

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Danijela J. Karanović

Efekti hronične primene losartana i tempola u eksperimentalnom modelu fokalno segmentne glomeruloskleroze kod spontano hipertenzivnih pacova

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Danijela J. Karanović

Efekti hronične primene losartana i tempola u eksperimentalnom modelu fokalno segmentne glomeruloskleroze kod spontano hipertenzivnih pacova

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Danijela J. Karanović

**Effects of chronic losartan and tempol
treatments on experimental focal
segmental glomerulosclerosis in
spontaneously hypertensive rats**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

dr Jelica Grujić Milanović, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja, Beograd, Srbija

dr Jelena Đorđević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd, Srbija

Član komisije:

dr Nevena Mihailović-Stanojević, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja, Beograd, Srbija

Datum i mesto javne odbrane _____

Ova disertacija urađena je u Grupi za kardiovaskularnu fiziologiju Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Ispitivanje antihipertenzivnog i renoprotektivnog potencijala supstanci prirodnog i sintetskog porekla u eksperimentalnim modelima kardiovaskularnih i bubrežnih oboljenja“ OI 175096 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, čiji je rukovodilac dr Đurđica Jovović.

ZAHVALNICA

Najveću zahvalnost dugujem mentorki dr Jelici Grujić Milanović na sveobuhvatnom angažovanju i podršci, na pruženoj pomoći i neizmernom strpljenju, kao i na vrednim savetima i smernicama tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem komentorki prof. dr Jeleni Đorđević na stručnoj pomoći tokom pisanja i recenzije disertacije. Zahvaljujem joj se na svim sugestijama i konstruktivnim savetima, izdvojenom vremenu i trudu pri pregledu i oceni ovog rada.

Posebno veliku zahvalnost dugujem članu komisije dr Neveni Mihailović-Stanojević na izuzetnoj stručnoj pomoći, velikom angažmanu i pružanju vrlo korisnih sugestija pri konačnom formulisanju ove disertacije.

Ovom prilikom želim da se zahvalim dr Đurđici Jovović na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da se bavim ovim poslom, na razumevanju i na svim dobronamernim i korisnim savetima tokom celokupnog rada.

Veliko hvala dr Zoranu Miloradoviću na bezrezervnoj pomoći tokom izrade rada, na svim savetima i neophodnim stručnim sugestijama koji su doprineli kvalitetu ove teze.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Jasmini Marković-Lipkovski na izuzetnoj stručnoj pomoći u oblasti histopatoloških analiza. Koleginicama dr Sanji Ćirović i dr Maji Životić hvala na uloženom vremenu i trudu prilikom obrade histopatoloških uzoraka.

Dragim kolegama dr Milanu Ivanovu i Uni-Jovani Vajić, koji su doprineli izradi ove disertacije, dugujem posebnu zahvalnost, pre svega, za prijateljsku podršku, za brojne korisne savete u istraživačkom radu, kao i za pruženu pomoć u svakom trenutku.

Mojim dragim prijateljima Maji, Ani, Dubravki, Ani, Milici i Borisu veliko hvala na razumevanju, ljubavi i nepresušnom optimizmu. Hvala vam što ste bili uz mene i umnogome doprineli da istrajem.

Najveću i najiskreniju zahvalnost dugujem mojim roditeljima, Jovanu i Jovanki, bratu Danielu i tetki Jovanki, za toplinu, ljubav i najsrdaniju podršku tokom svih ovih godina.

U Beogradu, 2018. godine

Danijela Karanović

Efekti hronične primene losartana i tempola u eksperimentalnom modelu fokalno segmentne glomeruloskleroze kod spontano hipertenzivnih pacova

Sažetak

Dosadašnja istraživanja pokazala su da renin angiotenzin sistem (RAS) ima važnu ulogu u patogenezi i progresiji fokalno segmentne glomeruloskleroze (FSGS). Oksidativni stres je prisutan u hroničnoj bubrežnoj slabosti i doprinosi progresiji bolesti. Povezanost oksidativnog stresa i RAS u procesima progresije FSGS još je nedovoljno razjašnjena. Stoga su istraživanja u okviru ove disertacije bila usmerena ka ispitivanju efekata hronične primene tempola (sakupljač slobodnih radikala, SOD mimetik), losartana (blokator receptora za angiotenzin II tipa 1, AT1R), kao i njihove kombinacije, na usporavanje progresije FSGS izazvane adrijamicinom (ADR) kod spontano hipertenzivnih (SH) pacova.

Životinje su inicijalno deljene u dve eksperimentalne grupe, kontrolnu (SHC) i grupu koja je primila ADR 2 mg/kg *i.v.* dva puta u intervalu od 21 dan. Nakon druge injekcije ADR, životinje su dobijale vodu (SHADR), losartan (SHADR+L), tempol (SHADR+T) i kombinovani tretman (SHADR+T+L) gavažom. Na kraju šeste nedelje tretmana vršena su hemodinamska merenja i uzorkovanje krvi, urina i bubrega. Na osnovu biohemijskih parametara vršena je procena lipidnog statusa i bubrežne funkcije. Urađena je histopatološka analiza bubrega. Imunohistohemijskom metodom ispitivani su proteini citosketeta, nestin i vimentin, čije izmenjene ekspresije su pokazatelj oštećenja bubrežnog tkiva. Matriksna metaloproteinaza-1 (MMP-1), koja učestvuje u degradaciji komponenti vanćelijskog matriksa i očuvanju integriteta glomerula, određivana je ELISA metodom. Ispitivani su parametri oksidativnog stresa: lipidna peroksidacija i nivo karbonilovanih proteina (PCOs); aktivnosti enzima antioksidativnog sistema: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GP_x) i glutation reduktaze (GR); kao i antioksidativni kapacitet. Primenom imunohistohemijske, Western blot i ELISA metode u bubrezima su određivane ekspresije Nox2 i Nox4 izoforme katalitičke subjedinice NADPH oksidaze, glavni izvor reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćeliji, uključene u proces inflamacije. Ekspresija proteina tri izoforme azot-monoksid sintaze, inducibilna

(iNOS), endotelna (eNOS) i neuronska (nNOS), određivane su Western blot i imunohistohemijskom metodom u tkivu bubrega. Određivani su ukupni metaboliti NO-a (nitriti, nitrati) u urinu i bubrezima.

Hronični pojedinačni tretmani losartanom i tempolom smanjuju strukturalna oštećena bubrega izazvana ADR (fokalno segmentnu glomerulosklerozu, atrofiju i dilataciju tubula, intersticijsku inflamaciju i fibrozu), ali u kombinaciji sinergistički ne deluju jer ne menjaju ukupni zbir morfoloških promena u ovom eksperimentalnom dizajnu. Pojedinačni tretmani losartanom i tempolom smanjuju ekspresije nestina i vimentina u bubrežnim telašcima i ne detektuju se u tubulointersticijumu. Nakon kombinovanog tretmana ekspresija nestina je detektovana u podocitima i miofibroblastina intersticijuma, a vimentina u bubrežnim telašcima, tubulocitima proksimalnih tubula i okolnim fibroblastima i miofibroblastima intersticijuma, što ukazuje na prisutna oštećenja u tim delovima bubrega. Pojedinačni tretmani losartanom i tempolom poboljšavaju bubrežnu funkciju jer smanjuju proteinuriju i albuminuriju, ali tempol u kombinaciji sa losartanom dodatno ne sprečava gubitak proteina urinom i smanjuje brzinu glomerulske filtracije. Losartan, tempol i kombinovani tretman smanjuju koncentraciju MMP-1 u bubrezima. Losartan normalizuje vrednosti triglicerida, ukupnog holesterola i LDL holesterola, a tempol povećava nivo HDL holesterola u plazmi, međutim u kombinaciji ne utiču na poboljšanje lipidnog statusa. Losartan, tempol i kombinovani tretman poboljšavaju oksidativni status, odnosno povećavaju antioksidativni kapacitet, a smanjuju lipidnu peroksidaciju u plazmi i karbonilaciju proteina u bubrezima. Takođe, povećavaju aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u eritrocitima. U bubrezima losartan povećava aktivnosti SOD, GP_x i GR, dok tempol u kombinaciji sa losartanom povećava aktivnost SOD. Losartan povećava ekspresiju Nox2 izoforme u bubrezima i sprečava periglomerularnu i peritubularnu inflamaciju intersticijuma, ukazujući na anti-inflamatornu ulogu NADPH oksidaze. Pojedinačni tretmani losartanom i tempolom povećavaju ekspresiju sve tri izoforme NOS, a kombinovani tretman povećava ekspresiju iNOS u bubrezima, dok su ekspresije konstitutivnih izoformi NOS snižene. U bubrezima losartan, za razliku od tempola, povećava koncentraciju metabolita NO, dok kombinovani tretman povećava produkciju metabolita NO povećavanjem koncentracije nitrita. Svi ispitivani tretmani smanjuju ukupnu produkciju metabolita NO putem urina kod tretiranih pacova. Losartan snižava sistolni i srednji arterijski pritisak, a povećava protok i smanjuje

vaskularni otpor u bubrežnoj arteriji. Tempol povećava frekvencu srčanih kontrakcija i smanjuje minutni volumen, dok kombinovani tretman povećava protok i smanjuje vaskularni otpor u karotidnoj arteriji ne menjajući krvni pritisak.

Rezultati ove disertacije pokazuju da u ranoj fazi adrijamicinske nefropatije kod SH pacova hronična blokada AT1R losartanom u kombinaciji sa tretmanom tempolom ne sprečava strukturna oštećenja, niti poboljšava funkciju bubrega, što može ukazati na to da u datim eksperimentalnim uslovima izostaje njihov udružen povoljan efekat na usporavanje progresije FSGS.

Ključne reči: fokalno segmentna glomeruloskleroza, adrijamicinska nefropatija, spontano hipertenzivni pacovi, blokator receptora za angiotenzin II tipa 1, tempol, oksidativni stres, azot-monoksid sintaza.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Animalna i humana fiziologija

UDK broj: [546.21:615.225]:616.61-004(043.3)

Effects of chronic losartan and tempol treatments on experimental focal segmental glomerulosclerosis in spontaneously hypertensive rats

Abstract

Previous studies have shown that renin angiotensin system (RAS) plays an important role in the pathogenesis and progression of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). Oxidative stress is involved in the development and progression of chronic kidney disease. However, the association of oxidative stress and RAS in the progression of FSGS has not been completely elucidated. In this study we investigated the effects of chronic tempol (free radical scavenger, SOD mimetic), losartan (selective angiotensin II type 1 receptor (AT1R) blocker), and their combined treatment in slowing down the progression of FSGS, in spontaneously hypertensive (SH) rats with adriamycin (ADR) nephropathy.

Animals were initially divided into two experimental groups: control (SHC) and group that received ADR 2 mg/kg i.v. twice in an interval of 21 days. After the second injection of ADR, the animals were given tap water (SHADR), losartan (SHADR+L), tempol (SHADR+T) or combined treatment (SHADR+T+L) by gavage. Hemodynamic measurements were performed, blood, urine, and kidney samples were taken for biochemical and histopathological analysis. Immunohistochemical method was used for protein expression and localization of the nestin and vimentin, proteins of cytoskeleton network, and change in their protein expression is a marker of cell injury. Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), which participates in the degradation of the extracellular matrix components and preserving the integrity of the glomerulus, was determined by the ELISA method. The parameters of oxidative stress: lipid peroxidation, protein carbonyl content (PCOs); antioxidant defense: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and antioxidant capacity were analysed. Immunohistochemical, Western blot and ELISA method were used for analysis of the Nox2 and Nox4 protein expression, isoforms of the catalytic subunit of NADPH oxidase, the main source of reactive oxygen species in the cell, involved in the inflammation process. Protein expression of three isoforms of azote monoxide synthase, inducible (iNOS), endothelial (eNOS), and neuronal (nNOS) were determined by

Western blot and immunohistochemical method in the kidney. Total metabolites of NO (nitrites, nitrates) were measured in the kidney and urine.

Chronic losartan and tempol treatments decrease structural damage in the kidney induced by ADR (focal segmental glomerulosclerosis, atrophy and tubal dilatation, interstitial inflammation and fibrosis), but in combination they do not show synergistic effect because there is no decrease in total sum of morphological changes in the kidney. Individual losartan and tempol treatments decrease the expression of nestin and vimentin in glomeruli and Bowman's capsule, with no detection in tubulointerstitium. After combined treatment nestin expression was detected in the podocytes and interstitial myofibroblasts, and vimentin expression in the epithelial cells of proximal tubules and interstitial fibroblasts and myofibroblasts, indicating the injury in these area of the kidney. Losartan and tempol individually improve renal function by reducing proteinuria and albuminuria, but tempol in combination with losartan does not further decrease proteinuria and reduces the rate of glomerular filtration. All treatments reduce the concentration of MMP-1 in the kidney. Losartan normalizes the triglyceride, total cholesterol and LDL cholesterol levels, and tempol increases HDL cholesterol levels in plasma, but in combination losartan and tempol do not improve the lipid status. All treatments improve the oxidative status, they increase the antioxidant capacity, and reduce lipid peroxidation in plasma and protein carbonyl content in the kidney. They also increase the activity of the antioxidant enzymes in erythrocytes. Losartan increases SOD, GPx and GR activities in the kidney, while tempol in combination with losartan increases SOD activity. Losartan increases Nox2 expression and prevents periglomerular and peritubular interstitial inflammation of the kidney, indicating the anti-inflammatory role of NADPH oxidase. Losartan and tempol treatments increase three NOS isoforms expression, while combined treatment increases the iNOS expression, while expressions of NOS constitutive isoforms have been reduced in the kidney. Losartan, unlike tempol, increases the concentration of NO metabolites in the kidney, while combined treatment increases the production of NO metabolites by increasing the concentration of nitrite. All treatments decrease the total production of NO metabolites by urine in treated rats. Losartan decrease systolic and mean arterial pressure and increases blood flow and decreases vascular resistance in the renal artery. Tempol increases the frequency of heart contractions and decreases the minute volume, while combined treatment increases the

blood flow and reduces vascular resistance in the carotid artery without altering blood pressure.

In conclusion, results from this study show that in the early phase of adriamycin nephropathy in SH rats, the chronic AT1R blockade by losartan in combination with tempol treatment neither prevent structural damage nor improve kidney function, which may indicate that in these experimental design their combined treatment does not contribute to further slowing down of FSGS progression.

Key Words: focal segmental glomerulosclerosis, adriamycin nephropathy, spontaneously hypertensive rats, angiotensin II type 1 receptor, tempol, oxidative stress, nitric oxide synthase

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Animal and Human Physiology

UDK number: [546.21:615.225]:616.61-004(043.3)

SPISAK SKRAĆENICA

2,4-DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin (engl. <i>2,4-dinitrophenylhydrazine</i>)
ABTS	2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina
ACE	angiotenzin konvertujući enzim (engl. <i>angiotensin converting enzyme</i>)
ACEI	inhibitor angiotenzin konvertujućeg enzima (engl. <i>angiotensin converting enzyme inhibitor</i>)
ADR	adrijamicin (doksorubicin hidrohlorid)
AEC	3-amino-9-etilkarbazol
Alb _{exc}	ekskrecija albumina urinom
AngI	angiotenzin I
AngII	angiotenzin II
APK	protok krvi kroz aortu
ARB	blokator za receptor angiotenzin II tipa 1 (engl. <i>angiotensin receptor blocker</i>)
AT1R	receptor za angiotenzin II tip 1
AT2R	receptor za angiotenzin II tip 2
AVO	vaskularni otpor u aorti
BH ₄	tetrahidrobiopterin
BPK	protok krvi kroz bubrežnu arteriju
BSA	albumin goveđeg seruma (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
BVO	vaskularni otpor u bubrežnoj arteriji
CAT	katalaza (engl. <i>Catalase</i>)
C _{cr}	klirens kreatinina
cGMP	ciklični guanozin monofosfat (engl. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
COX	ciklooksigenaza
C _u	klirens uree
Cu/Zn-SOD	bakar/cink superoksid dismutaza
DAG	diacilglicerol
DKP	dijastolni krvni pritisak
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
E-ACA	epsilon-aminokaproična kiselina (engl. <i>epsilon aminocaproic acid</i>)

ECM	vanćelijski matriks (engl. <i>extracellular matrix</i>)
EC-SOD	ekstracelularna superoksid dismutaza
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina (engl. <i>etylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	imunoenzimski testovi (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMT	epitelo-mezenhimska tranformacija
eNOS	endotelna NOS (engl. <i>endothelial NOS</i>)
ERK1/2	ekstracelularnim signalom-regulisana kinaza 1/2
ESRD	krajnji stadijum bubrežne slabosti (engl. <i>end stage renal disease</i>)
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
FS	frekvencija srčanih kontrakcija
FSGS	fokalno segmentna glomerulskleroza (engl. <i>focal segmental glomerulosclerosis</i>)
GBM	glomerularna bazalna membrana
GP _x	glutation peroksidaza (engl. <i>glutathione peroxidase</i>)
GR	glutation reduktaza (engl. <i>glutathione reductase</i>)
GSH	redukovani glutation
GSSG	oksidovani glutation
H	ukupni holesterol
Hb	hemoglobin
HBS	hronična bubrežna slabost
HDL	lipoprotein velike gustine (engl. <i>high-density lipoprotein</i>)
HRP	peroksidaza iz rena (engl. <i>horse radish peroxidase</i>)
<i>i.p.</i>	intraperitonealni način aplikacije
IP3	inozitol-1,4,5-trisfosfat
<i>i.v.</i>	intravenski način aplikacije
IMB	indeks mase bubrega
iNOS	inducibilna NOS (engl. <i>inducible NOS</i>)
Keap1	Kelch-sličan ECH-pridruženi protein 1 (engl. <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>)
KPK	protok krvi kroz karotidnu arteriju
KVO	vaskularni otpor u karotidnoj arteriji

L	losartan
LDL	lipoprotein male gustine (engl. <i>low-density lipoprotein</i>)
L-NAME	N ω -nitro-L-arginin metil estar
LOX	lipooksigenaza
LPS	lipopolisaharidi
MB	masa bubrega
MMP	matriksna metaloproteinaza (engl. <i>matrix metalloproteinase</i>)
Mn-SOD	mangan superoksid dismutaza
MV	minutni volumen
NADPH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF-kB	jedarni faktor-kB (engl. <i>nuclear factor-kappa B</i>)
nNOS	neuronska NOS (engl. <i>neuronal NOS</i>)
NO	azot-monoksid (engl. <i>nitric oxide</i>)
NO ₂ ⁻	nitriti
NO ₃ ⁻	nitрати
NOS	azot-monoksid sintaza (engl. <i>nitric oxide synthase</i>)
NO _x	ukupni nitriti i nitрати
Nox	katalitička subjedinica NADPH oksidaze
Nox2	izoforma 2 katalitičke subjedinice NADPH oksidaze
Nox4	izoforma 4 katalitičke subjedinice NADPH oksidaze
Nrf-2	jedarni faktor eritroid 2-povezani faktor-2 (engl. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
O ₂ ⁻	superoksidni anjon
P _{alb}	koncentracija albumina u plazmi
PAS	perjodna kiselina-schiff bojenje (engl. <i>periodic acid-schiff</i>)
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffer saline</i>)
PKC	fosfolipazu C
PCOs	sadržaj karbonilovanih proteina (engl. <i>protein carbonyl content</i>)
P _{cr}	koncentracija kreatinina u plazmi
P _{exc}	ekskrecija proteina urinom
PMSF	fenilmetan sulfonil fluorid (engl. <i>Phenylmethane sulfonyl fluoride</i>)
P _p	koncentracija proteina u plazmi

P_u	koncentracija uree u plazmi
RAS	renin angiotenzin sistem
RIPA	pufer za izolaciju membranskih i citosolnih proteina (engl. <i>radioimmunoprecipitation buffer</i>)
RNS	reaktivne vrste azota (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktivne vrste kiseonika (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SAP	srednji arterijski pritisak
SDS	natrijum dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	SDS-poliakrilamid gel elektroforeza (engl. <i>sodium dodecyl sulphate poly acrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	standardna greška
SH	spontano hipertenzivni
SKP	sistolni krvni pritisak
SOD	superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i>)
T	tempol
TBARS	supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (engl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TBM	bazalna membrana tubula
TBS	fiziološki rastvor puferovan Tris-om (engl. <i>Tris-buffered saline</i>)
TBS-Tween	0,05 % Tween 20 u TBS puferu
TCA	trihlor-sirćetna kiselina (engl. <i>trichloroacetic acid</i>)
TE	troloks ekvivalent (engl. <i>trolox equivalent</i>)
TGF- β	transformišući faktor rasta- β (engl. <i>transforming growth factor-β</i>)
TIMP	tkivni inhibitori matriksne metaloproteinaze (engl. <i>tissue inhibitors of matrix metalloproteinase</i>)
TM	telesna masa
Trg	trigliceridi
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan
U_{alb}	koncentracija albumina u urinu
U_{cr}	koncentracija kreatinina u urinu
U_p	koncentracija proteina u urinu
$U_{p/cr}$	odnos koncentracije proteina i kreatinina u urinu

