph.12407

- Tomasian D, Keaney JF, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res*. 2000;47(3):426-435. doi:10.1016/s0008-6363(00)00103-6
- Tsuchihashi, M. Zür Kenntnis der Blutkatalase. *Biochem Z*. 1923, 140, 65–74.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552(Pt 2):335-344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478
- Upton RA. Presented at the NIDA Ibogaine Review Meeting, Rockville, MD, 1995 (preneto u revijskom radu: Alper KR. Ibogaine: a review. *Alkaloids Chem Biol*. 2001;56:1-38. doi:10.1016/s0099-9598(01)56005-8)
- Vadzyuk OB, Kosterin SO. Mitochondria from rat uterine smooth muscle possess ATP-sensitive potassium channel. *Saudi J Biol Sci*. 2018;25(3):551-557. doi:10.1016/j.sjbs.2016.01.045
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(1):22-96. doi:10.1111/apha.12646
- Vasudevan NT, Mohan ML, Goswami SK, Naga Prasad SV. Regulation of β -adrenergic receptor function: an emphasis on receptor resensitization. *Cell Cycle*. 2011;10(21):3684-3691. doi:10.4161/cc.10.21.18042
- Vedernikov YP, Hartke JR, de Long MA, Saade GR, Garfield RE. Sex hormone effects in non-pregnant rat and human myometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;108(1):59-66. doi:10.1016/s0301-2115(02)00415-3
- Vidonja Uzelac T, Tatalović N, Mijović M, Koželj G, Nikolić-Kokić A, Oreščanin-Dušić Z, Bresjanac M, Blagojević D. Effects of ibogaine per os application on redox homeostasis in rat liver and erythrocytes. *Arch Biol Sci*. 2019;71(1):133–144. doi:10.2298/ABS180918055V
- Vidonja Uzelac T, Tatalović N, Mijović M, Nikolić-Kokić A, Oreščanin-Dušić Z, Bresjanac M, Blagojević D. Effects of ibogaine per os treatment on redox homeostasis in rat kidney. *Arch Biol Sci*. 2019;71(2):245–252. doi:10.2298/ABS190208006V
- Vidonja Uzelac T. Efekat ibogaina na sistem antioksidativne zaštite u perifernim tkivima i kontraktilnost terminalnog ileuma kod mužjaka pacova. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2019. <https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/11638>
- Vukašinović E, Purać J, Kojić D, Čelić T, Pihler I, Blagojević D. Ex Vivo Effect of Ibogaine on the Transcriptional Level of Antioxidant Defense Related Genes in Honey Bee (*Apis mellifera*, L.) Midgut. *Braz arch biol technol*. 2021;64:e21200773. doi:10.1590/1678-4324-2021200773
- Wachter SB, Gilbert EM. Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiology*. 2012;122(2):104-112. doi:10.1159/000339271
- Wallukat G. The beta-adrenergic receptors. *Herz*. 2002;27(7):683-690. doi:10.1007/s00059-002-2434-z
- Wang L, Zhou C, Zhu D, et al. Serotonin-1A receptor alterations in depression: a meta-analysis of molecular imaging studies. *BMC Psychiatry*. 2016;16(1):319. Published 2016 Sep 13. doi:10.1186/s12888-016-1025-0
- Wang Y, Park SY, Oh KH, et al. Characteristics of 5-hydroxytryptamine receptors involved in contraction of feline ileal longitudinal smooth muscle. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2011;15(5):267-272. doi:10.4196/kjpp.2011.15.5.267

- Warren AY, Matharoo-Ball B, Shaw RW, Khan RN. Hydrogen peroxide and superoxide anion modulate pregnant human myometrial contractility. *Reproduction*. 2005;130(4):539-544. doi:10.1530/rep.1.00437
- Watanabe M, Tanaka M, Tateishi T, Nakura H, Kumai T, Kobayashi S. Effects of the estrous cycle and the gender differences on hepatic drug-metabolising enzyme activities. *Pharmacol Res*. 1997;35(5):477-480. doi:10.1006/phrs.1997.0165
- Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*. 2003;27(1-4):201-206. doi:10.1152/advan.00025.2003
- Wei D, Maisonneuve IM, Kuehne ME, Glick SD. Acute iboga alkaloid effects on extracellular serotonin (5-HT) levels in nucleus accumbens and striatum in rats. *Brain Res*. 1998;800(2):260-268. doi:10.1016/s0006-8993(98)00527-7
- Wells GB, Lopez MC, Tanaka JC. The effects of ibogaine on dopamine and serotonin transport in rat brain synaptosomes. *Brain Res Bull*. 1999;48(6):641-647. doi:10.1016/s0361-9230(99)00053-2
- Wenzel P, Mollnau H, Oelze M, et al. First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(8):1435-1447. doi:10.1089/ars.2007.1969
- White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(2):73-80. doi:10.1016/s0306-3623(02)00129-5
- Wouters MM, Farrugia G, Schemann M. 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. *Neurogastroenterol Motil*. 2007;19 Suppl 2:5-12. doi:10.1111/j.1365-2982.2007.00963.x
- Woyda-Ploszczyca A, Jarmuszkiewicz W. Hydroxynonenal-stimulated activity of the uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria under phosphorylating conditions. *Biol Chem*. 2013;394(5):649-658. doi:10.1515/hsz-2012-0326
- Wray S, Noble K. Sex hormones and excitation-contraction coupling in the uterus: the effects of oestrous and hormones. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(4):451-461. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01665.x
- Wray S, Prendergast C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1124:233-263. doi:10.1007/978-981-13-5895-1_10
- Xu C, You X, Gao L, et al. Expression of ATP-sensitive potassium channels in human pregnant myometrium. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:35. Published 2011 Mar 21. doi:10.1186/1477-7827-9-35
- Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K, Ronai Z. Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res*. 2000;60(15):4053-4057. doi:10.7916/D8571B9J
- Yoshida H, Feig JE, Morrissey A, Ghiu IA, Artman M, Coetzee WA. K ATP channels of primary human coronary artery endothelial cells consist of a heteromultimeric complex of Kir6.1, Kir6.2, and SUR2B subunits. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(4):857-869. doi:10.1016/j.jmcc.2004.05.022
- Zafrah HA, Alotaibi MF. The effect of extracellular ATP on rat uterine contraction from different gestational stages and its possible mechanisms of action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2017;28(3):209-217. doi:10.1515/jbcpp-2016-0118