UPO	ukupni periferni vaskularni otpor
U_u	koncentracija uree u urinu
U_v	volumen izlučenog urina tokom 24h

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Fokalno segmentna glomeruloskleroza	1
1.1.1.	<i>Patogeneza i mehanizmi progresije FSGS.....</i>	<i>5</i>
1.1.2.	<i>Faktori progresije FSGS.....</i>	<i>10</i>
1.1.3.	<i>Eksperimentalni model FSGS - adrijamicinska nefropatija</i>	<i>11</i>
1.2.	Renin angiotenzin sistem	13
1.2.1.	<i>Uloga RAS u patogenezi HBS</i>	<i>15</i>
1.3.	Oksidativni stres i antioksidativni sistem.....	17
1.3.1.	<i>NADPH oksidaza.....</i>	<i>22</i>
1.3.2.	<i>Uloga oksidativnog stresa u patogenezi HBS</i>	<i>24</i>
1.3.3.	<i>Tempol.....</i>	<i>26</i>
1.4.	Azot-monoksid.....	29
1.4.1.	<i>Uloga NO sistema u patogenezi HBS.....</i>	<i>33</i>
2.	CILJ.....	35
3.	MATERIJAL I METODE	36
3.1.	Eksperimentalni protokol.....	36
3.2.	Hemodinamske studije.....	39
3.2.1.	<i>Indirektno merenje sistolnog krvnog pritiska i frekvence srčanih kontrakcija</i>	<i>39</i>
3.2.2.	<i>Direktno merenje krvnog pritiska, minutnog volumena srca i regionalnog protoka krvi</i>	<i>39</i>
3.3.	Priprema uzoraka	40
3.4.	Određivanje biohemijskih parametara i procena bubrežne funkcije	41
3.5.	Određivanje parametara oksidativnog stresa	43
3.5.1.	<i>Određivanje stepena lipidne peroksidacije.....</i>	<i>43</i>
3.5.2.	<i>Određivanje markera oksidacije proteina.....</i>	<i>44</i>
3.5.3.	<i>Određivanje antioksidativnog statusa - ABTS test.....</i>	<i>44</i>
3.6.	Određivanje aktivnosti enzima antioksidativnog sistema	45
3.6.1.	<i>Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....</i>	<i>45</i>
3.6.2.	<i>Određivanje aktivnosti katalaze.....</i>	<i>46</i>

3.6.3.	<i>Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze</i>	47
3.6.4.	<i>Određivanje aktivnosti glutation reduktaze</i>	48
3.7.	Imunoezimski testovi	49
3.8.	Određivanje metabolita NO (nitrita i nitrata)	50
3.9.	Western blot analiza	52
3.9.1.	<i>Izolacija membranskih i citosolnih proteina</i>	52
3.9.2.	<i>Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)</i>	52
3.9.3.	<i>Imunoblot</i>	53
3.9.4.	<i>Detekcija proteinskih traka</i>	53
3.10.	Histopatološke analize	54
3.11.	Imunohistohemijske analize	55
3.12.	Statistička obrada rezultata	56
4.	REZULTATI	57
4.1.	Telesna masa životinja i indeks mase bubrega	57
4.2.	Sistolni krvni pritisak i frekvencija srčanih kontrakcija	59
4.3.	Sistemske i regionalne hemodinamske parametre na kraju tretmana .	61
4.4.	Biohemijski parametri	64
4.4.1.	<i>Lipidni status</i>	64
4.4.2.	<i>Procena bubrežne funkcije</i>	66
4.5.	Histopatološke promene i ekspresija vimentina, nestina i MMP-1 u bubrezima	71
4.5.1.	<i>Histopatološka analiza tkiva bubrega</i>	71
4.5.2.	<i>Imunohistohemijska detekcija vimentina i nestina u tkivu bubrega</i> ..	76
4.5.3.	<i>Kvantifikacija matriks metaloproteinaze-1 u bubrezima</i>	80
4.6.	Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne odbrane	81
4.6.1.	<i>Lipidna peroksidacija</i>	81
4.6.2.	<i>Sadržaj karbonilovanih proteina</i>	83
4.6.3.	<i>Antioksidativni kapacitet</i>	84
4.6.4.	<i>Enzimi antioksidativnog sistema</i>	85
4.6.5.	<i>Ekspresija i lokalizacija NADPH oksidaza</i>	90

4.6.5.1.	Nivo ekspresije proteina Nox2 i Nox4 izoforme katalitičkih subjedinica NADPH oksidaze u homogenatu bubrega	90
4.6.5.2.	Imunohistohemijska detekcija Nox2 i Nox4 u tkivu bubrega ...	92
4.7.	Metaboliti NO-a i ekspresija izoformi NOS.....	95
4.7.1.	<i>Ekskrecija NO metabolita urinom i nivo NO metabolita u homogenatu bubrega</i>	<i>95</i>
4.7.2.	<i>Ekspresije tri izoforme NOS proteina u homogenatu bubrega</i>	<i>99</i>
4.7.3.	<i>Imunohistohemijska detekcija tri izoforme NOS-a u tkivu bubrega</i>	<i>101</i>
4.8.	Korelacije ispitivanih parametara	104
4.9.	Sumarni prikaz dobijenih rezultata	107
5.	DISKUSIJA	110
6.	ZAKLJUČCI	136
7.	LITERATURA	136

PRILOZ

1. UVOD

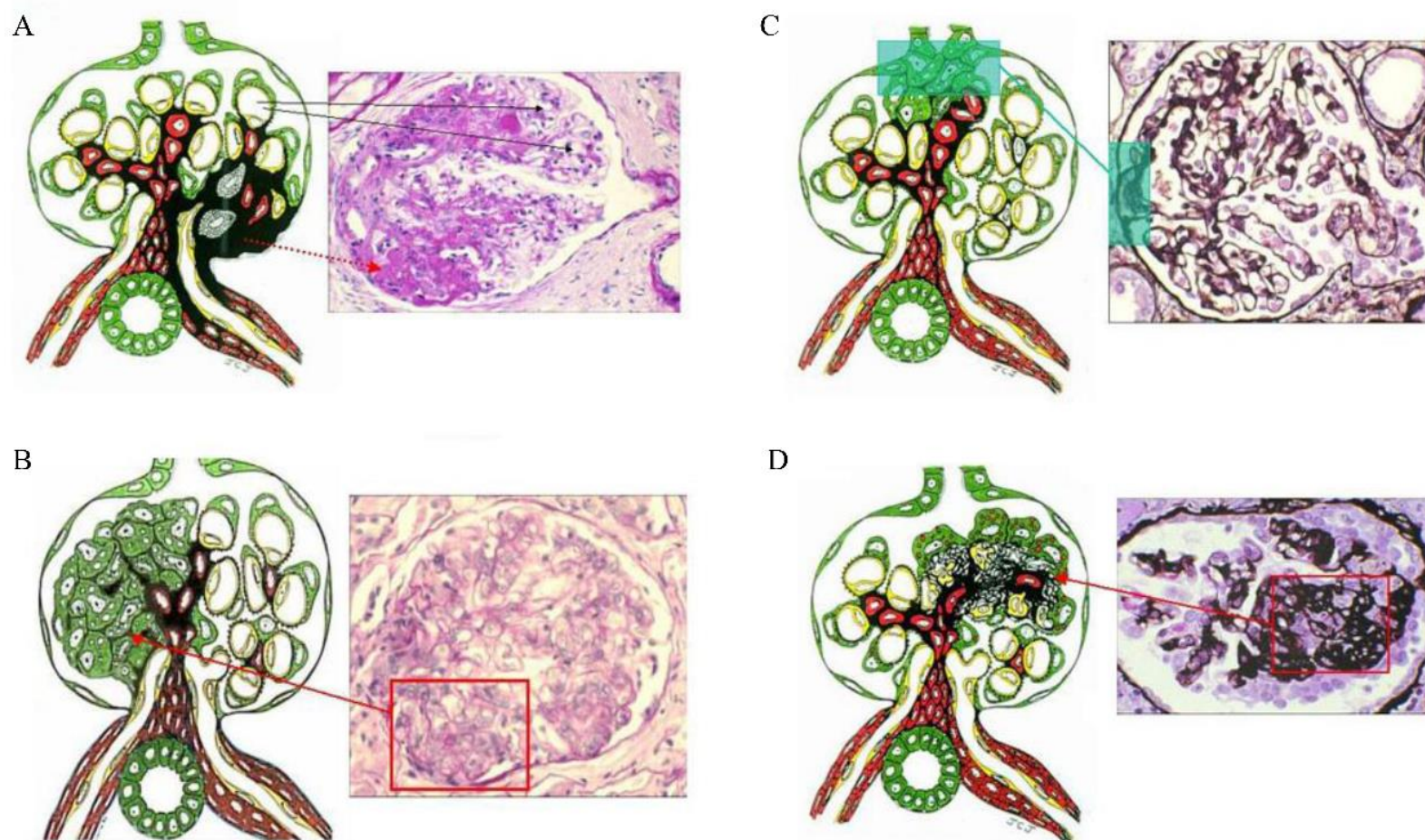
1.1. Fokalno segmentna glomeruloskleroza

Fokalno segmentna glomeruloskleroza (FSGS, engl. *focal segmental glomerulosclerosis*) predstavlja hronično, progresivno oboljenje bubrega koje postepeno i neizbežno vodi ka potpunom gubitku bubrežne funkcije. U obolelim bubrezima fokalno su raspoređeni glomeruli koji su segmentno zahvaćeni sklerozom. Kako bolest napreduje sve veći broj glomerula biva zahvaćen sklerozom, koja se širi i dobija globalni karakter, što je povezano sa degenerativnim promenama u tubulima i fibrozom intersticijuma (de Mik i sar., 2013). Klinička manifestacija FSGS odlikuje se masivnom proteinurijom, hipoalbuminemijom, hiperlipidemijom i perifernim edemom, koje zajedno predstavljaju nefrotski sindrom. U humanoj populaciji definisane su vrednosti ovih parametara koje ukazuju na prisustvo nefrotskog sindroma, a približno kod 75-90% dece i 50-60% odraslih pacijenata u momentu dijagnostikovanja FSGS već je prisutan nefrotski sindrom (D'Agati i sar., 2011).

Učestalost FSGS kreće se oko 7/1000 000 stanovnika, a približno 20% slučajeva nefrotskog sindroma kod dece i 40% kod odraslih pacijenata uzrokovano je FSGS (Kitiyakara i sar., 2003). FSGS je najčešći uzrok hronične bubrežne slabosti (HBS), koji vodi ka potpunom gubitku bubrežne funkcije (ESRD, engl. *end stage renal disease*) (Reidy i sar., 2007, D'Agati i sar., 2011). U poslednjem stadijumu HBS primenjuje se dijaliza ili se vrši transplantacija bubrega. Međutim, nakon transplantacije bubrega kod pacijenata sa FSGS čak u 40% slučajeva dolazi do povratka bolesti (Hickson i sar., 2009, Pardon i sar., 2006).

Kod 80% pacijenata FSGS je nepoznate etiologije i naziva se primarna (idiopatska), dok je u preostalih 20% slučajeva FSGS posledica drugih bolesti (sekundarna). Uzroci nastanka sekundarne FSGS mogu biti: mutacije gena za proteine koji izgrađuju citoskelet podocita (α -aktinin-4) ili održavaju strukturu filtracione membrane glomerula (nefrin, podocin); različiti lekovi (interferon- α , - β i - γ , pamidronat, rapamicin); virusne infekcije (HIV-1 virus, parvovirus B19, citomegalovirus); hipertenzija, akutni ili hronični vazo-okluzivni procesi, povećan indeks telesne mase i stanja sa redukovanom bubrežnom masom (D'Agati i sar., 2011, de Mik i sar., 2013).

U zavisnosti od toga gde se unutar glomerula nalaze oštećenja, razlikujemo nekoliko morfoloških tipova FSGS: perihilarna (lezije predominantno locirane na vaskularnom polu glomerula), vršna (prisustvo lezija na urinarnom polu glomerula), kolapsna (kolaps glomerularnog kapilarnog klupka i izražena hipertrofija i hiperplazija podocita) i celularna (karakteriše se hipercelularnošću unutar kapilara glomerula) (**Slika 1-1**). Pacijenti sa vršnim tipom FSGS imaju najbolju prognozu i najčešće pozitivno reaguju na terapiju (D'Agati i sar., 2013), dok se kolapsni tip FSGS karakteriše najbržom progresijom ka ESRD. Naime, segmentni i globalni kolaps glomerularnog klupka praćen je jasno izraženom hipertrofijom i hiperplazijom podocita i teškim tubulointersticijskim oštećenjima, a pacijentima je, bez obzira na tretman, u roku od godinu ili dve potrebna dijaliza ili transplantacija bubrega (Schwimmer i sar., 2003). Ukoliko se ne uočavaju neki od gore pomenutih tipova, FSGS se naziva klasična (D'Agati i sar., 2004).



Slika 1-1. Šematski i histološki prikaz različitih tipova fokalno segmentne glomeruloskleroze: perihilarni tip (A), celularni tip (B), vršni tip (C) i kolapsni tip (D). (Preuzeto sa <http://unckidneycenter.org/kidneyhealthlibrary/glomerular-disease/focal-segmental-glomerulosclerosis-fsgs>)

Podociti pružaju strukturnu potporu kapilarnom klupku glomerula, učestvuju u sintezi komponenti vanćelijskog matriksa (ECM, engl. *extracellular matrix*) i imaju važnu ulogu u glomerulskoj filtraciji (Mundel i sar., 2002, Shankland, 2006). Literaturni podaci ukazuju da je patogeneza FSGS povezana sa izmenjenom strukturom i funkcijom podocita (Schwartz i sar., 2000, Bolton i sar., 2001). Klinička manifestacija narušene funkcije podocita ogleda se u slabljenju bubrežne funkcije i prisustvu proteinurije, čiji stepen je vrlo značajan u daljoj prognozi FSGS (Korbet, 2012). Proteinurija u nefrotskom opsegu (> 3 g/dan) i otpornost na kortikosteroidnu terapiju ukazuju na lošiju prognozu, a čak u 50% slučajeva stanje se progresivno pogoršava i u roku od 10 godina nastupa ESRD (Schnaper, 2003). Međutim, ukoliko je prisutna masivna proteinurija (> 10 g/dan) i nema pozitivnog odgovora na terapiju, potpuni gubitak bubrežne funkcije nastupa u periodu od 5 godina (Sozeri i sar., 2010). Već duži niz godina u tretmanu FSGS rezistentne na steroide koriste se imunosupresivni lekovi (Sozeri i sar., 2010). Međutim, poznati su mnogobrojni neželjeni efekti, kako tokom primene kortikosteroida, tako i imunosupresivnih lekova, a pored toga, ne daju zadovoljavajuće rezultate kada je u pitanju progresija inflamacije i fibroze u bubrežima (Korbet, 2012). U kliničkoj praksi primenjuju se i diuretici, statini, inhibitori angiotenzin konvertujućeg enzima (ACEI, engl. *angiotensin converting enzyme inhibitor*) i blokatori za receptor angiotenzin II tipa 1 (ARB, engl. *angiotensin receptor blocker*). Pored antihipertenzivnih, ACEI i ARB ispoljavaju nefroprotektivna svojstva i smanjuju proteinuriju (Gipson i sar., 2007). Primena diuretika i blokatora Ca^{2+} kanala u kombinaciji sa ACEI ili ARB dovodi do usporavanja progresije bolesti i sniženja krvnog pritiska (Baltatzi i sar., 2011). Međutim, kod pacijenata koji su otporni na terapije postoji velika verovatnoća da će doći do progresije bolesti ka ESRD (Gipson i sar., 2007), te stoga postoji potreba za novim terapijama koje bi usporile ili sprečile ovaj ishod.

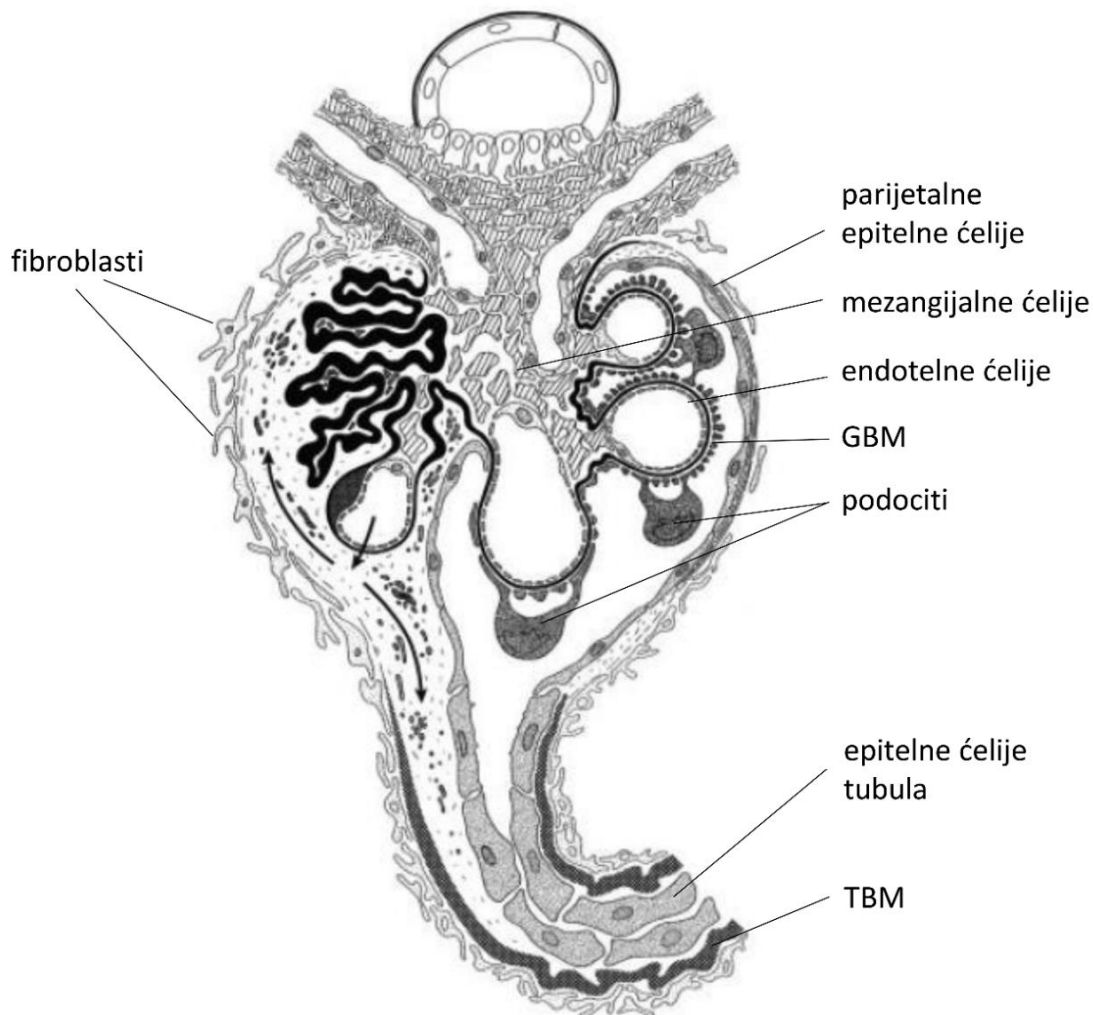
1.1.1. Patogeneza i mehanizmi progresije FSGS

Podociti zajedno sa glomerularnom bazalnom membranom (GBM) i endotelnim ćelijama kapilara čine filtracionu membranu glomerula. Podociti pružaju strukturnu potporu kapilarnom klupku suprotstavljajući se glomerularnom hidrostatskom pritisku, a imaju ulogu u sintezi komponenti GBM i ECM (Mundel i sar., 2002, Shankland, 2006). Mehanizmi uključeni u patogenezu FSGS još nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se smatra da ključnu ulogu imaju oštećenja podocita i njihov gubitak. Izloženost oksidativnom stresu i mehaničko istezanje podocita stimuliše hipertrofiju i apoptozu u ovim ćelijama (Mundel i sar., 2002, Shankland 2006). Usled različitih oštećenja, podociti podležu strukturnim promenama koje obuhvataju povlačenje i gubitak prstastih nastavaka (pedicela), što dovodi do sve slabije povezanosti sa GBM, te u odgovoru na filtracioni pritisak u glomerulima dolazi do njihovog odvajanja od GBM (Reidy i sar., 2007, Mundel i sar., 2002, Shankland, 2006).

Poznato je da proteini nestin, vimentin i dezmin učestvuju u izgradnji intermedijarnih filamenata citoskeleta podocita (Zou i sar., 2006). U toku glomerulogeneze nestin se eksprimira u podocitima, mezangijalnim i endotelnim ćelijama, dok je u potpuno razvijenim glomerulima ograničen na konačno diferencirane podocite (Bertelli i sar., 2007). Vimentin i dezmin (grade heterodimere i heterotetramere) u interakciji sa nestinom formiraju kopolimere, koji se vezuju za mikrotubule i mikrofilamente aktina i učestvuju u očuvanju integriteta citoskeleta podocita. Narušena organizacija i ekspresija proteina citoskeleta u podocitima može da dovede do gubitka pedicela i nastanka proteinurije (Chen i sar., 2006). Literaturni podaci ukazuju da nakon oštećenja dolazi do povećane ekspresije nestina i vimentina u podocitima kako bi se povećavala mehanička stabilnost citoskeletne mreže (Jefferson i sar., 2011). Studije u humanoju populaciji su pokazale da ekspresija nestina u glomerulima može da bude potencijalni novi marker za rano otkrivanje slabljenja bubrežne funkcije kod pacijenata sa FSGF (Životić i sar., 2015). Naime, u ranoj fazi bolesti u slučajevima kada još nisu uočljive jasne promene karakteristične za hroničnu bubrežnu

slabost (skleroza glomerula, atrofija tubula i intersticijska fibroza), procena nivoa ekspresije nestina u tkivu nakon biopsije bubrega može da bude od pomoći u predviđanju daljeg ishoda.

Gubitak podocita usled odvajanja od GBM, apoptoze ili nekroze, predstavlja ključni momenat u nastanku glomeruloskleroze (Wiggins, 2007). U cilju prekrivanja nastale ogoljene površine GBM dolazi do hipertrofije okolnih podocita. Vremenom se gubi sve veći broj podocita, a ukoliko je nedostatak veći od 40% jasno se uočava FSGS sa izraženom proteinurijom i bubrežnom slabošću (Wharram i sar., 2005). Ovi ogoljeni delovi GBM formiraju adhezije sa parijetalnim epitelnim ćelijama Boumanove kapsule, koje migriraju ka glomerularnom klupku gde vrše povećanu produkciju komponenti ECM, što predstavlja početak razvoja segmentne glomeruloskleroze (D'Agati i sar., 2011) (**Slika 1-2.**). Na mestu adhezije delovi kapilarnog klupka mogu da dođu u direktan kontakt sa intersticijumom i da se glomerularni filtrat preusmeri ka intersticijumu umesto u Boumanov prostor. Potom, u intersticijumu preusmereni filtrat okružuju fibroblasti i dolazi do formiranja paraglomerularnog prostora, koji ima tendenciju širenja duž Boumanove kapsule i dalje ka urinarnom polu, pri čemu dolazi do formiranja subepitelnog peritubularnog prostora (Javaid i sar., 2001) (**Slika 1-2.**). Ove promene dovode do degeneracije tubula, a u intersticijumu do razvoja lokalne intersticijske fibroze (Kriz, 2003). Nakon gubitka podocita, kroz ogoljene delove GBM ipak ne prolaze makromolekuli (imunoglobulini, fibrinogen), već se nagomilavaju u subendotelnom prostoru i formiraju hijalinske depozite, koji sužavaju lumen kapilara i narušavaju glomerulsku filtraciju. Na mestima adhezije vremenom dolazi do hijalinizacije i potpunog prestanka bilo kakve perfuzije.



Slika 1-2. Schematyczny obraz przesmerzonego filtracji z uszkodzonego kłębuszka w interstycjum i rozprzeczania filtratu podczas degeneracyjnych zmian w nefronie. Kapsułkowa adhezja kłębuszkowa obejmuje kilka pętli uszkodzonych naczynek i częściowo zwapniających naczynek. Filtrat z tego segmentu kłębuszka przechodzi do przestrzeni paraglomerularnej (strzałki), która jest oddzielona od interstycjum warstwą fibroblastów. Ten nowo powstały przestrzeń się rozszerza we wszystkie strony i do tubula proksymalnego, przy czym dochodzi do odwarstwienia błony podstawnej od tubulocytów. GBM – glomerularna błona podstawna, TBM – błona podstawna tubula (Kriz, 2003).

Patofiziološke promene u glomerulima, povezane sa degenerativnim promenama u tubulima i fibrozom intersticijuma, dovode do opadanja u broju funkcionalnih nefrona i progresivnog slabljenja bubrežne funkcije (Rennke, 1994, Kriz, 2003, Javaid i sar., 2001). Proteine dospele filtracijom u lumen proksimalnih tubula preuzimaju tubulociti, a to dalje stimuliše produkciju i oslobađanje citokina u intersticijum bubrega. Pod uticajem citokina dolazi do inflamacije i razvoja fibroze, što doprinosi progresiji oštećenja tubulointersticijuma (Eddy i sar., 1995, Javaid i sar., 2001). U tubulointersticijumu je često prisutna lokalna hipoksija, koja nastaje kao posledica smanjenog protoka krvi kroz peritubularne kapilare (Javaid i sar., 2001, Khodo i sar., 2012). Tada se u proksimalnim tubulima sintetišu profibrotski faktori, a akumulacija komponenti ECM dovodi do razvoja intersticijske fibroze i dalje progresije bolesti (Khodo i sar., 2012).

Fibroza predstavlja samopropagirajući proces koji dovodi do nastanka ožiljaka u bubrezima. Nastanku fibroze prethode inflamatorni procesi koji podrazumevaju infiltraciju mononuklearnih leukocita (makrofaga) i T limfocita, a potom i infiltraciju i proliferaciju fibroblasta. Pod uticajem citokina i faktora rasta fibroblasti se diferenciraju u miofibroblaste, koji zajedno sa fibroblastima vrše povećanu produkciju komponenti ECM (kolagen I, III i IV, fibronektin i laminin) (Manabe i sar., 2000). Najvažniji medijatori uključeni u nastanak fibroze u bubrezima su AngII, endotelin-1, TGF- β i drugi faktori rasta (Yan i sar., 2003, Reidy i sar., 2007, Ruan i sar., 2009, Yang i sar., 2012). AngII stimuliše hipertrofiju tubulocita i aktivira intersticijske fibroblaste koji vrše povećanu produkciju vanćelijskog matriksa. Prethodne studije su pokazale da AngII stimuliše produkciju citokina TGF- β , koji aktivira Smad signalni put kojim se prenose signali do jedra gde se aktiviraju geni za proces epitelo-mezenhimalne transformacije (EMT) i fibroze (Lan i sar., 2003). TGF- β se vezuje za receptor tipa II, koji aktivira kinazu receptora tipa I, koja zauzvrat fosforiliše receptorom-regulisane Smad proteine (R-Smads): Smad2 i Smad3. R-Smads se zatim odvajaju od kompleksa receptora i formiraju kompleks sa Smad4, koji potom prelazi u jedro gde ima ulogu regulatora transkripcije ciljnih gena. Inhibitorni Smad7 se vezuje za aktiviran receptor tipa I, čime se sprečava fosforilacija Smad2/3 ili se regrutuju ubikvitin ligaze Smurf1 i Smurf2 koje vrše degradaciju proteina (Carvajal i sar., 2008).

Kao marker epitelo-mezenhimalne transformacije i tubulointersticijskih oštećenja koristi se vimentin (Lan i sar., 2003). Literaturni podaci pokazuju da se u bubrezima pacova vimentin normalno eksprimira u podocitima i parijetalnim epitelnim ćelijama Boumanove kapsule, dok je u intersticijumu prisutan u endotelnim ćelijama arteriola i fibroblastima, ali ne i u tubulocitima proksimalnih tubula (Van Beneden i sar., 2008). Međutim, u bubrezima pacova zahvaćenim fibrozom ekspresija vimentina detektovana je i u oštećenim, atrofiranim i dediferenciranim tubulocitima, fibroblastima i miofibroblastima intersticijuma (Van Beneden i sar., 2008). Stoga, ekspresija vimentina u tubulocitima proksimalnih tubula može da ukaže na prisutna oštećenja u ovim delovima bubrega (Young i sar., 1995, Bravo i sar., 2003).

Remodelovanje ECM predstavlja važan fiziološki proces u normalnom rastu i razvoju. Međutim, u patološkim stanjima dolazi do narušavanja ravnoteže u sintezi i degradaciji ECM. Povećana sinteza, ali i smanjena degradacija različitih proteina (kolagen I, III i IV, fibronektin i laminin) doprinose ovoj neravnoteži i vode ka akumulaciji ECM (Lenz i sar., 2000, Ahmed i sar., 2007, Castro i sar., 2009). U bubrezima ovi procesi uključeni su u nastanak glomeruloskleroze i intersticijske fibroze (Lenz i sar., 2000). Glavni regulatori degradacije ECM su matriksne metaloproteinaze (MMP). Poznato je da se MMP-1, -2, -3, -8, -9 i -13 značajno ekspimiraju u bubrezima. Intersticijske kolagenaze (MMP-1, -8 i -13) degraduju kolagen I i III, želatinaze (MMP-2 i -9) predominantno razlažu kolagen IV, fibronektin i laminin, a stromeolizin (MMP-3) proteine bazalne membrane, naročito fibronektin (Chow i sar., 2007, Ahmed i sar., 2007). U bubrezima su prisutni enzimi koji regulišu aktivnost MMP, poznati kao tkivni inhibitori MMP (TIMP, engl. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinase*). TIMP-1 i TIMP-2 vrše inhibiciju enzima tako što blokiraju katalitičko mesto MMP, dok se TIMP-3 vezuje za ECM (Ahmed i sar., 2007, Chow i sar., 2007). Ravnoteža u sintezi i degradaciji ECM je preduslov za održanje strukturnog i funkcionalnog integriteta glomerula. Stoga, promene u ekspresiji ili aktivnosti MMP odražavaju se na promene u ECM, što može da dovede do glomeruloskleroze i opadanja bubrežne funkcije (Lenz i sar., 2000, Ahmed i sar., 2007, Castro i sar., 2009).

1.1.2. Faktori progresije FSGS

Hipertenzija i proteinurija predstavljaju najznačajnije faktore rizika koji doprinose progresiji FSGS (Remuzzi i sar., 2005, Abrantes i sar., 2006). Promene unutar glomerula, koje obuhvataju povećanje intraglomerularnog pritiska (glomerulska hipertenzija) i hiperfiltraciju, dovode do oštećenja i narušavanja selektivne propustljivosti filtracione membrane (Brenner, 1985, Ashab i sar., 1995). Literaturni podaci ukazuju da hronična hipertenzija dovodi do nastanka FSGS jer usled izloženosti mehaničkom istezanju podociti podležu strukturnim promenama i slabe njihove veze sa GBM, što dovodi do njihovog gubitka (Jefferson i sar., 2014). Ove promene su praćene pojavom proteinurije, a sve veće vrednosti proteinurije vode ka bržem napredovanju bolesti i lošijoj prognozi (De Boer i sar., 1999).

Mnogobrojne studije su pokazale da oksidativni stres ima značajnu ulogu u patogenezi i progresiji HBS (Sachse i sar., 2007, Kuo i sar., 2010, Sung i sar., 2013, Chen i sar., 2013, Tan i sar., 2015). Povećana produkcija reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) detektovana je kako kod pacijenata, tako i u eksperimentalnim modelima HBS (Galle i sar., 2001, Kuo i sar., 2010, Chen i sar., 2013, Tan i sar., 2015). U uslovima oksidativnog stresa aktiviraju se različiti mehanizmi koji dovode do hipertrofije, apoptoze, narušene permeabilnosti filtracione membrane i inflamacije, a ovi procesi doprinose progresiji bubrežne bolesti (Agarwal i sar., 2004, Chen i sar., 2013). Literaturni podaci ukazuju da je oksidativni stres blisko povezan sa patološkim promenama u hipertenziji. Usled oksidativnog stresa i narušene antioksidativne odbrane u uslovima hipertenzije, biodostupnost NO je smanjena, što dovodi do endotelne disfunkcije i remodelovanja u krvnim sudovima (Lassegue i sar., 2004, Paravicini i sar., 2006). Publikovani podaci ukazuju da u hroničnoj bubrežnoj slabosti oksidativni stres i hipertenzija imaju važnu ulogu u progresiji oštećenja i slabljenju bubrežne funkcije (Manning i sar., 2005, Dincer i sar., 2008, Meenakshi Sundaram i sar., 2014).

Hiperlipidemija je česta kod pacijenata sa HBS, naročito kod onih sa masivnom proteinurijom. U stanju hiperlipidemije može doći do proliferacije mezangijalnih ćelija, koje vrše povećanu produkciju citokina i faktora rasta, što doprinosi progresiji bubrežne bolesti (Ruan i sar., 2009).

1.1.3. Eksperimentalni model FSGS - adrijamicinska nefropatija

Adrijamicinska (ADR) nefropatija predstavlja eksperimentalni model koji se koristi kako bi se rasvetlili mehanizmi nastanka i progresije FSGS i u cilju što efikasnijeg usporavanja napredovanja bolesti. Pacovi tretirani ADR razvijaju FSGS, koja je praćena masivnom proteinurijom, hipoalbuminemijom i hiperholesterolemijom, stoga predstavljaju odgovarajući eksperimentalni model ove bolesti kod ljudi (Balakumar i sar., 2008, Lee i sar., 2011).

Adrijamicin (doksorubicin hidrohlorid) je antraciklinski antibiotik (izolovan iz *Streptomyces peucetius var. caesius*), koji se brzo preuzima iz plazme i deponuje u tkivima, uglavnom u bubrezima (Balakumar i sar., 2008, Lee i sar., 2011). Adrijamicin inicijalno u bubrezima uzrokuje oštećenja filtracione membrane, gde dolazi do fokalne fuzije pedicela, bubrenja i vakuolizacije podocita. Takođe, u endotelnim ćelijama kapilara glomerula dejstvom ADR smanjuje se produkcija proteoglikana i glikozaminoglikana, što posledično dovodi do redukcije glikokaliksa i gubitka negativnog naelektrisanja na površini endotelnih ćelija, što narušava selektivnu propustljivost filtracione membrane (Pippin i sar., 2008, Jeansson i sar., 2009). Ove promene uzrokuju nastanak proteinurije i segmentne glomeruloskleroze, koja vremenom napreduje i postaje globalna, a u tubulointercijumu dolazi do dilatacije i atrofije tubula i intersticijske inflamacije i fibroze (Pippin i sar., 2008).

Primenjuju se različiti režimi doziranja ADR, najčešće u opsegu od 2 do 10 mg/kg telesne mase životinje, aplicira se intravenozno (*i.v.*) ili intraperitonealno (*i.p.*) (Pippin i sar., 2008). Prednost korišćenja ADR u izazivanju eksperimentalnog modela FSGS se ogleda u tome što je moguće odrediti tačno vreme nastanka oštećenja u podocitima, a nakon

inicijalnog oštećenja nefropatija izazvana ADR poseduje hroničan i samopropagirajući karakter, što je odlika hroničnih progresivnih bubrežnih bolesti kod ljudi (Okuda i sar., 1986, Okuda i sar., 1986a, Pippin i sar., 2008).

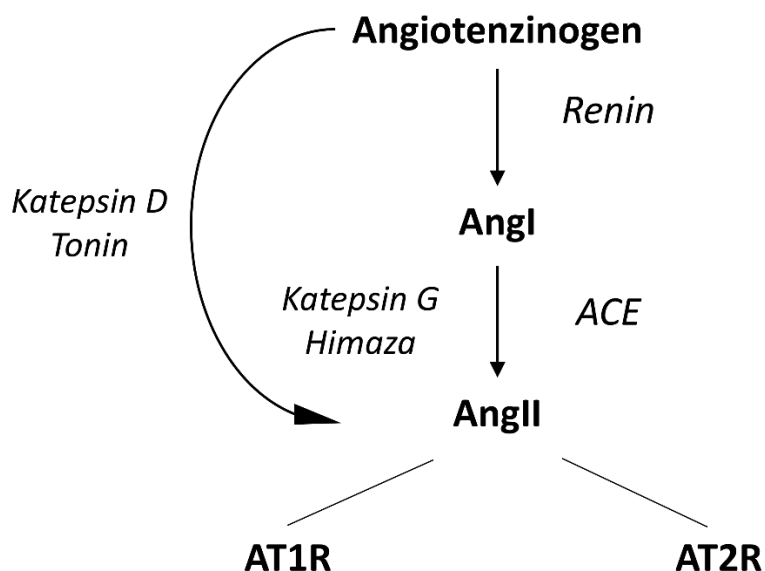
U kliničkoj praksi ADR se koristi u tretmanu različitih vrsta karcinoma (Balakumar i sar., 2008). Adrijamicin u ćeliji dovodi do promena u strukturi DNK, interkalacijom antraciklinskog dela molekula adrijamicina između susednih baznih parova u lancu DNK uzrokuje se odvajanje lanaca i sprečava se transkripcija. Takođe, ADR inhibira topoizomerazu II, ima direktne štetne efekte u ćelijskoj membrani, stimuliše apoptozu i nekrozu (Quiles i sar., 2002, Lee i sar., 2011, Aryal i sar., 2014). Molekul ADR iz kvinonske strukture, primanjem jednog elektrona, prelazi u semikvinon, a primanjem još jednog elektrona u hidrokvinon. Kada semikvinon reaguje sa molekulom kiseonika nastaju superoksidni anjon ($\cdot\text{O}_2^-$) i vodonik peroksid (H_2O_2) (Zima i sar., 1998). U prisustvu prelaznih metala (gvožđe, bakar) od H_2O_2 nastaje vrlo toksičan hidroksil radikal ($\text{HO}\cdot$) (Fentonovom reakcijom ili Haber Weissovom reakcijom uz prisustvo $\cdot\text{O}_2^-$) (Galle, 2001). Literaturni podaci ukazuju da ADR usled povećane produkcije ROS dovodi do oštećenja podocita i uzrokuje apoptozu, a utiče i na oksidativna oštećenja komponenti GBM (Quiles i sar., 2002). Nakon inicijalnog generisanja ROS usled dejstva ADR, lokalno infiltrirani neutrofil i aktivirane mezangijalne ćelije u glomerulima nastavljaju da produkuju ROS (Deman i sar., 2001). Brojna istraživanja izvedena na eksperimentalnim modelima ukazuju na značajnu ulogu oksidativnog stresa u nastanku i progresiji nefropatije izazvane adrijamicinom (Yagmurca i sar., 2004, Tan i sar., 2015, Zima i sar., 1998, Fadiliglu i sar., 2003, Arozal i sar., 2010).

1.2. Renin angiotenzin sistem

Renin angiotenzin sistem (RAS) učestvuje u kontroli arterijskog krvnog pritiska i balansu vode i elektrolita. S druge strane, RAS ima važnu ulogu i u regulaciji patofizioloških procesa u bubrezima. Literaturni podaci ukazuju na ulogu RAS u nastanku proteinurije i razvoju glomeruloskleroze i tubulointersticijske fibroze (Remuzzi i sar., 2005, Sachse i sar., 2007).

U bubrezima su prisutne sve komponente RAS: renin, angiotenzinogen, angiotenzin I (AngI), angiotenzin konvertujući enzim (ACE), AngII, receptor za angiotenzin II tipa 1 (AT1R) i tipa 2 (AT2R) (Miyata i sar., 1999, Arendshorst i sar., 1999, Berry i sar., 2001). AngII nastaje od AngI aktivnošću ACE i predstavlja glavni efektor ovog sistema (**Slika 1-3**). Pored toga, poznati su i alternativni putevi formiranja AngII: enzimi himaze i katepsin G katalizuju nastanak AngII od AngI, a enzimi tonin i katepsin D angiotenzinogen direktno prevode u AngII (Berry i sar., 2001).

AngII je snažan vazokonstriktor, a osim toga učestvuje u regulaciji glomerulske filtracije, utiče na reapsorpciju Na^+ , Cl^- , ekskreciju K^+ u tubulima i retenciju vode, stimuliše oslobađanje aldosterona iz nadbubrežne žlezde i antidiuretičkog hormona iz hipofize (Berry i sar., 2001, Fujita i sar., 2012). S druge strane, pokazano je da AngII doprinosi progresiji bubrežne bolesti aktiviranjem signalnih puteva koji stimulišu hipertrofiju, proliferaciju, inflamaciju i fibrozu (Berry i sar., 2001, Sachse i sar., 2007, Roson i sar., 2010).



Slika 1-3. Šematski prikaz komponenti renin angiotenzin sistema i klasični i alternativni putevi nastanka angiotenzina II. AngI - angiotenzin I, AngII - angiotenzin II, ACE - angiotenzin konvertujući enzim, AT1R i AT2R - receptori za angiotenzin II tipa 1 i tipa 2.