- Zhang H, Huang HM, Carson RC, Mahmood J, Thomas HM, Gibson GE. Assessment of membrane potentials of mitochondrial populations in living cells. *Anal Biochem.* 2001;298(2):170-180. doi:10.1006/abio.2001.5348
- Zhang L, Wang X, Cueto R, et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol.* 2019;26:101284. doi:10.1016/j.redox.2019.101284
- Zizzo MG, Mulè F, Serio R. Evidence that ATP or a related purine is an excitatory neurotransmitter in the longitudinal muscle of mouse distal colon. *Br J Pharmacol.* 2007;151(1):73-81. doi:10.1038/sj.bjp.0707188
- Zizzo MG, Mulè F, Serio R. Activation of P2Y receptors by ATP and by its analogue, ADPbetaS, triggers two calcium signal pathways in the longitudinal muscle of mouse distal colon. *Eur J Pharmacol.* 2008;595(1-3):84-89. doi:10.1016/j.ejphar.2008.07.057

Prilog 1 — Koncentracije ibogaina i noribogaina (mg/l) u plazmi mužjaka i ženki pacova nakon *per os* tretmana ibogainom.

	Mužijaci		Ženke		
	Noribogain	Ibogain	Noribogain	Ibogain	
K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	K
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
M6	0.013824	n.d.	0.020353	n.d.	M6_e
	0.011941	0.001059	0.018941	n.d.	
	0.004235	n.d.	0.011412	n.d.	
	0.002529	n.d.	0.010235	0.002647	
	0.002118	n.d.	0.007824	n.d.	
	0.001412	0.000706	0.007824	n.d.	
M24			0,010882	0,010823	M24
			0,009235	n.d.	
			0,007059	n.d.	
			0,006941	n.d.	
			0,001588	n.d.	
			0.011235	n.d.	
V6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	V6_e
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
V6_m	0.084176	0.001294	0.196000	0.004941	V6_m
	0.079471	0.000471	0.185000	0.006471	
	0.079294	0.008118	0.157529	0.004471	
	0.078588	0.001059	0.154824	0.004353	
	0.064412	0.000235	0.152059	0.005824	
	0.037118	n.d.	0.115647	0.019294	
V24			0,271706	0,024000	V24
			0,231353	0,042529	
			0,226529	0,005000	
			0,170176	0,005412	
			0,147118	0,022882	
			0.032765	n.d.	
V24	0.017059	0.000700	0.008235	n.d.	V24
	0.014529	0.001000	0.004471	n.d.	
	0.001824	n.d.	0.002706	0.000765	
	0.000471	n.d.	0.002118	n.d.	
	0.000353	n.d.	0.001118	n.d.	
	0.000176	n.d.			

Vrednosti niže od donje granice kvantifikacije (0,2 ng/ml) su označene sa n.d. (nije detektovano). Rezultati eksperimenta na mužjacima su objavljeni u radu Vidonja-Uzelac i sar. (2019a) i doktorskoj disertaciji Vidonja Uzelac (2019).

Prilog 2 — Količina potrošene hrane (g/h/kg telesne mase) nakon *per os* trtmana ibogainom; mužjaci i ženke.

A)					
	K	M6(e)	M24	V6(e)	V24
Mušijaci	2.831 ± 0.213	Videti (B)	3.067 ± 0.211	Videti (C)	3.014 ± 0.135
Ženke	2.303 ± 0.467	1.278 ± 0.483	2.728 ± 0.202	0.757 ± 0.377	2.469 ± 0.316

B)			
	M6–18 h	M6–6 h	M6–24 h
Mušijaci	3.670 ± 0.130	1.596 ± 0.798	3.152 ± 0.199

C)			
	V6–18 h	V6–6 h	V6–24 h
Mušijaci	3.779 ± 0.252	1.058 ± 0.218	3.126 ± 0.157

Rezultati eksperimenta na mužjacima su objavljeni u radu Vidonja-Uzelac i sar. (2019a) i doktorskoj disertaciji Vidonja Uzelac (2019).