AngII ispoljava svoje hemodinamske i nehemodinamske efekte vezujući se za dva tipa membranskih receptora, AT1R i AT2R, koji predstavljaju do sada najbolje okarakterisane receptore na molekularnom nivou (Berry i sar., 2001). Aktivacija AT1R stimuliše fosfolipazu C (PKC) prevodi PIP2 u inozitol-1,4,5-trisfosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). Novonastali IP3 se vezuje za receptor na sarkoplazmatičnom retikulumu i otvara kanal koji dovodi do povećanja unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} . Vezivanjem Ca^{2+} za kalmodulin aktivira se kinaza koja fosforiliše lake lance miozina, potom aktin i miozin interaguju dovodeći do kontrakcije mišićnih ćelija (vazokonstrikcija). DAG aktivira PKC koja zatim fosforiliše i menja katalitičke aktivnosti drugih proteina. AngII vezujući se za AT1R aktivira signalne puteve koji obuhvataju fosforilaciju i aktivaciju različitih tirozin kinaza, koje promovišu aktivnosti slične onim koje izazivaju citokini (Yan i sar., 2003). Takođe, AngII vezivanjem za AT1R aktivira NADPH oksidazu, koja vrši povećanu produkciju ROS koje su uključene u patofiziološke procese u bubrezima (Fujita i sar., 2012, Sachse i sar., 2007).

Mnogo manje je poznata fiziološka uloga AT2R, ali se smatra da AngII vezivanjem za ovaj receptor ispoljava efekte suprotne onim nastalim aktivacijom AT1R. AngII vezujući se

za AT2R stimuliše vazodilataciju i inhibira hipertrofiju i proliferaciju (Roczniak i sar., 1999, Siragy i sar., 2000). Nakon rođenja ekspresija AT2R naglo opada, dok je prisutna u fetalnom tkivu, ukazujući na moguću ulogu ovog receptora u razvoju i morfogenezi organa (Berry i sar., 2001).

1.2.1. Uloga RAS u patogenezi HBS

Literaturni podaci ukazuju da RAS ima značajnu ulogu u razvoju glomeruloskleroze i fibroze tubulointersticijuma i u progresiji HBS. Istraživanja Fujimoto i saradnika (2008) su pokazala da tretman ARB ili ACEI sprečava vazokonstrukciju eferentne arteriole glomerula posredovanu AngII, što dovodi do smanjenja intraglomerularnog filtracionog pritiska i redukcije proteinurije, usporavajući dalju progresiju HBS. Brojne kliničke studije su pokazale da primena ARB ili ACEI smanjuje proteinuriju nezavisno od sniženja krvnog pritiska, ukazujući na to da AngII ima direktan uticaj na bubrege. Naime, pokazano je da AngII preko AT1R stimuliše apoptozu u podocitima (Ding i sar., 2002) i da je prekomerna ekspresija AT1R u podocitima jedan od uzroka glomeruloskleroze (Hoffmann i sar., 2004). AngII vezujući se za AT1R aktivira signalne puteve koji dovode do povećane produkcije ROS, što je povezano sa oštećenjima glomerula (Paravicini i sar., 2006, Sachse i sar., 2007, Chen i sar., 2013). Istraživanja Fujimoto i saradnika (2008) pokazala su da tretman ARB pored antihipertenzivnog, ispoljava i renoprotektivne efekte, koji se mogu pripisati smanjenoj produkciji ROS u glomerulima i sniženom intraglomerularnom pritisku, što dovodi do poboljšanja glomerulske filtracije i redukcije proteinurije u HBS.

U našim dosadašnjim istraživanjima uloge RAS u patogenezi i progresiji FSGS, ispitivani su efekti hroničnog tretmana kaptoprilom (ACEI) i hidralazinom (vazodilatator) na progresiju ADR nefropatije kod spontano hipertenzivnih (SH) pacova (Đukanovići sar., 1994, Jovanovic i sar., 1996, Jovanovic i sar., 1998, Jovanovic i sar., 2002). Dobijeni rezultati pokazali su da je kaptopril snizio krvni pritisak, dok je uz prisutnu proteinuriju u bubrezima smanjio glomeruloskleroza i ekspanziju mezangijuma, što je doprinelo usporavanju

progresije bubrežne slabosti u ranoj fazi ADR nefropatije (Jovanovic i sar., 1996, Jovanovic i sar., 1998, Jovanovic i sar., 2002). U poređenju sa hidralazinom, tretman kaptoprilom je bio efikasniji u sprečavanju strukturnih oštećenja u bubrežima (Jovanovic i sar., 2002, Đukanović sar., 1994).

Takođe smo u našim istraživanjima ispitivali efekte hronične primene losartana (DUP 153, Du Pont), selektivnog blokatora AT1R, na progresiju ADR nefropatije kod SH pacova (Mihailović-Stanojević, 2005). Šestonedeljni tretman losartanom doveo je do sniženja krvnog pritiska, smanjenja glomeruloskleroze i poboljšanja bubrežne funkcije, dok je dvanaestonedeljni tretman uticao na dodatno smanjenje glomeruloskleroze, atrofije i dilatacije tubula, intersticijske inflamacije i fibroze. Bez obzira na dužinu trajanja tretmana, losartan je u ovom istraživanju značajno snizio proteinuriju (Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009), jedan od dva glavna faktora koji utiču na brzinu progresije HBS (Mihailović-Stanojević, 2002). U pomenutim istraživanjima (Mihailović-Stanojević, 2005) pokazano je da RAS ima značajnu ulogu u patogenezi FSGS kod SH pacova, kada je ona izazvana sa adrijamicinom. Takođe, rezultati dobijeni u ovim istraživanjima ukazali su na potrebu za daljim ispitivanjima efekata kombinovanog tretmana ARB i antioksidanasa ili antagonista drugih sistema, koji interaguju sa RAS ili su na neki drugi način uključeni u progresiju bolesti, kako bi se postigli bolji terapijski rezultati i poboljšala prognoza kod pacijenata sa FSGS.

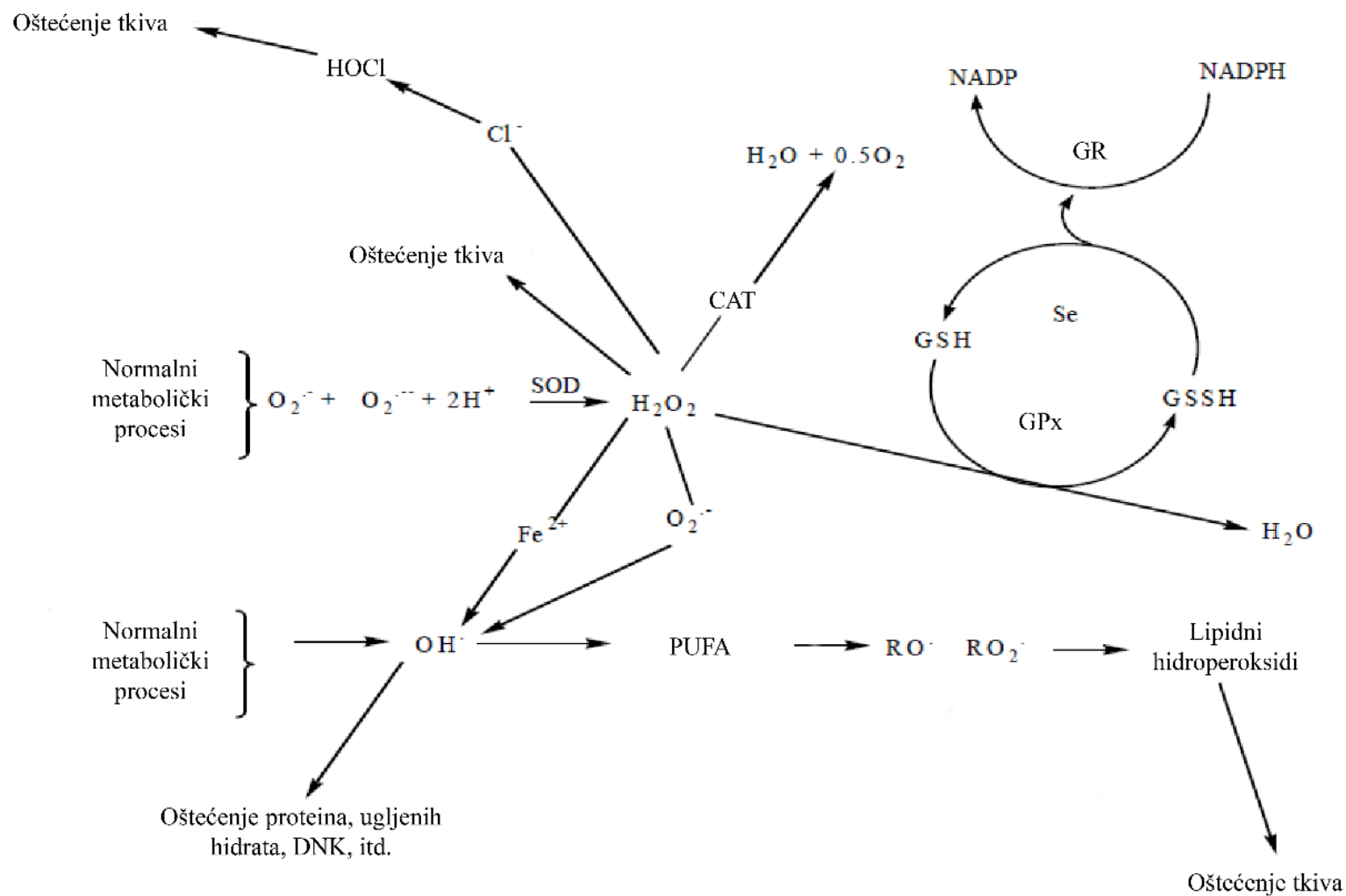
1.3. Oksidativni stres i antioksidativni sistem

Mnogobrojni fiziološki procesi u ćeliji podrazumevaju stvaranje slobodnih radikala, ROS i reaktivnih vrsta azota (RNS, engl. *reactive nitrogen species*), neophodnih za normalno funkcionisanje ćelije, regulisanje unutarćelijske komunikacije i obavljanje niza fizioloških funkcija u organizmu, kao što su proces ćelijske proliferacije, deobe i apoptoze. U uslovima kada su antioksidativni mehanizmi oslabljeni, disbalans između produkcije slobodnih radikala i njihove neutralizacije odbrambenim mehanizmima dovodi do nastanka oksidativnog stresa (Galle, 2001). Slobodni radikali predstavljaju atome, molekule ili jone sa nesparenim elektronima, koji su izuzetno nestabilni i stupaju u reakcije sa drugim slobodnim radikalima i neradikalnim molekulima. Najznačajnije ROS su superoksidni anjon ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksil ($\text{HO}\cdot$), peroksil ($\text{RO}_2\cdot$), alkoksil ($\text{RO}\cdot$) i hidroperoksil ($\text{HO}_2\cdot$) radikal, a iz grupe neradikalnih ROS, to su vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorna kiselina (HOCl) i singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$) (**Slika 1-4.**) (Bahorum i sar., 2006). Značajne RNS su azot monoksid ($\text{NO}\cdot$), azot dioksid ($\text{NO}_2\cdot$) i peroksinitriti ($\text{ONOO}\cdot$). U stanju oksidativnog stresa, kada produkcija reaktivnih vrsta prevazilazi prirodni antioksidativni kapacitet organizma, reaktivne vrste ispoljavaju niz štetnih efekata koji su uglavnom posredovani modifikacijom DNK, proteina i lipida (Chen i sar., 2013, Aryal i sar., 2014).

Antioksidativni sistem organizma čini set različitih enzimskih i neenzimskih komponenti, koje antioksidativni efekat ostvaruju sprečavanjem stvaranja radikala, neutralizacijom ili umanjnjem efekata njihovog stvaranja i učestvovanjem u reparaciji oksidativno izmenjenih biomolekula. Superoksid dismutaza (SOD, engl. *superoxide dismutase*), katalaza (CAT engl. *catalase*), glutation peroksidaza (GP_x , engl. *glutathione peroxidase*) i glutation reduktaza (GR, engl. *glutathione reductase*) su neki od enzima koji učestvuju u antioksidativnoj odbrani (**Slika 1-4.**). Kod sisara razlikujemo tri izoforme SOD:

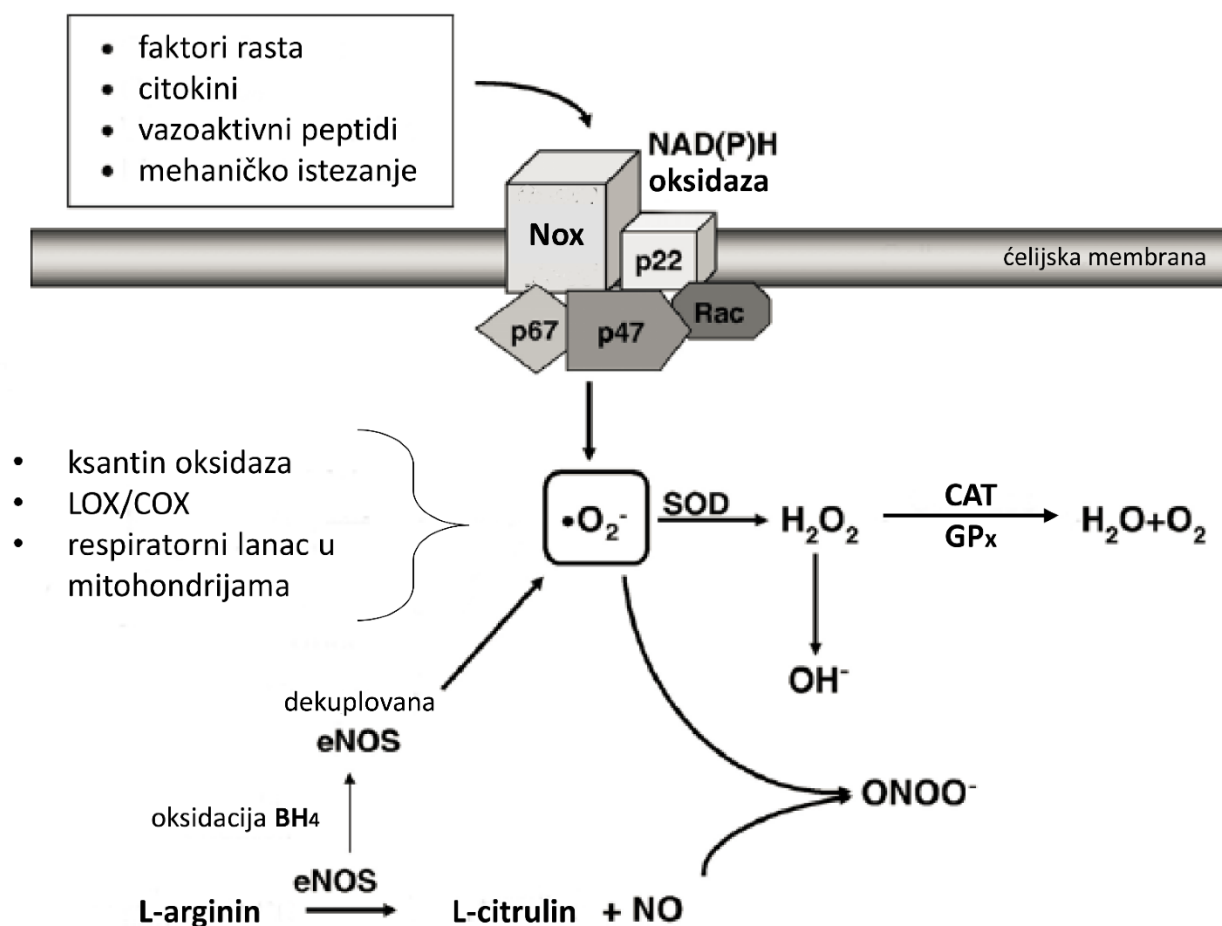
citosolna Cu/Zn-SOD (SOD1), mitohondrijska Mn-SOD (SOD2) i ekstracelularna Cu/Zn-SOD (EC-SOD) (McCord i sar., 1969). SOD vrši dismutaciju $\cdot\text{O}_2^-$ u H_2O_2 i molekul kiseonika (McCord i sar., 1969). Aktivnošću CAT se H_2O_2 prevodi u molekul vode. Antioksidativna uloga GR sastoji se u održavanju glutaciona u ćeliji u redukovanom stanju (GSH), što je neophodno za aktivnost GP_x (Bahorun i sar., 2006). GP_x katalizuje reakciju između H_2O_2 i GSH, gde je GSH donor elektrona i prevodi se u oksidovani glutation (GSSG). GR redukuje GSSG nazad u GSH, a donor elektrona je NADPH. GSH efikasno neutrališe slobodne radikale i druge ROS, kao što su hidroksil radikali, lipid peroksid radikali, H_2O_2 i ONOO^- (Lee i sar., 2010).

Neenzimske komponente antioksidativnog sistema organizma čine liposolubilni i hidrosolubilni antioksidansi, kao što su vitamin A, C i E (tokoferoli i tokotrienoli), karotenoidi, koenzim Q, glutation, cistein, ksantin, mokraćna kiselina, haptoglobin, albumin, transferin, feritin, laktoferin, ceruloplazmin, biliverdin, bilirubin, melatonin, poliamini itd. (Halliwell, 1999).



Slika 1-4. Reaktivne vrste kiseonika i antioksidativni enzimi. SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, GP_x – glutation peroksidaza, GR – glutation reduktaza, PUFA – polinezasićene masne kiseline (Bahorum i sar., 2006).

Ranija istraživanja su utvrdila da u ćeliji nekoliko enzima mogu da stvaraju $\cdot\text{O}_2^-$, te predstavljaju potencijalni izvor ROS: NADH ubikvinon oksidoreduktaza u mitohondrijama, lipooksigenaza (LOX), ciklooksigenaza (COX), mijeloperoksidaza, ksantin oksidaza, dekuplovana azot-monoksid sintaza (NOS) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaza (Paravicini i sar. 2006) (**Slika 1-5**). U uslovima kada supstrat L-arginin ili kofaktor BH_4 nisu dostupni u optimalnoj koncentraciji, normalna funkcija NOS je narušena (dekuplovani enzim) i tada se stvara $\cdot\text{O}_2^-$ (Andrew i sar., 1999, Baylis i sar., 2012). Za razliku od drugih oksidoreduktaza, NADPH oksidaza je enzim čija primarna funkcija jeste stvaranje ROS i predstavlja glavni izvor $\cdot\text{O}_2^-$ u ćeliji (Lassegue i sar., 2004). NADPH oksidaza je prvo identifikovana u fagocitima, a potom su slični enzimski kompleksi otkriveni i u drugim ćelijama. Prethodna istraživanja su pokazala da primarni izvor oksidativnog stresa u korteksu bubrega predstavlja upravo povećana produkcija ROS poreklom od NADPH oksidaze (Nistala i sar., 2008, Chen i sar., 2013) i da je NADPH oksidaza značajna komponenta signalnog puta kojim AngII preko AT1R dovodi do povećanog oksidativnog stresa u bubrezima (Chen i sar., 2013, Nistala, 2008, Majzunova i sar., 2013).



Slika 1-5. Različiti izvori reaktivnih vrsta kiseonika i azota u ćeliji. Enzimski kompleks NADPH oksidaza: Nox – transmembranska katalitička subjedinica, p22 – membranska regulatorna subjedinica, p67, p47 i Rac – citosolne regulatorne subjedinice; LOX – lipooksidaza; COX – ciklooksidaza; eNOS – endotelna azot-monoksid sintaza; BH₄ – tetrahidrobiopterin; SOD – superoksid dismutaza; CAT – katalaza; GPx – glutation peroksidaza (modifikovano od Paravicini i sar., 2006).

1.3.1. NADPH oksidaza

NADPH oksidaza predstavlja enzimski kompleks sastavljen iz više subjedinica od kojih je bar jedna katalitička i generiše $\cdot\text{O}_2^-$ prilikom transfera elektrona sa NADPH na molekul kiseonika (Chen i sar., 2013) (**Slika 1-5.**). Katalitička subjedinica (Nox) čini jezgro enzima i sastoji se od šest visoko konzervativnih transmembranskih domena. Transmembranski domeni III i V sadrže po dva histidina, preko kojih su povezani sa dva hem-a. Citoplazmatski COOH terminus sadrži konzervativni flavin adenin dinukleotid (FAD) i NADPH vezujući domen, a elektroni se prenose od NADPH preko FAD, prve i druge hem prostetične grupe i konačno do kiseonika (Bedard i sar., 2007). Do sada je identifikovano nekoliko izoformi katalitičke subjedinice NADPH oksidaze: Nox1-5 i Duox1-2. Nox2 (takođe poznata kao gp91^{phox}) predstavlja prototip katalitičke subjedinice NADPH oksidaze koja je prvo identifikovana u fagocitima. Nox1, Nox3 i Nox4 su po strukturnoj organizaciji i molekularnoj težini slične Nox2 (Chen i sar., 2013, Touyz i sar., 2012). Nox subjedinice se vezuju za jednu ili više regulatornih subjedinica, koje su lokalizovane u ćelijskoj membrani (p22^{phox}, Noxo1) i citosolu (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, Noxa1 i Rac GTPaze) (Bedard i sar., 2007, Chen i sar., 2013). Translokacija i vezivanje citosolne p47^{phox} za membranski kompleks (Nox2 i p22^{phox}) predstavljaju ključne događaje za aktivaciju NADPH oksidaze i generisanje $\cdot\text{O}_2^-$ (Chen i sar., 2013). S druge strane, novije studije su pokazale da Nox4 generiše H_2O_2 , što je čini jedinstvenom među ostalim izoformama NADPH oksidaze (Babelova i sar., 2012, Khodo i sar., 2012). Konstitutivno aktivna Nox4 povezana je sa p22^{phox} i ne zahteva druge subjedinice za aktivaciju (Cat i sar., 2013).

NADPH oksidaza se smatra prototipom proinflamatornog enzima (Chen i sar., 2013), a produkovane ROS predstavljaju važne medijatore inflamatornih procesa (Babelova i sar., 2012). Poznato je da Nox2 u fagocitima ima ulogu u inflamaciji i urođenom imunitetu. Međutim, Zhang i saradnici (2009) su uočili da Nox2- i p47^{phox}-*knockout* miševi ispoljavaju značajno povećan sistemski inflamatorni odgovor na akutnu primenu lipopolisaharida (LPS),

endotoksina poreklom iz bakterija, a njihovi rezultati su ukazali na potencijalnu anti-inflamatornu ulogu NADPH oksidaze. Smatra se da pojačan inflamatorni odgovor, uočen u odsustvu Nox2, može nastati usled: 1) smanjenog kapaciteta degradacije materijala unetog fagocitozom u Nox2-deficijentnim ćelijama; 2) nedostatka ROS-zavisnih signalnih puteva regulacije u Nox2-deficijentnim fagocitima: ROS-zavisne apoptoze u inflamatornim ćelijama i vodonik peroksidom izazvane inhibicije produkcije IL-8; ili usled 3) narušene oksidativne inaktivacije proinflamatornih medijatora, što može produžiti inflamatorni odgovor (Bedard i sar., 2007). Takođe su i novija istraživanja potvrdila da Nox2 sprečava inflamaciju i oštećenja tkiva aktivacijom mehanizama koji stimulišu apoptozu i klirens neutrofila (Singel i sar., 2016). Pokazano je da Nox2 može da aktivira Nrf-2 (jedarni faktor eritroid 2-povezani faktor-2, engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) signalni put, koji stimuliše antioksidativne procese u ćeliji, ali i anti-inflamatorni odgovor, koji podrazumeva inhibiciju NF- κ B signalnog puta i produkciju proinflamatornih citokina i hemokina (Singel i sar., 2016). U citoplazmi Nrf-2 je u neaktivnom stanju vezan za Keap1 (Kelch-sličan ECH-pridruženi protein 1, engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*), represorni molekul koji olakšava degradaciju Nrf-2. Keap1 sadrži nekoliko cisteinskih rezidua koje služe kao senzori intraćelijskog redoks stanja. Oksidativna ili kovalentna modifikacija tiola u nekim od ovih rezidua cisteina dovodi do konformacione promene u Nrf-2/Keap1 kompleksu i dolazi do oslobađanja Nrf-2. Potom, Nrf-2 odlazi u jedro gde formira heterodimere sa kofaktorima i indukuje transkripciju gena nekoliko antioksidativnih i detoksikacionih enzima. Aktivacija Nrf2 takođe inhibira aktivnost NF- κ B, čime se sprečavaju procesi inflamacije (Ruiz i sar., 2013).

Pokazano je da Nox4, kao konstitutivni generator H_2O_2 , ima protektivnu ulogu u endotelu (Schroder i sar., 2012, Ray i sar., 2011, Touyz i sar., 2012), gde endogeni H_2O_2 ne narušava bioaktivnost NO i putem različitih mehanizama dovodi do vazodilatacije: aktivira i stimuliše ekspresiju eNOS, aktivira solubilnu guanil ciklazu ili protein kinazu G (Touyz i sar., 2012, Schroder i sar., 2012). U istraživanju na transgenim miševima sa povećanom ekspresijom Nox4 u endotelu, Ray i saradnici (2011) su pokazali da je vazodilatacija posledica povećane produkcije H_2O_2 i nenarušene bioaktivnosti NO. S druge strane, istraživanja Schroder i saradnika (2012), izvedena na Nox4-*knockout* miševima, pokazala su

da je nedostatak Nox4 bio povezan sa smanjenom ekspresijom eNOS i produkcijom NO, što je dovelo do endotelne disfunkcije. Prethodna istraživanja su pokazala da H₂O₂ prisutan u niskim koncentracijama ima pozitivne efekte u vaskularnom sistemu: H₂O₂ deluje kao vazodilatator kada aktivira protein kinazu-G I α , a osim toga, H₂O₂ može da stimuliše aktivnost eNOS i produkciju NO u endotelnim ćelijama kada aktivira PI3-K/Akt (fosfatidilinozitol-3 kinaza/Akt)-zavisnu eNOS serin 1179 fosforilaciju i ERK1/2 (ekstracelularnim signalom-regulisana kinaza 1/2) (Cai, 2005). Pretpostavka je da su ovo neki od mehanizama kojim Nox4 može da doprinese očuvanju endotelne funkcije. S druge strane, Khodo i saradnici (2012) su pokazali da Nox4-deficijentni miševi nakon izazivanja hronične bubrežne slabosti razvijaju intenzivniju fibrozu i apoptozu tubulocita, što je bilo praćeno smanjenom ekspresijom Nrf-2 proteina. Isti autori su pokazali da Nox4 može da aktivira Nrf-2 signalni put u tubulocitima. Kako je H₂O₂ važan regulator stabilnosti Nrf-2 putem oksidacije Keap1 (Fourquet i sar., 2010), gore pomenuti autori su pretpostavili da H₂O₂, produkovan aktivnošću Nox4, može da oksiduje specifične rezidue cisteina u Keap1, što posledično dovodi do stabilizacije transkripcionog faktora Nrf-2. Publikovani podaci drugih istraživanja (Nlandu-Khodo i sar., 2016) takođe pokazuju da je Nox4 važan regulator aktivnosti Nrf-2 u tubulocitima bubrega, ukazujući na potencijalu ulogu Nox4 u regulaciji antioksidativnih procesa.

1.3.2. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi HBS

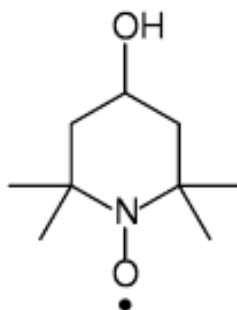
Publikovani podaci brojnih istraživanja (Nistala i sar., 2008, Chen i sar., 2013, Majzunova i sar., 2013) pokazuju da NADPH oksidaza predstavlja primarni izvor oksidativnog stresa u bubrežima. Komponente NADPH oksidaze koje su detektovane u bubrežima uključuju p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, Rac1/2, kao i različite izoforme katalitičke subjedinice: Nox1, Nox2 i Nox4. U bubrežima je predominantno zastupljena Nox4, koja je detektovana u proksimalnim i distalnim tubulima, sabirnim kanalićima i u glomerulima (Gill i sar., 2006). U podocitima, mezigijalnim ćelijama i endotelu glomerula prisutna je Nox2

izoforma (Gill i sar., 2006), dok su p47^{phox}, p67^{phox} i p22^{phox} detektovane u podocitima, endotelnim i ćelijama glatkih mišića krvnih sudova, mezangijalnim ćelijama, fibroblastima, uzlaznom delu Henlejeve petlje i distalnim sabirnim kanalčićima, uključujući zonu *macula densa* (Jiang, 2009, Sedeek i sar., 2013).

AngII vezivanjem za AT1R stimuliše aktivnost NADPH oksidaze, koja predstavlja glavni izvor $\cdot\text{O}_2^-$ u bubrezima (Paravicini i sar., 2006, Sachse i sar., 2007, Roson i sar., 2010). Iako nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi, smatra se da protein kinaza C, fosfolipaze, Src tirozin kinaze, fosfatidilinositol 3-kinaza i Rac mogu biti uključene u aktivaciju NADPH oksidaze stimulisane AngII u vaskularnim ćelijama (Nguyen Dinh Cat i sar., 2013). Rezultati *in vitro* istraživanja potvrdili su da je povećana produkcija $\cdot\text{O}_2^-$, poreklom od NADPH oksidaze, stimulisana AngII u endotelnim i ćelijama glatkih mišića krvnih sudova, mezangijalnim ćelijama i fibroblastima (Fujimoto i sar., 2008). Takođe, u eksperimentalnim modelima FSGS i dijabetesne nefropatije detektovana je prekomerna produkcija ROS poreklom od NADPH oksidaze u podocitima (Chen i sar., 2013). Whaley-Connell i saradnici (2008) su pokazali da je kod Ren2 pacova prisutna povećana produkcija ROS u korteksu bubrega uz povećanu ekspresiju Nox2, AngII i AT1R. Takođe, histopatološke promene u bubrezima ovih pacova obuhvatale su gubitak pedicela podocita i narušen integritet filtracione membrane. Ista grupa autora pokazala je da je blokada AT1R dovela do smanjene ekspresije Nox2 i aktivnosti NADPH oksidaze, što je bilo praćeno i smanjenim strukturnim oštećenjima podocita (Whaley-Connell i sar., 2010). Međutim, specifična uloga NADPH oksidaze u bubrezima još nije dovoljno razjašnjena (Sedeek i sar., 2013).

1.3.3. Tempol

Tempol (4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil) predstavlja najintenzivnije proučavano jedinjenje iz grupe nitroksida (**Slika 1-6.**). Predstavlja stabilni nitroksid radikal, amfolit (reaguje kao kiselina i kao baza) male molekulske mase (172 kDa), koji nesmetano prolazi kroz ćelijsku membranu. Ranija istraživanja ukazala su da je tempol jedan od najpotentnijih nitroksida i da štiti ćelije od ROS i RNS (Wilcox i sar., 2008).

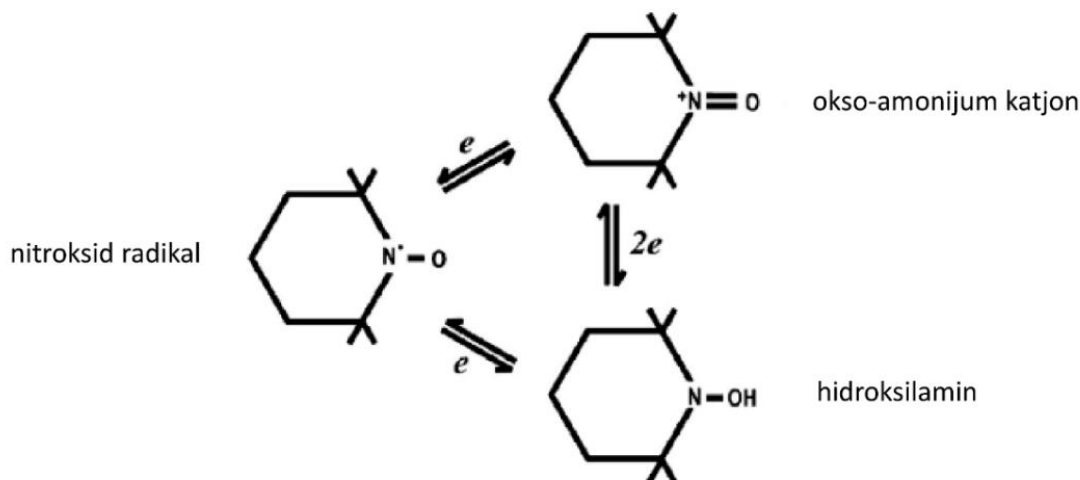


Slika 1-6. Tempol (4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil).

U reakcijama, prilikom transfera jednog ili dva elektrona, tempol može da prolazi kroz tri različite forme: nitroksid radikal, hidroksilamin (redukovani oblik) ili okso-amonijum katjon (oksidovani oblik) (**Slika 1-7.**). Prelazak iz jednog oblika u drugi je brz i olakšan je konformacionim promenama „čamca i stolice“, koje su u osnovi katalitičke prirode ovih reakcija (Wilcox i sar., 2008).

Tempol u reakciji sa $\cdot\text{O}_2^-$ katalizuje nastanak H_2O_2 delujući na sličan način kao SOD, te je stoga poznat i kao SOD mimetik (**Slika 1-8. gore**) (Wilcox i sar., 2008). U *in vitro* studiji na ćelijama glatkih mišića krvnih sudova stimulisanim AngII, pokazano je da tretman tempolom znatno efikasnije inhibira stvaranje $\cdot\text{O}_2^-$, kako u odnosu na druge često korišćene antioksidanse, tako i u odnosu na vitamine C i E (Luo i sar., 2009). Tempol može da se ponaša i kao sakupljač slobodnih radikala (**Slika 1-8. dole**), tj. može direktno da uklanja ili

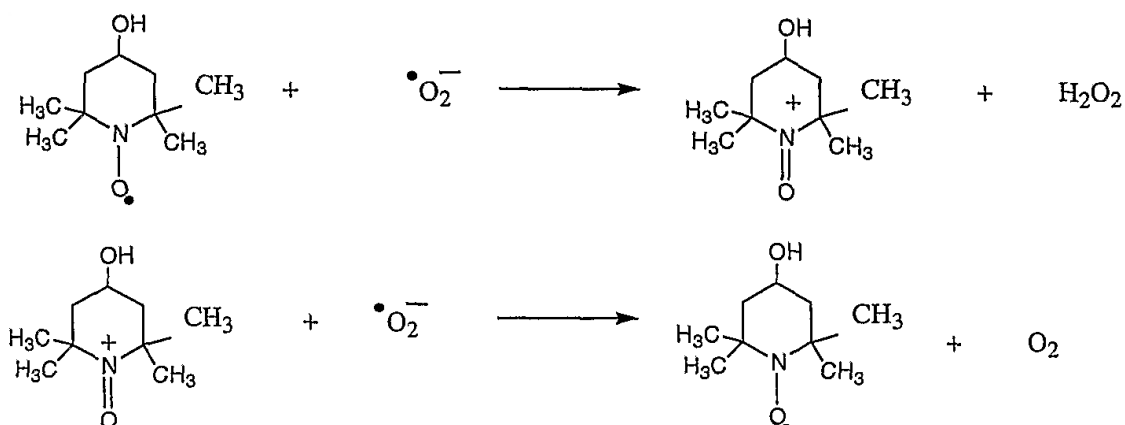
neutrališe $\cdot\text{O}_2^-$ zahvaljujući prelasku iz forme okso-amonijum katjona u nitroksid radikal (Krishna i sar., 1992, Wilcox i sar., 2008).



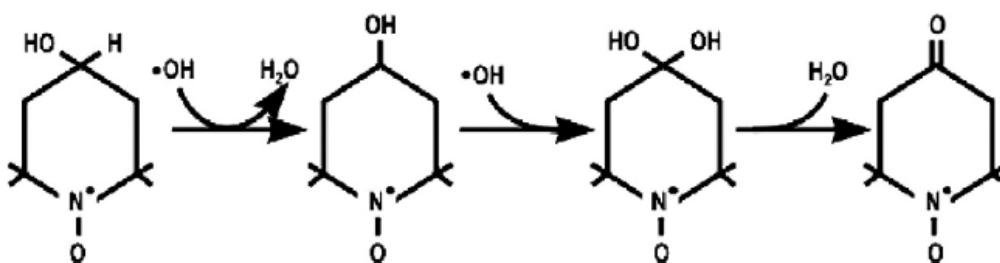
Slika 1-7. Redoks reakcije nitroksidne grupe.

Poznato je da tempol metaboliše H_2O_2 slično kao CAT (Wilcox i sar., 2008). Osim toga, tempol u interakciji sa redukovanim prelaznim metalima, kao što su gvožđe ili bakar, dovodi do njihove oksidacije, sprečavajući na taj način nastanak hidroksil radikala ($\text{HO}\cdot$) poreklom od H_2O_2 (Wilcox i sar., 2008). Mnogobrojne studije su pokazale da nitroksidi metabolišu ili sprečavaju generisanje singlet kiseonika, peroksil radikala, nitroksil anjona, produkata lipidne peroksidacije (Wilcox, 2010).

Opisana je katalitička aktivnost tempola u reakciji sa vrlo jakim oksidansom ONOO^- (Carroll i sar., 2000). Naime, tempol prvo reaguje sa hidroksil, karbonatnim ili azot dioksid radikalima, koji su nastali samom aktivnošću ONOO^- , pri čemu se tempol oksiduje i prelazi u okso-amonijum katjon. Potom, tempol u formi okso-amonijum katjona reaguje sa ONOO^- pri čemu se redukuje u nitroksid radikal, dok se ONOO^- oksiduje i nastaju NO i O_2 . Istraživanja Saito i saradnika (2003) pokazala su da $\text{HO}\cdot$ može da interaguje sa četvrtom pozicijom u piperidinskom prstenu tempola, pri čemu nastaje 4-okso-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil, koji se u ćelijama vrlo brzo metaboliše u tempol (**Slika 1-9**).



Slika 1-8. Reakcija tempola kao mimetika SOD-a (gore) i sakupljača slobodnih radikala (dole).



Slika 1-9. Redoks reakcija četvrte pozicije u piperidinskom prstenu tempola.

Literaturni podaci ukazuju na protektivnu ulogu tempola u različitim eksperimentalnim modelima hipertenzije, jer utiče na smanjenje oksidativnog stresa i sniženje krvnog pritiska, sprečavajući inaktivaciju NO i stimulišući njegovu produkciju (Dobrian i sar., 2001, Sainz i sar., 2005, Elmarakby i sar., 2007, Wilcox i sar., 2008). Pored antioksidativnog, opisan je i anti-inflamatorni efekat tempola u istraživanjima Roson i saradnika (2010). Takođe je pokazano da tretman tempolom smanjuje oksidativni stres i poboljšava bubrežnu funkciju u različitim eksperimentalnim modelima hronične bubrežne slabosti, kao što su nefrektomija (hirurško odstranjivanje levog i 2/3 desnog bubrega), dijabetesna nefropatija, cisplatinom

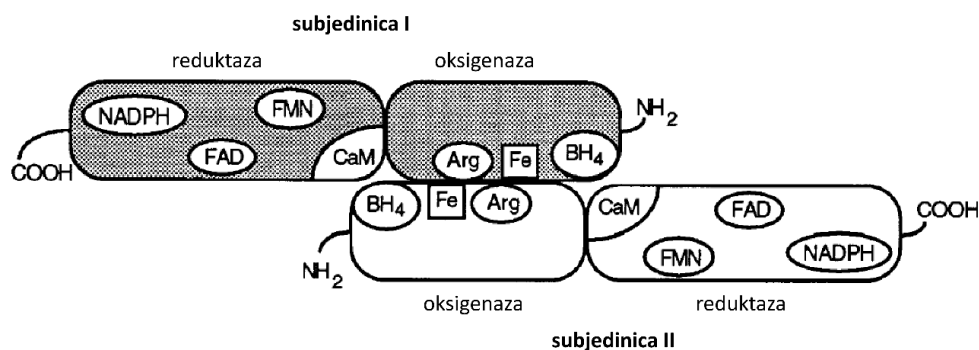
izazvana nefropatija i dr. (Vaziri i sar., 2003, Luan i sar., 2012, Ahmed i sar., 2014, Wilcox i sar., 2010).

Jani i saradnici (2012) su u *in vitro* studiji ispitivali antioksidativne i antihipertenzivne efekte novosintetisanog leka, koji je dobijen inkorporisanjem različitih antioksidanasa u bifenilsartan (ARB). Rezultati njihovih istraživanja pokazali su da je prilikom inkorporisanja nitroksida u milfasartan (ARB), novonastali nitrasartan pored antioksidativne aktivnosti zadržao i sposobnost blokade AT1R. Pored toga, u *in vitro* studiji na pacovima sa renovaskularnom hipertenzijom pokazan je sinergistički efekat losartana i tempola u pogledu sniženja krvnog pritiska (Dobrian i sar., 2001). Isti autori su na osnovu dobijenih rezultata pretpostavili da kombinovani tretman stimuliše mehanizme koji dovode do smanjene produkcije superoksidnog anjona i nitrotirozina u bubrezima ovih pacova, ukazujući na udružen pozitivan efekat losartana i tempola u ovom eksperimentalnom modelu (Dobrian i sar., 2001).