U navedenom naučnom radu i doktorskoj disertaciji količina konzumirane hrane u grupama L6 i H6 je prikazana za period od 24 sata, odnosno 18 sati pre tretmana i 6 sati nakon tretmana ibogainom (B i C). Na taj način je u svih pet eksperimentalnih grupa prikazana potrošnja hrane u periodu od 24 sata. Jednofaktorska analiza varijanse nije pokazala značaje razlike.

Sa druge strane, u eksperimentu na ženkama (A) životinje su tretirane nakon što vaginalnim brisom utvrđeno da se nalaze u estrusnoj fazi reproduktivnog ciklusa, pa je potrošnja hrane praćena samo nakon tretmana. Stoga u eksperimentu na ženkama, za grupe M6e i V6e nema podataka o potrošnji hrane tokom 18 sati pre tretmana.

Kod oba pola potrošnja hrane šest sati nakon tretmana bilo kojom dozom je bila manja u poređenju sa kontrolom ili grupama koje su žrtvovane 24 sata nakon tretmana. Razlozi za ovu pojavu bi mogli da budu: stres, cirkadijalni ritam, prolazno suzbijanje gladi od strane vode/rastvora ibogaina koji je unet gavažom, ili eventualno metabolički, gastrointestinalni i/ili bihevioralni efekti ibogaina.

Po analogiji sa mužjacima, takođe je moguće da se potrošnja hrane tokom 24 sata u grupama M6e i V6e ne razlikuje od drugih grupa, što bi značilo da ne postoje polne razlike kada su u pitanju efekti ibogaina na potrošnju hrane.

Prilog 3 — Afinitet ketanserina za različite ciljne molekule.

Ciljni molekul	pKI (pIC50)	Farmakodinamika
Receptori		
5-HT _{1A} (čovek)	5,0	antagonista
5-HT _{1B} (miš)	8,3	antagonista
5-HT _{1B} (čovek)	5,2 – 5,4	antagonista
5-HT _{1D} (čovek)	7,4 – 7,5	antagonista
5-HT _{2A} (čovek)	8,1 – 9,7	antagonista
5-HT _{2A} (pacov)	8,6 – 9,0	antagonista
5-HT _{2B} (čovek)	6,1 – 6,7	antagonista
5-HT _{2B} (pacov)	5,4	antagonista
5-HT _{2C} (čovek)	6,8 – 7,5	antagonista
5-HT _{5A} (čovek)	4,7	antagonista
5-HT ₇ (pacov)	6,6 – 6,7	antagonista
5-HT ₇ (miš)	6,4	antagonista
5-HT ₇ (čovek)	5,9 – 6,5	antagonista
D ₁ (čovek)	6,7	antagonista
D ₅ (čovek)	5,6	antagonista
α _{1A} (čovek)	8,2	antagonista
α _{1B} (čovek)	8,2	antagonista
α _{1D} (čovek)	7,8	antagonista
Transporteri		
VMAT1	5,8	inhibitor
VMAT2	6,3	inhibitor

VMAT – vezikularni monoaminski transporter. Preuzeto iz The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY

(<https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=biology&ligandId=88>); pristupljeno 1.11.2023.

BIOGRAFIJA AUTORA

Nikola Tatalović, rođen 29.12.1983. godine u Beogradu, upisao je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu 2002. godine, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirao je 2014. godine sa prosečnom ocenom tokom studiranja 9,26. Eksperimentalni deo diplomskog rada uradio je u Institutu za nuklearne nauke Vinča, pod mentorstvom dr Miroslava Adžića i dr Ive Lukić. Od marta 2014. godine zaposlen je u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu. Iste godine upisala je doktorske studije na modulu Animalna i humana fiziologija na Biološkom fakultetu. Veće naučnih oblasti prirodnih nauka Univerziteta u Beogradu je dalo saglasnost na temu doktorske disertacije 20.9.2018. Izrada doktorske disertacije je finansirana od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije, ugovor 451-03-47/2023-01/200007. Autor je i koautor dvadeset naučnih radova koji su objavljeni u međunarodnim časopisima, jednog rada objavljenog u nacionalnom časopisu i dvadeset devet saopštenja sa međunarodnih i nacionalnih skupova koja su štampana u izvodu.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Nikola R. Tatalović

Broj indeksa: B3049/2014

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Redoks-posredovani mehanizmi farmakoloških efekata ibogaina na ženke pacova

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

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Nikola R. Tatalović

Broj indeksa: B3049/2014

Studijski program: Biologija

Naslov rada: Redoks-posredovani mehanizmi farmakoloških efekata ibogaina na ženke pacova

Mentori:

dr Duško Blagojević, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu;

dr Siniša Đurašević, profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

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

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

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o korišćenju

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

Redoks-posredovani mehanizmi farmakoloških efekata ibogaina na ženke pacova

koja je moje autorsko delo.

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

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo - nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo - bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.