1.4. Azot-monoksid

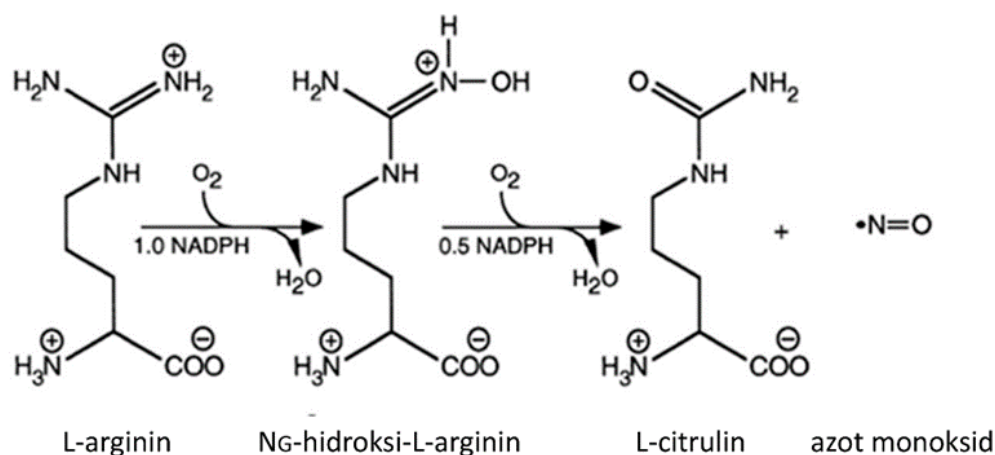
Azot-monoksid (NO) je važan signalni molekul uključen u regulaciju različitih fizioloških procesa u organizmu. Njegova uloga ogleda se u regulaciji vaskularnog tonusa i održanju vaskularnog integriteta zahvaljujući anti-inflamatornim, antiproliferativnim i antitrombogenim efektima (Andrew i sar., 1999, Rangan i sar., 2001). U bubrezima NO ima ulogu u regulaciji intraglomerulnog pritiska, glomerulske filtracije i protoka krvi kroz bubrege (Baylis i sar., 2008). NO nastaje konverzijom L-arginina u L-citrulin aktivnošću enzima NOS i nekoliko kofaktora: tetrahidrobiopterina (BH₄), redukovano nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), flavin adenin dinukleotida (FAD) i flavin mononukleotida (FMN) uz prisustvo O₂ (**Slika 1-10.** i **Slika 1-11.**) (Andrew i sar., 1999). Identifikovane su tri izoforme NOS: neuronska NOS (nNOS, engl. *neuronal NOS*), endotelna

NOS (eNOS, engl. *endothelial NOS*) i inducibilna NOS (iNOS, engl. *inducible NOS*). Izoforme nNOS i eNOS konstitutivno se ekspimiraju u odgovoru na fiziološke stimuluse. S druge strane, iNOS može biti aktivirana u odgovoru na citokine, proinflamatorne medijatore i endotoksine (Andrew i sar., 1999, Forstermann i sar., 2012).



Slika 1-10. Struktura azot monoksid sintaze. BH₄ - tetrahidrobiopterin, NADPH - redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfata, FAD - flavin adenin dinukleotid, FMN - flavin mononukleotid, CaM – Ca²⁺ kalmodulin, Arg – L-arginin (preuzeto od Andrew i sar., 1999).

U bubrezima su detektovane sve tri izoforme NOS (Aiello i sar., 1997, Furuzu i sar., 1998, Vaziri i sar., 2002). U fiziološkim uslovima eNOS je uglavnom zastupljena u endotelnim ćelijama kapilara glomerula, aferentne i eferentne arteriole i *vasa recta* medule bubrega (Rajj i sar., 1995). Ekspresija nNOS je ograničena na zonu *macula dense*, eferentnu arteriolu i Boumanovu kapsulu (Bachmann i sar., 1995, Furuzu i sar., 1998). S druge strane, iNOS je uglavnom detektovana u tubulocitima (Ashab i sar., 1995, Aiello i sar., 1997, Mazroa i sar., 2009), iako može biti prisutna u makrofagima, neutrofilima, fibroblastima i ćelijama glatkih mišića krvnih sudova (Furuzu i sar., 1998, Mazroa i sar., 2009).

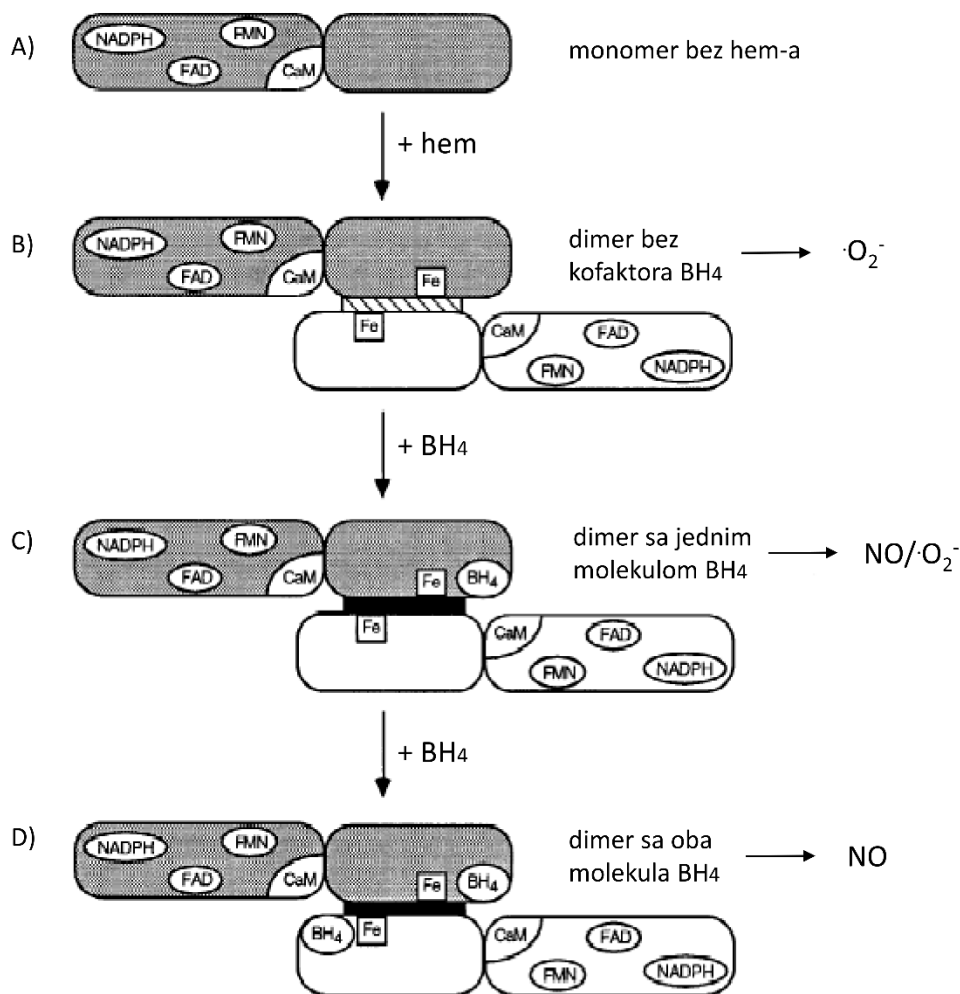


Slika 1-11. Biosinteza azot monoksida u reakciji katalizovanoj enzimom azot monoksid sintazom (preuzeto od Andrew i sar., 1999).

Konstitutivne izoforme nNOS i eNOS imaju sposobnost da vezuju kalmodulin nakon povećanja unutarćelijskog Ca^{2+} , između 200 i 400 nM. Međutim, iNOS vezuje kalmodulin na znatno nižim koncentracijama intraćelijskog Ca^{2+} , ispod 40 nM. Ovakav različit afinitet NOS nastaje kao posledica razlike u aminokiselinskom sastavu i strukturi vezujućeg mesta za kalmodulin (Forstermann i sar., 2012). Pokazano je da konstitutivne izoforme, eNOS i nNOS, stvaraju NO u količini optimalnoj za mnoge fiziološke procese, kao što su inhibicija adhezije i agregacije trombocita, regulacija vaskularnog tonusa i mikrocirkulacije u glomerulima. Aktivnošću iNOS generiše se NO u do hiljadu puta većoj koncentraciji, što može stvoriti uslove za razvoj mnogih patoloških procesa i stanja (Raj i sar., 1995, Furusu i sar., 1998).

U uslovima kada L-arginin nije dostupan u optimalnoj koncentraciji ili u nedostatku esencijalnog kofaktora BH_4 , normalna aktivnost NOS je narušena (dekuplovan enzim) i tada nastaje $\cdot\text{O}_2^-$ (Baylis i sar., 2012). Kada je koncentracija BH_4 smanjena, NOS može istovremeno da produkuje NO i $\cdot\text{O}_2^-$ (Slika 1-12.) (Andrew i sar., 1999). Veoma reaktivni $\text{NO}\cdot$ lako stupa u reakciju sa $\cdot\text{O}_2^-$, pri čemu nastaje snažan oksidans $\text{ONOO}\cdot$, a biodostupnost NO se smanjuje (Vaziri i sar., 1999, Pacher i sar., 2007). Brzina interakcije $\text{NO}\cdot$ sa $\cdot\text{O}_2^-$ je čak tri puta veća od brzine kojom se stvoreni $\cdot\text{O}_2^-$ uklanja aktivnošću SOD (Sainz i sar., 2005). U interakciji sa različitim molekulima peroksinitriti narušavaju njihovu strukturu i funkciju,

dovodeći u proteinima do oksidacije cisteina, metionina i histidina, nitracije tirozina (nitrotirozin) i nitrozilacije tiolnih grupa (-SH), a osim toga, izazivaju lipidnu peroksidaciju, kao i oksidativne modifikacije DNK (Pacher i sar., 2007, Schroder i sar., 2012).



Slika 1-12. Faze spajanja subjedinica azot-monoksid sintaze. Monomer bez hem prostetične grupe (A). Monomeri vezivanjem dve hem prostetične grupe formiraju nestabilni dimer, deкуплован enzim, čijom aktivnošću nastaje $\cdot\text{O}_2^-$ (B). Kada je nizak nivo BH₄, enzim je u formi stabilnog dimera koji katalizuje istovremenu produkciju NO i $\cdot\text{O}_2^-$ (C). Kada je nivo BH₄ visok, enzim isključivo sintetiše NO (D) (preuzeto od Andrew i sar., 1999).

1.4.1. Uloga NO sistema u patogenezi HBS

Literaturni podaci pokazuju da smanjena produkcija NO, nastala putem različitih mehanizama, doprinosi patogenezi i progresiji hronične bubrežne slabosti (Baylis i sar., 2012). Ranija istraživanja pokazala su da ekperimentalno izazvana inhibicija eNOS, nNOS ili iNOS dovodi do pogoršanja funkcije i strukture bubrega, što se ogleda u progresiji oštećenja glomerula i značajnoj proteinuriji u različitim eksperimentalnim modelima HBS, kao što su ADR nefropatija (Rangan i sar., 2001, Sun i sar., 2013), nefrektomija (Muller i sar., 2010) i dijabetesna nefropatija (Nakagawa i sar., 2007, Mazroa i sar., 2009).

Publikovani radovi ukazuju na vezu između AngII i aktivnosti NOS u uslovima HBS. Istraživanja Kashiwagi i saradnika (2000) su pokazala da inhibicija NOS pomoću L-NAME (engl. *N ω -nitro-L-arginine-methylester*) dovodi do hipertenzije i pogoršanja strukture i funkcije bubrega, što je bilo sprečeno blokadom AT1R. Istraživanja izvedena na pacovima kojima je izazvana nefrektomija pokazala su da tretman losartanom dovodi do povećanja ekspresije eNOS (Trejo i sar., 2017), normalizacije produkcije NO (Roczniak i sar. 1999) i poboljšanja bubrežne funkcije. Takođe, u modelu dijabetesne nefropatije (Sato i sar., 2008) tretman losartanom je smanjio produkciju ROS i povećao biodostupnost BH₄, što je pozitivno uticalo na održanje eNOS u formi dimera, a posledično i do normalizovanja produkcije NO u bubrežima.

Istraživanja izvedena na modelu nefrektomije pokazala su da antioksidativni tretman vitaminom E snižava krvni pritisak, poboljšava produkciju NO u vaskulaturi i normalizuje ekspresiju svih izoformi NOS u bubrežima (Vaziri i sar., 2002). Tretman vitaminom E povećao je ekspresiju nNOS i skoro potpuno sprečio produkciju $\cdot\text{O}_2^-$ poreklom od NADPH oksidaze u korteksu bubrega pacova sa nefrektomijom (Tain i sar., 2007). Mendoza i saradnici (2008) su pokazali da kod eNOS-*knockout* miševa sa izazvanom nefrektomijom dolazi do bržeg pogoršanja bubrežne funkcije usled intenzivnijih oštećenja tubulointercijuma, glomeruloskleroze, produkcije $\cdot\text{O}_2^-$ i proteinurije. Isti autori su pokazali

da za razliku od ovih miševa, kod *wild-type* miševa kojima je izazvana nefrektomija tretman L-argininom u kombinaciji sa vitaminima E i C postiže veći protektivni efekat zahvaljujući stimulaciji produkcije NO i sprečavanjem oksidativnih oštećenja u tkivu bubrega.

2. CILJ

Cilj disertacije bio je da se ispita efekat losartana (blokator receptora za AngII tipa 1), tempola (stabilni nitroksid radikal – SOD mimetik i sakupljač slobodnih radikala), kao i njihove kombinacije na progresiju FSGS, koja je kod SH pacova izazvana adrijamicinom. U tu svrhu analizirani su:

- struktura i funkcija bubrega i lipidni status;
- parametri oksidativnog stresa i antioksidativnog sistema;
- ekspresija Nox2 i Nox4 izoforme katalitičke subjedinice NADPH oksidaze, glavnog izvora ROS u ćeliji, uključenog u proces inflamacije;
- ekspresija tri izoforme NOS i aktivnost procenjena na osnovu ukupne produkcije metabolita NO (nitriti i nitrati);
- sistemski hemodinamski parametri: krvni pritisak, minutni volumen srca, frekvencija srčanih kontrakcija i ukupni periferni vaskularni otpor, kao i regionalni hemodinamski parametri: protok krvi i vaskularni otpori u aorti, karotidnoj i bubrežnoj arteriji.

Rezultati ove disertacije nastoje da rasvetle da li uklanjanje reaktivnih vrsta kiseonika i azota pomoću tempola, u uslovima hronične blokade receptora za AngII tipa 1 losartanom može dodatno doprineti poboljšanju strukture i funkcije bubrega u eksperimentalnom modelu FSGS, da bi se otvorile nove mogućnosti za usporavanje progresije bolesti i bolju prognozu pacijenatima sa ovim oboljenjem.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalni protokol

Za potrebe eksperimenta korišćene su ženke pacova sa urođenom hipertenzijom (spontano hipertenzivni - SH pacovi) starosti 24 nedelje, prosečne težine 180 g, soja *Okamoto-Aoki* poreklom sa farme Taconic (Germantown, NY, USA). Životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu, pod standardnim uslovima temperature (22 ± 2 °C) i vlažnosti vazduha (60 – 70%), sa 12 h ciklusom svetlo/tama i slobodnim pristupom vodi i hrani (standardna hrana za laboratorijske životinje, Veterinarski zavod Subotica).

Svi eksperimenti u ovoj studiji izvedeni su u saglasnosti sa Zakonom o dobrobiti životinja („Službeni glasnik RS” br. 41/09) i Pravilnikom o dobrobiti oglednih životinja („Službeni glasnik RS” br. 39/10), a na osnovu rešenja o odobrenju sprovođenja oglada na životinjama izdatih od strane Etičkog saveta Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine (br. 323-07-02447/2014-05/1 i br. 323-07-00318/2015-05).

Eksperimentalni model FSGS uspostavljen je intravenskom (*i.v.*) aplikacijom adrijamicina (ADR, doksorubicin hidrohlorid, Adriablastina, Pharmacia & Upjohn, Milan, Italy) u dozi od po 2 mg/kg, dva puta u intervalu od tri nedelje.

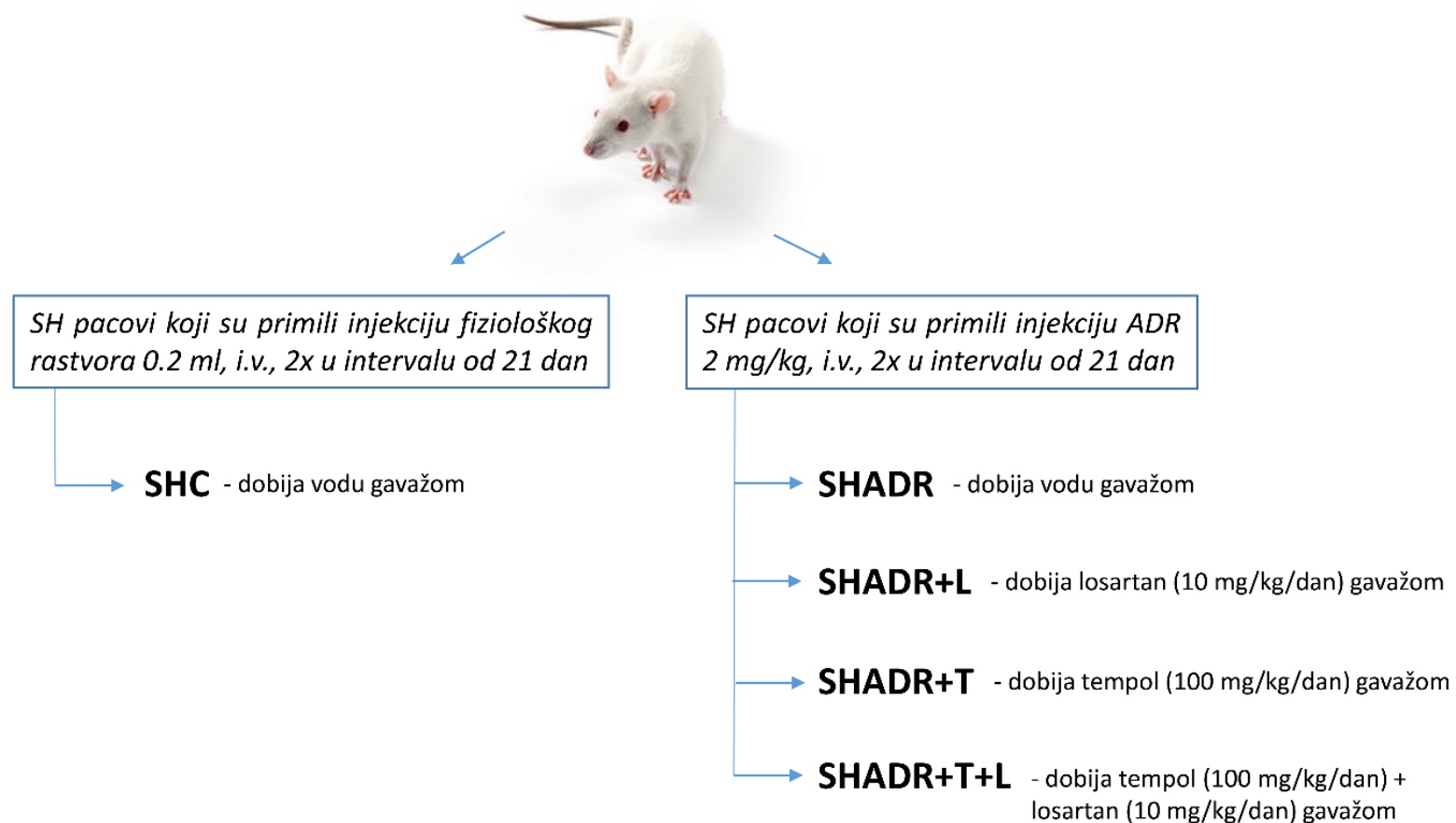
Posle dva kontrolna merenja telesne mase i sistolnog krvnog pritiska pacovi su podeljeni u dve eksperimentalne grupe tako da su srednje vrednosti telesne mase i sistolnog krvnog pritiska između grupa bile približno jednake (**Slika 3-1.**):

- **SHC** - kontrolna grupa pacova (n=10) koji su prvog i 21. dana primili injekciju fiziološkog rastvora 0,2 ml *i.v.*, a od 22. dana dobijali česmensku vodu 0,5 ml/dan intragastričnom sondom tokom 6 nedelja,
- **SHADR** – model grupa pacova (n=40) koji su prvog i 21. dana primili injekciju adrijamicina (ADR) 2 mg/kg *i.v.*. Od 22. dana 10 životinja iz ove grupe nastavlja da dobija česmensku vodu 0,5 ml/dan intragastričnom sondom tokom 6 nedelja.

Preostalih 30 životinja svrstano je u tri grupe u skladu sa terapijom koju su intragastričnom sondom primale tokom 6 nedelja:

- **SHADR+L** – grupa pacova koji su od 22. dana dobijali losartan (L, selektivni blokator angiotenzin II tip 1 receptora, DUP 153, Du Pont, Wilmington, DE, USA) u dozi od 10 mg/kg/dan,
- **SHADR+T** – grupa pacova koji su od 22. dana dobijali tempol (T, stabilni nitroksid radikal, 4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-15N-oksil, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) u dozi od 100 mg/kg/dan,
- **SHADR+T+L** – grupa pacova koji su od 22. dana dobijali kombinovani tretman tempolom (100 mg/kg/dan) i losartanom (10 mg/kg/dan).

Telesne mase životinja (TM, g) praćene su na sedam dana tokom tretmana. Merenja su vršena na početku svake nedelje kako bi se doza odgovarajuće terapije prilagodila telesnoj masi životinje.



Slika 3-1. Šematski prikaz eksperimentalnog protokola. SH pacovi – spontano hipertenzivni pacovi. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom (ADR), L – losartan, T – tempol.

3.2. Hemodinamske studije

3.2.1. *Indirektno merenje sistolnog krvnog pritiska i frekvence srčanih kontrakcija*

Indirektno merenje sistolnog krvnog pritiska (SKP) i frekvence srčanih kontrakcija (FS, otk/min) vršeno je svake druge nedelje na uređaju za indirektno registrovanje krvnog pritiska (Physiograph Four, Narco Bio Systems Inc., Houston, TX, USA). Kao vrednost SKP uzimana je srednja vrednost najmanje tri uzastopna merenja i izražavana je u mmHg.

3.2.2. *Direktno merenje krvnog pritiska, minutnog volumena srca i regionalnog protoka krvi*

Nakon šestonedeljnog tretmana, merenja hemodinamskih parametara vršena su direktnom metodom na životinjama anesteziranim Na-pentobarbitalom (Nembutal, Serva, Heidelberg, Germany; 35 mg/kg telesne mase, intraperitonealno (*i.p.*)). U preparovanu levu femoralnu arteriju ubacivan je kateter (PE-50, Clay-Adams Parsippany, NY, USA) ispunjen fiziološkim rastvorom sa heparinom. Registrovanje sistolnog (SKP, mmHg), dijastolnog (DKP, mmHg) i srednjeg (SAP, mmHg) arterijskog pritiska, kao i frekvence srčanih kontrakcija (FS, otk/min) vršeno je povezivanjem katetera preko elektromehaničkog pretvarača (engl. *transducer*) sa Cardiobox III-TCR uređajem (9800TCR Thermodilution

Cradiac Output for mice, rats and large subjects, Columbus Instruments', Columbus, OH, USA).

Minutni volumen srca (MV) određivan je termodilucionom metodom na Cardiomax III-TCR aparatu. Kroz preparovanu levu zajedničku karotidnu arteriju ubacivan je termosenzor do luka aorte, a drugi termosenzor je uranjan u hladan fiziološki rastvor temperature niže od 10 °C. Kroz preparovanu jugularnu venu naglo je ubrizgavano 0,2 ml hladnog fiziološkog rastvora, a vrednost MV očitavana je pomoću odgovarajućeg programa i normirana na telesnu masu životinje (ml/min/kg).

Indeks ukupnog perifernog vaskularnog otpora (UPO, mmHg min kg/ml) izračunavan je iz odnosa SAP i MV.

U svrhu određivanja regionalnih protoka krvi pažljivo su preparovane desna karotidna i leva bubrežna arterija, kao i aorta iznad mesta odvajanja bubrežne arterije. Protok krvi kroz karotidnu (KPK) i bubrežnu (BPK) arteriju je meren ultrazvučnom sondom unutrašnjeg prečnika 1 mm, a kroz aortu (APK) ultrazvučnom sondom unutrašnjeg prečnika 2 mm pomoću aparata za registrovanje protoka krvi kod malih eksperimentalnih životinja (Transonic T106 Small Animal Flowmete, Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA). Protok krvi u odgovarajućim krvnim sudovima izražavan je u ml/min/kg telesne mase.

Vaskularni otpori u regionalnim krvnim sudovima izračunavani su kao odnos vrednosti srednjeg arterijskog pritiska sa odgovarajućim protokom, a vrednosti su izražavane u mmHg min kg/ml.

3.3. Priprema uzoraka

Nakon šestonedelnog tretmana uzorci 24-časovnog urina, sakupljeni u individualnim metaboličkim kavezima, centrifugirani su na 4000 rpm 20 min (Ultra centrifuga Heraeus Megafuge 1.0 R), a supernatant je alikvotiran i odlagan na -20 °C do daljih analiza.

Na kraju tretmana životinjama je uzorkovana krv punkcijom iz račve abdominalne aorte, kao antikoagulans korišćen je Na-EDTA (ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt dihydrate G.R., Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic). Uzorci krvi su centrifugirani na 4000 rpm tokom 20 min na 4 °C (Ultra centrifuga Heraeus Megafuge 1.0 R), a izdvojena plazma je odlagana na -20 °C do daljih analiza.

Istaloženi eritrociti su resuspendovani i tri puta ispirani fiziološkim rastvorom uz centrifugiranje tokom 10 min na 2000 rpm, a zatim zamrzavani na -70 °C do daljih analiza. Uzorci eritrocita su lizirani hladnom vodom u odnosu 1:6 i po potrebi dodatno razblaživani radi određivanja koncentracije hemoglobina (Hb) i aktivnosti enzima antioksidativnog sistema: SOD, CAT, GP_x i GR.

Bubrezi su dekapulirani, merena im je masa na analitičkoj vagi (Mettler AE200), a potom je desni bubreg longitudinalno presecan i odlagan u 4% formalin, a levi čuvan na -70 °C do daljih analiza. Vrednosti mase levog i desnog bubrega (MB, g) preračunavane su na telesnu masu i prikazane kao indeks mase bubrega (IMB, mg/g).

3.4. Određivanje biohemijskih parametara i procena bubrežne funkcije

Pomoću automatskog analizatora COBAS INTEGRA 400 plus (Hoffmann-La Roche, Germany) i odgovarajućih komercijalnih testova (Roche Diagnostics, Germany) merene su vrednosti različitih biohemijskih parametara. U uzorcima plazme i urina određivana je koncentracija kreatinina, uree, albumina i ukupnih proteina. U plazmi je merena i koncentracija ukupnog holesterola (H), triglicerida (Trg) i HDL holesterola (HDL-H), a vrednosti LDL holesterola (LDL-H) dobijene su preračunavanjem pomoću Friedwald-ove formule (Warnick i sar., 1990):

$$\text{LDL-H} = \text{H} - (\text{HDL-H} + \text{Trg}/5)$$

Volumen izlučenog urina tokom 24 h (U_v , ml/min) normiran je na telesnu masu životinja i izražavan kao diureza u $\mu\text{l}/\text{min}/\text{kg}$. Procena bubrežne funkcije vršena je na osnovu brzine glomerulske filtracije izražene preko vrednosti klirensa kreatinina i uree, kao i preko praćenja ekskrecije proteina i albumina urinom. Klirensi kreatinina i uree izračunavani su po standardnim formulama:

$$C_{cr} = U_v \times U_{cr} / P_{cr}$$

$$C_u = U_v \times U_u / P_u$$

C_{cr} – klirens kreatinina (ml/min/kg),

U_{cr} – koncentracija kreatinina u urinu (mmol/l),

P_{cr} – koncentracija kreatinina u plazmi ($\mu\text{mol}/\text{l}$),

C_u – klirens uree (ml/min/kg),

U_u – koncentracija uree u urinu (mmol/l),

P_u – koncentracija uree u plazmi (mmol/l),

U_v – volumen izlučenog urina tokom 24h (ml/min).

Ekskrecija albumina urinom (Alb_{exc}) izračunavana je kao proizvod koncentracije albumina u urinu i diureze, i izražavana je u mg/min/kg.

Ekskrecija proteina urinom (P_{exc}) izračunavana je kao proizvod koncentracije proteina u urinu i diureze, i izražavana je u mg/min/kg.

Odnos koncentracije proteina i kreatinina u urinu ($U_{p/cr}$), kao još jedan marker za procenu bubrežne funkcije (Deman i sar., 2001), izražavan je u mg/mg.

3.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa

3.5.1. Određivanje stepena lipidne peroksidacije

Za određivanje stepena lipidne peroksidacije merena je koncentracija supstanci koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS, engl. *thiobarbituric acid reactive substances*) po metodi Ohkawa i saradnika (1979). U adekvatno pripremljene uzorke plazme, urina, homogenata bubrega i lizata eritrocita dodavana je trihlorsirćetna kiselina (Zorka, Šabac). Uzorci su centrifugirani na 15000 rpm 5 min, posle inkubacije na ledu od 10 min. Tako pripremljeni uzorci su nakon dodavanja tiobarbiturne kiseline (Acros Organics, New Jersey, USA) inkubirani 15 min na 100 °C u vodenom kupatilu. Apsorbance su merene na ELISA čitaču (Labsystems Multiskan ® PLUS) na talasnoj dužini od 540 nm. Koncentracija TBARS u ispitivanim uzorcima izračunavana je po formuli:

$$C \text{ [nmol/ml]} = (A-B) \times 0,012 \times R \times 1000$$

A - apsorbanca uzorka,

B - apsorbanca blanka,

R - razblaženje.

Brzina oslobađanja TBARS u plazmi izračunavana je iz koncentracije TBARS u plazmi i protoka krvi kroz abdominalnu aortu, a izražavana je u nmol/min/kg. Brzina ekskrecije TBARS urinom izračunavana je kao proizvod koncentracije TBARS u urinu i diureze, i izražavana je u nmol/min/kg. Nivo produkcije TBARS u homogenatu bubrega

izražavan je u nmol/mg tkiva. Koncentracija TBARS u lizatima eritrocita izračunavana je na gram hemoglobina (g Hb).

3.5.2. *Određivanje markera oksidacije proteina*

Određivanje markera oksidacije proteina u homogenatu bubrega vršeno je na osnovu prisustva karbonilnih grupa (PCOs, engl. *protein carbonyl content*), po proceduri koja podrazumeva reakciju karbonilnih grupa u proteinu sa 2,4-DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine), pri čemu nastaje hidrazon, koji se detektuje spektrofotometrijskom metodom (Lynch i sar., 2015) na talasnoj dužini od 370 nm pomoću ELISA čitača (Labsystems Multiskan ® PLUS). Ekstinkcioni koeficijent za 2,4-DNPH iznosi $0,022 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dobijeni rezultati su izraženi u nmol/mg proteina.

3.5.3. *Određivanje antioksidativnog statusa - ABTS test*

Određivanje totalnog antioksidativnog statusa vršeno je kolorimetrijskim testom koji su definisali Re i saradnici (1999). Korišćenjem ABTS-a (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina, Sigma-Aldrich, Sent Luis, MO, USA) kao hromogena, uz prisustvo kalijum persulfata ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) dobija se karakteristični plavo-zeleni rastvor. Kada se obojeni ABTS pomeša sa nekom supstancom koja može da se oksiduje, dolazi do njegovog obezbojavanja. Intenzitet obezbojavanja rastvora srazmeran je koncentraciji prisutnih antioksidanasa u uzorku. Kao standard se upotrebljava trolox (hidrosolubilni ekvivalent vitamina E). Dobijeni rezultati izražavani su u mmol TE/l (TE, engl. *trolox equivalent*) plazme, odnosno, kada je određivan totalni antioksidativni status u homogenatu bubrega, rezultati su izražavani u mmol TE/g tkiva.

3.6. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativnog sistema

Da bi se odredila aktivnost enzima antioksidativnog sistema u lizatu eritrocita i homogenatu bubrega neophodno je bilo da se izmeri koncentracija hemoglobina i proteina u odgovarajućim uzorcima. Određivanje koncentracije hemoglobina u lizatu eritrocita vršena je metodom Drabkina i saradnika (1935). U 5 ml Drapkinovog reagensa (Institut Mol, Stara Pazova, Srbija) dodavano je 20 μ l lizata eritrocita. Nakon inkubacije 15 min na sobnoj temperaturi merena je apsorbance uzoraka na talasnoj dužini od 545 nm pomoću spektrofotometra (Ultrospec 3300 pro, Amersham, Biosciences). Koncentracija hemoglobina određivana je po formuli: $C \text{ [g/100 ml]} = A_{545} \times 36,77$.

U uzorcima homogenata bubrega merena je koncentracija proteina metodom po Loriju (Lowry i sar., 1951). Za određivanje standardne krive korišćen je rastvor albumina (BSA, engl. *bovine serum albumine*) u koncentracijama od 0,05 mg do 1 mg. Apsorbance ispitivanih uzoraka merene su pomoću spektrofotometra na 750 nm. Koncentracija proteina izračunavana je na osnovu formule $Y = aX + b$, gde su Y - izmerene absorbance standarda, X - poznate koncentracije standarda, a a i b konstante za datu krivu.

3.6.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost SOD merena je indirektnom metodom koja se zasniva na smanjenju brzine redukcije citohroma c (McCord i sar., 1969). Uzorci su razblaživani dodavanjem 1 ml etanola (etil-alkohol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Zorka, Šabac) i 0,6 ml hloroforma (Superlab Loba Chemie, Mumbai, India), a zatim centrifugirani 15 min na 3000 rpm. Aktivnost enzima je određivana u supernatantu.

Reagensi potrebni za ovu reakciju su: Na₂CO₃-EDTA pufer (ICN Galenika) i adrenalin (epinephrine, C₉H₁₃NO₃, Sigma, Chemicals) rastvoren u 0,1 N HCl tako da ΔA/min bude 0,020–0,022. U staklenu kivetu se dodaje karbonatni pufer, uzorak u količini da redukuje linearni deo krive auto-oksidacije adrenalina 30–40% i adrenalin u količini da ΔA/min tokom auto-oksidacije u linearnom delu bude 0,02–0,022. Prati se ΔA/min do završetka linearnosti krive na talasnoj dužini od 480 nm pomoću spektrofotometra. Aktivnost enzima u eritrocitima je računata po sledećoj formuli:

$$\text{SOD [U/g Hb]} = 2 \times (\Delta B - \Delta A) \times R \times 100 / \text{Hb} \times V \times \Delta B$$

Aktivnost enzima u homogenatu bubrega je računata po sledećoj formuli:

$$\text{SOD [U/mg prot]} = 2 \times (\Delta B - \Delta A) \times R / \text{Law} \times V \times \Delta B$$

ΔA - promena apsorbance uzorka,

ΔB - promena apsorbance blanka,

R - razblaženje,

Hb - koncentracija hemoglobina (g/100 ml),

Law - koncentracija proteina (mg/ml),

V - zapremina uzorka (ml).

3.6.2. *Određivanje aktivnosti katalaze*

Aktivnost CAT određivana je po metodi Beutlera (1982). Metoda se sastoji u praćenju brzine razgradnje vodonik peroksida u prisustvu CAT na talasnoj dužini od 230 nm pomoću spektrofotometra.

Određivanje aktivnosti CAT vršeno je u TRIS puferu (TRIS hidroxymethyl aminomethane, C₄H₁₁NO₃, Sigma, Chemicals). Rastvor vodonik peroksida je pravljen od

30% vodenog rastvora H₂O₂ (Hemos, Srbija) da ima apsorbanu 0,860 na talasnoj dužini od 230 nm. Određivanje koncentracije vodonik peroksida vršeno je na sledeći način: u kvarenu kivetu nalivano je 50 µl pufera, uzorak u količini da ΔA/min bude 0,03–0,06 i 1 ml rastvora H₂O₂. Na spektrofotometru je praćena promena apsorbanace na svakih 30 s tokom 3 min. Aktivnost enzima u eritrocitima je računata po formuli:

$$\text{CAT [U/g Hb]} = \Delta A \times R \times 100 / \text{Hb} \times V \times 0,071$$

Aktivnost enzima u homogenatu bubrega je računata po formuli:

$$\text{CAT [U/mg prot]} = \Delta A \times R / \text{Law} \times V \times 0,071$$

ΔA - promena apsorbanace uzorka,

R - razblaženje,

Hb - koncentracija hemoglobina (g/100 ml),

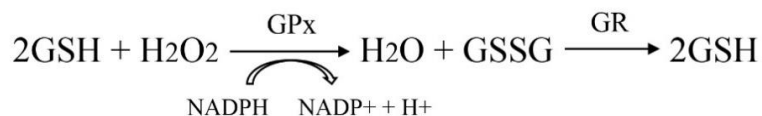
Law - koncentracija proteina (mg/ml),

V - zapremina uzorka (ml),

0,071 - ekstinkcioni koeficijent za H₂O₂ na 230 nm.

3.6.3. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze

Aktivnost GP_x merena je po metodi Paglia i saradnika (1967). Metoda se zasniva na sledećoj reakciji:



Ovom metodom se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm prati potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH uz prisustvo GR.

Neophodni rastvori za ovu reakciju su: 0,5 M fosfatni pufer, 0,2 mM NADPH u 1% NaHCO₃, 1 mM GSH (L-Glutathione reduced, Sigma, Chemicals), 0,03 M t-butilhidroperoksid (tert-Butyl hydroperoxide solution, (CH₃)₃COOH, Sigma, Chemicals), Drapkinov reagens i GR (Glutathione Reductase from Baker's Yeast (*S. cerevisiae*) Sigma, Chemicals (TYPE II)). U staklenu kivetu nalivano je 1,6 ml vode, 0,3 ml rastvora GSH, 0,6 ml rastvora NADPH, 0,3 ml fosfatnog pufera, 0,1 ml t-butilhidroperoksida, 50 µl Drapkinovog reagensa i uzorak. Reakcija je otpočinjana dodavanjem 5 µl GR i odvijana je na temperaturi od 37 °C. Apsorbanca uzorka je merena na 340 nm, u trajanju od 150 s. Aktivnost enzima u lizatu eritrocita je računata po formuli:

$$GP_x [U/g Hb] = (\Delta A - \Delta B) \times 1000 / Hb \times 6,22 \times 0,835$$

Aktivnost enzima u homogenatu bubrega je računata po formuli:

$$GP_x [U/mg prot] = (\Delta A - \Delta B) \times 1000 \times 3 / Law \times V \times 6,22$$

ΔA - promena apsorbance uzorka,

ΔB - promena apsorbance blanka,

Hb - koncentracija hemoglobina (g/100 ml),

Law - koncentracija proteina (mg/ml),

6,22 - molarna ekstincija,

0,833 - koeficijent.

3.6.4. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost GR određivana je po metodi Glatzle i sar. (1974). Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovanog (GSSG) u redukovanu glutation (GSH).

Reagensi potrebni za ovu reakciju su: 0,5 M fosfatni pufer, 0,5 mM EDTA, 2 mM GSSG (L-Glutathione oxidized, Sigma, Chemicals) i 0,1 mM NADPH. U kivetu je sipano 0,6 ml fosfatnog pufera, 0,1 ml GSSG, uzorka i vode do 3 ml. Reakcija je otpočinjana dodavanjem 0,1 ml NADPH. Optimalna temperatura reakcije bila je 37 °C. Spektrofotometrijski je praćena promena apsorbance uzorka na talasnoj dužini od 340 nm u trajanju od 3 min. Aktivnost enzima u lizatu eritrocita je računata po formuli:

$$GR [U/g Hb] = (\Delta A - \Delta B) \times 3 \times 10^5 / Hb \times V \times 6,22$$

Aktivnost enzima u homogenatu bubrega je računata po formuli:

$$GR [U/mg prot] = (\Delta A - \Delta B) \times 1000 \times 3 / Law \times V \times 6,22$$

ΔA - promena absorbance uzorka,

ΔB - promena absorbance blanka,

Hb - koncentracija hemoglobina (g/100 ml),

Law - koncentracija proteina (mg/ml),

V- zapremina uzorka (ml),

6,22 - molarna ekstincija.

3.7. Imunoezimski testovi

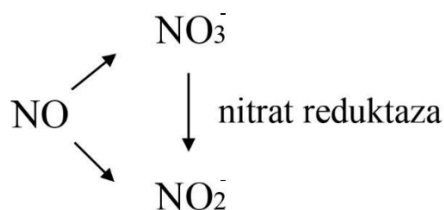
Određivanje koncentracije enzima antioksidativnog sistema u eritrocitima vršeno je pomoću imunoenzimskih (ELISA) testova zasnovanih na sendvič imuno esej tehnici. Određivani su: SOD (Rat superoxide dismutase 1, soluble, Cusabio, Wuhan, Hubei, China), CAT (Rat catalase, Cusabio, Wuhan, Hubei, China) i GP_x (Rat glutathione peroxidase, Cusabio, Wuhan, Hubei, China). Uzorci eritrocita su pripremani u skladu sa preporukama proizvođača. Nakon tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja lizati su centrifugirani na 10000

rpm, na 4 °C, 10 min, a supernatant je dalje korišćen u analizama. Nakon nalivanja standarda različitih koncentracija i uzoraka lizata eritrocita na mikroploči, dodavano je specifično antitelo, a zatim avidin vezan za peroksidazu rena (HRP, engl. *horse radish peroxidase*). Na kraju, dodavan je supstrat za peroksidazu koji dovodi do razvoja žute boje, čiji intenzitet je proporcionalan koncentraciji ispitivanog enzima. Intenzitet boje je meren na ELISA čitaču na talasnoj dužini od 450 nm. Koncentracija ispitivanih enzima u uzorcima izračunavana je na osnovu standardne krive pomoću formula $Y = aX + b$ i $Y = a \ln(X) + b$, gde su Y - izmerene absorbance standarda, X - poznate koncentracije standarda, a a i b konstante za datu krivu. Koncentracija SOD izražavana je u pg/ml, a CAT i GP_x u mIU/ml.

U homogenatima bubrega određivana je koncentracija Nox4 i MMP-1 pomoću sledećih ELISA testova: Nox4 (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 4, Cloud-Clone Corp., Houston, USA) i MMP-1 (Rat Matrix Metalloproteinase 1, BlueGene Biotech, Shanghai, China) prema upustvima proizvođača. Rezultati su izražavani u ng/ml.

3.8. Određivanje metabolita NO (nitrita i nitrata)

Određivanje koncentracije nitrita (NO_2^-) i nitrata (NO_3^-), stabilnih metabolita NO, koristi se za indirektno merenje produkcije NO u biološkim sistemima i podrazumeva dvostepenu reakciju. Prva reakcija uključuje aktivnost nitrat reduktaze, a potom sledi Grissova reakcija (Green i sar., 1982). Pomoću nitrat reduktaze nitrati se konvertuju u nitrite (**Slika 3-2.**). Nitriti nastali konverzijom, zajedno sa već prisutnim nitritima, kvantifikuju se uz pomoć Grissovog reagensa, koji prevodi nitrite u purpurno (ljubičasto) azo-jedinjenje sa maksimumom apsorpcije na 540 nm.



Slika 3-2. Šematski prikaz metabolisanja NO do nitrata i nitrita.

Za određivanje koncentracije ukupnih metabolita NO (NO_x) u uzorcima urina i homogenatima bubrega primenjena je metoda enzimske konverzije NO_3^- u NO_2^- (Schmidt i sar., 1992). Reakcija se odvija u prisustvu enzima nitrat reduktaze (nitrate reductase from *Aspergillus niger*, Sigma) i koenzima NADPH (β -Nikotinamide adenine dinukleotide phosphate tetrasodium salt, Sigma). Standard NaNO_3 odgovarajuće koncentracije, uzorak urina ili homogenata bubrega odgovarajućeg razblaženja, u količini od 50 μl inkubiran je 180 min na 25 °C u prisustvu enzima i kofaktora. Nakon toga, nalivano je po 100 μl sveže pripremljenog Grissovog reagensa, odnosno po 100 μl 2,5% ortofosforne kiseline. Za potrebe određivanja koncentracije NO_2^- , 100 μl standarda/uzorka inkubirano je sa 100 μl sveže pripremljenog Grissovog reagensa, odnosno 100 μl 2,5% ortofosforne kiseline. Grissov reagens pripreman je neposredno pre izvođenja analize mešanjem jednakih zapreminskih delova 1% sulfanil amida (p-aminobenzenesulfonamide, $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, Sigma) rastvorenog u 2,5% orto-fosfornoj kiselini (H_3PO_4 , Euro Hemija) i 0,1% rastvora N-etil diamina (N-1-(naftil)-etilenediamine dihidrohlorida, $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{H}_2\text{Cl}$, Sigma) u 2,5% orto-fosfornoj kiselini.

Inkubacija standarda/uzoraka u obe reakcije trajala je još dodatnih 20 min na 25 °C do razvoja ružičaste boje. Apsorbance su očitavane na talasnoj dužini od 540 nm na ELISA čitaču. Na osnovu serije standarda natrijum-nitrita (NaNO_2 , Superlab) različitih koncentracija (od 1 μM do 100 μM) konstruisana je standardna kriva. Pomoću formule $Y = aX + b$, gde su Y- izmerene absorbance standarda, X - poznate koncentracije standarda, a a i b konstante za datu krivu, izračunate su vrednosti ukupnih nitrita u ispitivanim uzorcima. U homogenatima bubrega koncentracija NO metabolita izražavana je u $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteina, dok je brzina njihove ekskrecije urinom normirana na diurezu i iskazana u $\text{mmol}/24\text{h}$.

3.9. Western blot analiza

3.9.1. Izolacija membranskih i citosolnih proteina

Tkivo bubrega je homogenizovano u hladnom RIPA puferu (engl. *Radioimmunoprecipitation buffer*) za liziranje ćelija (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1% natrijum deoksiholat, 0,1% SDS, 2 mM EDTA i 50 mM NaF) u odnosu 1:10. Neposredno pre homogenizacije, puferu su dodavani inhibitori proteaza: Na-ortovanadat (200 mM), koktel inhibitora proteaza (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), PMSF (100 mM) i E-ACA (1 M). Lizati su inkubirani 20 min na ledu uz povremeno mešanje i zatim centrifugirani na 15000 x g na 4 °C 20 min. Koncentracija proteina u supernatanim određivana je pomoću komercijalnog BSA testa (BSA Protein Assay Kit, Pierce, Thermo Fisher Scientific). Preostali supernatanti su čuvani na -70 °C do analiziranja.

3.9.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Uzorci sa jednakom količinom proteina su mešani sa puferom za pripremu uzoraka (0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerola, 10% β -merkaptoetanol, 0,02% bromfenol plavo, pH 6,8) i inkubirani na 100 °C 5 min. Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni na gel koji sadrži 4% ili 10% akrilamida, a zatim razdvajani SDS-PAGE elektroforezom, pri konstantnoj struji jačine 130 mA, tokom 90 min. Nakon toga, polusuvim elektrotransferom, pri struji jačine 100 mA u toku 90 min, razdvojeni proteini u gelu su prenošeni na

nitroceluloznu membranu sa veličinom pora od 0,45 μm (Applichem, GmbH, Darmstadt, Germany).

3.9.3. *Imunoblot*

Nakon transfera, nespecifično vezivanje proteina za membranu blokirano je inkubiranjem membrana u 5% BSA u rastvoru 0,05% Tween-20 u TBS-u (TBS-Tween), 60 min na sobnoj temperaturi. Membrana je zatim inkubirana sa odgovarajućim razblaženjima primarnog antitela u 1% BSA u TBS-Tween-u preko noći na 4 °C. Korišćena su sledeća primarna antitela: nNOS (1:1000, AB5380 Chemicon International), iNOS (1:1000, SAB4502011 Sigma-Aldrich), eNOS (1:1000, PA1-037 Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), Nox2 (1:500, Abcam, ab31092) i aktin (1:1000, Sigma Aldrich). Nakon ispiranja TBS-Tween-om membrane su inkubirane sa sekundarnim antitelom konjugovanim enzimom HRP (1:40000, Peroxidase-conjugated goat antirabbit immunoglobulin, Sigma Aldrich) tokom 120 min na sobnoj temperaturi. Ponovo ispiranje membrana je vršeno rastvorom TBS-Tween-om tri puta u trajanju od 10 min, a na kraju samo sa TBS-om u trajanju od 5 min.

3.9.4. *Detekcija proteinskih traka*

Proteini obeleženi antitelima detektovani su hemiluminiscentnim reagensom, koji sadrži supstrat enzima peroksidaze - luminol (GE Healthcare, Amersham, UK). Vizualizacija proteinskih traka je analizirana na autoradiografskom filmu (Santa Cruz Biotechnology), a molekulska masa detektovanih proteina određivana je upoređivanjem sa proteinskim markerom (Page Ruler plus Prestained Protein Ladder, Pierce). Densitometrija

proteinskih traka vršena je pomoću programa Image Master Total Lab v1.11 software (Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska).

3.10. Histopatološke analize

Histopatološka analiza tkiva bubrega vršena je pomoću optičkog mikroskopa (BX53 sa DP12-CCD kamerom Olympus, Germany). Tkivo je fiksirano u formalinu i podvrgavano je dehidraciji ispiranjem u seriji rastućih koncentracija etil alkohola, potom je prosvetljavano ksilolom, kalupljeno u parafinu i sečeno na mikrotonu do debljine 5 μm . Ovako dobijeni preseci su zatim bojani Periodic Acid-Schiff (PAS) metodom.

Obim histopatoloških promena ocenjivan je prema intenzitetu oštećenja i veličini oblasti zahvaćene oštećenjem.

1. Skleroza glomerula gradirana je skalom od 0 do 3+ prema intenzitetu promena:

0 = bez promena,

1+ = blage segmentne promene na malom broju glomerula,

2+ = segmentne i globalne promene na većem broju glomerula,

3+ = uglavnom globalne promene.

2. Promene na tubulima: dilatacija tubula (atrofična cistična dilatacija sa PAS pozitivnim sadržajem) i atrofija tubula gradirane su skalom od 0 do 3+ prema intenzitetu promena:

0 = bez promena,

1+ = mali fokusi,

2+ = srednje izražena polja atrofije tubula,

3+ = ekstenzivna atrofija tubula.

Skup ovih promena je prikazan kao indeks oštećenja tubula.

3. Fibroza intersticijuma gradirana je od 0 do 3+ prema intenzitetu promena:

- 0 = bez promena,
1+ = mali fokusi,
2+ = izraženija polja fibroze,
3+ = ekstenzivna fibroza intersticijuma.

4. Infiltracija intersticijuma mononuklearnim leukocitima gradirana je od 0 do 3+ prema intenzitetu promena:

- 0 = bez promena,
1+ = mali fokusi,
2+ = izraženija polja infiltracije,
3+ = ekstenzivna infiltracija.

Skup svih ovih promena predstavljao je ukupni skor morfoloških promena u tkivu bubrega.

3.11. Imunohistohemijske analize

Imunohistohemijskom bojenju parafinskih preseka tkiva bubrega (debljine 5 μm) prethodilo je demaskiranje antigena u citratnom puferu (pH 6,0) u mikrotalasnoj rerni, a nakon deparafinizacije i rehidratacije. Isecci su zatim inkubirani 60 min na sobnoj temperaturi primarnim antitelom: nestin (1:100, Sanata Cruz, sc-23927), vimentin (1:200, Millipore, MAB3400), Nox2 (1:1000, Abcam, ab31092), Nox4 (1:1000, Abcam, ab133303), nNOS (1:100, Chemicon International, AB5380), iNOS (1:100, Sigma-Aldrich, SAB4502011) i eNOS (1:100, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, PA1-037). Za vizualizaciju ispitivanih proteina korišćen je univerzalni EnVisionTM kit (DAKO, Germany). Kao supstrat za peroksidazu korišćen je AEC (3-amino-9-etilkarbazol), a zatim su preparati kontrastirani hematoksilinom. Preparati su analizirani na optičkom mikroskopu BX53 sa DP12-CCD kamerom (Olympus, Germany).

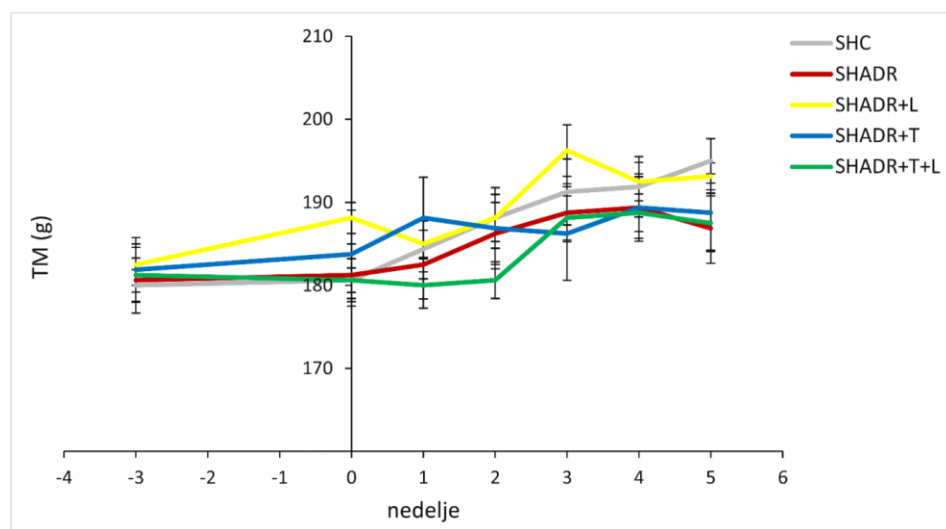
3.12. Statistička obrada rezultata

Dobijeni rezultati su prikazani kao aritmetička srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Za obradu rezultata korišćena je jednodimenzionalna analiza varijanse (engl. "one way ANOVA"). U slučaju kada je ANOVA pokazala statistički značajnu razliku, za određivanje stepena značajnosti razlike između grupa korišćen je Fišerov LSD (engl. *Least Significant Difference*) test (STATISTICA 8.0). Pearson-ov koeficijent linearne korelacije određivan je za analizu povezanosti ispitivanih parametara. Verovatnoća p manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom razlikom.

4. REZULTATI

4.1. Telesna masa životinja i indeks mase bubrega

Telesne mase (TM) eksperimentalnih životinja, merene tokom pet nedelja tretmana, prikazane su na **Slici 4-1**. Dobijeni rezultati su pokazali da nije bilo značajnih razlika u pogledu ovog parametra između eksperimentalnih grupa.



Slika 4-1. Telesne mase eksperimentalnih životinja tokom pet nedelja tretmana. TM – telesna masa. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM (n = 8). SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

Vrednosti telesnih masa i indeksa masa bubrega (IMB) eksperimentalnih životinja nakon šest nedelja tretmana prikazane su u **Tabeli 4-1**. Samo je kod SH pacova koji su primili ADR došlo do statistički značajnog smanjenja telesne mase ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim životinjama. Masa oba bubrega pacova SHADR grupe, kao i pacova koji su dobijali tempol (SHADR+T) i kombinovani tretman (SHADR+T+L) značajno je povećana u odnosu na kontrolne životinje. Takođe, indeks mase bubrega pacova SHADR grupe, kao i pacova koji su dobijali sva tri ispitivana tretmana bio je značajno povećan u poređenju sa kontrolom. S druge strane, za razliku od druga dva ispitivana tretmana, samo je losartan značajno smanjio IMB pacova SHADR+L grupe ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima izmerenim kod pacova SHADR grupe.

Tabela 4-1. Telesna masa i indeks mase bubrega eksperimentalnih životinja na kraju tretmana.

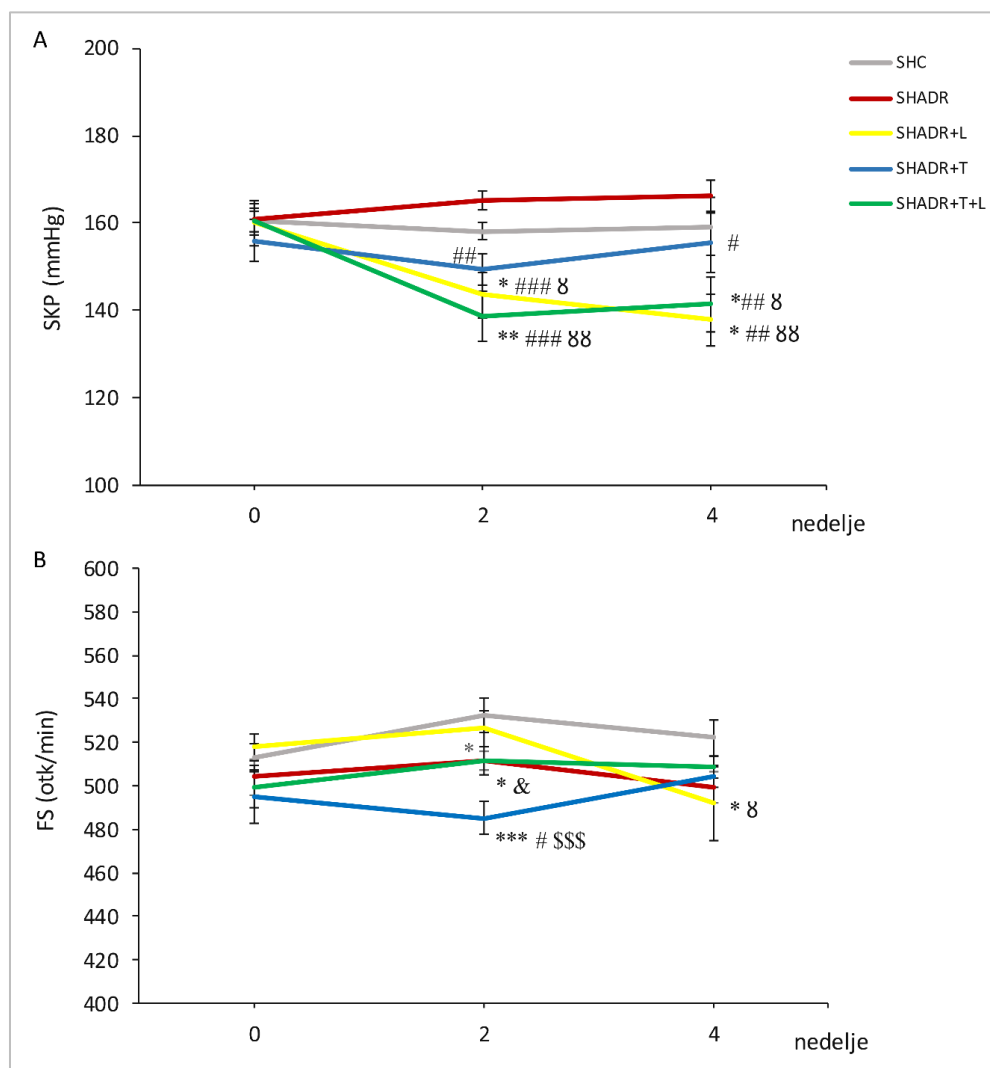
	SHC	SHADR	SHADR+L	SHADR+T	SHADR+T+L
TM (g)	196,25 ± 3,24	185,63 ± 3,83 *	195,00 ± 1,64	187,50 ± 4,01	189,38 ± 3,46
MB (g)	1,39 ± 0,03	1,56 ± 0,06 *	1,52 ± 0,02	1,61 ± 0,07 **	1,62 ± 0,04 **
IMB (mg/g)	7,09 ± 0,08	8,42 ± 0,28 ***	7,78 ± 0,12 *#	8,60 ± 0,27 ***\$	8,56 ± 0,24 ***\$

TM – telesna masa, MB – masa levog i desnog bubrega, IMB – indeks mase bubrega. Predstavljene su srednje vrednosti ± SEM (n = 8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$ vs. SHADR; \$ $p < 0,05$ vs. SHADR+L. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

4.2. Sistolni krvni pritisak i frekvencija srčanih kontrakcija

Vrednosti sistolnog krvnog pritiska (SKP) i frekvence srčanih kontrakcija (FS) merene indirektnom metodom na početku, na kraju druge i četvrte nedelje tretmana prikazane su na **Slici 4-2**. Dobijeni rezultati su pokazali da je vrednost sistolnog krvnog pritiska SH pacova koji su primili ADR bila slična vrednosti kontrolnih pacova. S druge strane, losartan i kombinovani tretman značajno su snizili SKP na kraju druge nedelje, što se održalo do kraja četvrte nedelje tretmana, u poređenju sa vrednostima izmerenim kod kontrolnih pacova. Takođe, sva tri ispitivana tretmana dovela su do značajnog sniženja sistolnog krvnog pritiska kako u drugoj, tako i u četvrtoj nedelji tretmana, u poređenju sa vrednostima SKP pacova SHADR grupe. Značajno sniženje sistolnog krvnog pritiska registrovano je i u odnosu na početak tretmana kod pacova koji su dobijali losartan i losartan u kombinaciji sa tempolom.

U drugoj nedelji tretmana došlo je do značajnog sniženja frekvence srčanih kontrakcija kod pacova SHADR, SHADR+T i SHADR+L+T grupe, a kod pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L) tek u četvrtoj nedelji tretmana, u odnosu na vrednosti FS pacova kontrolne grupe.

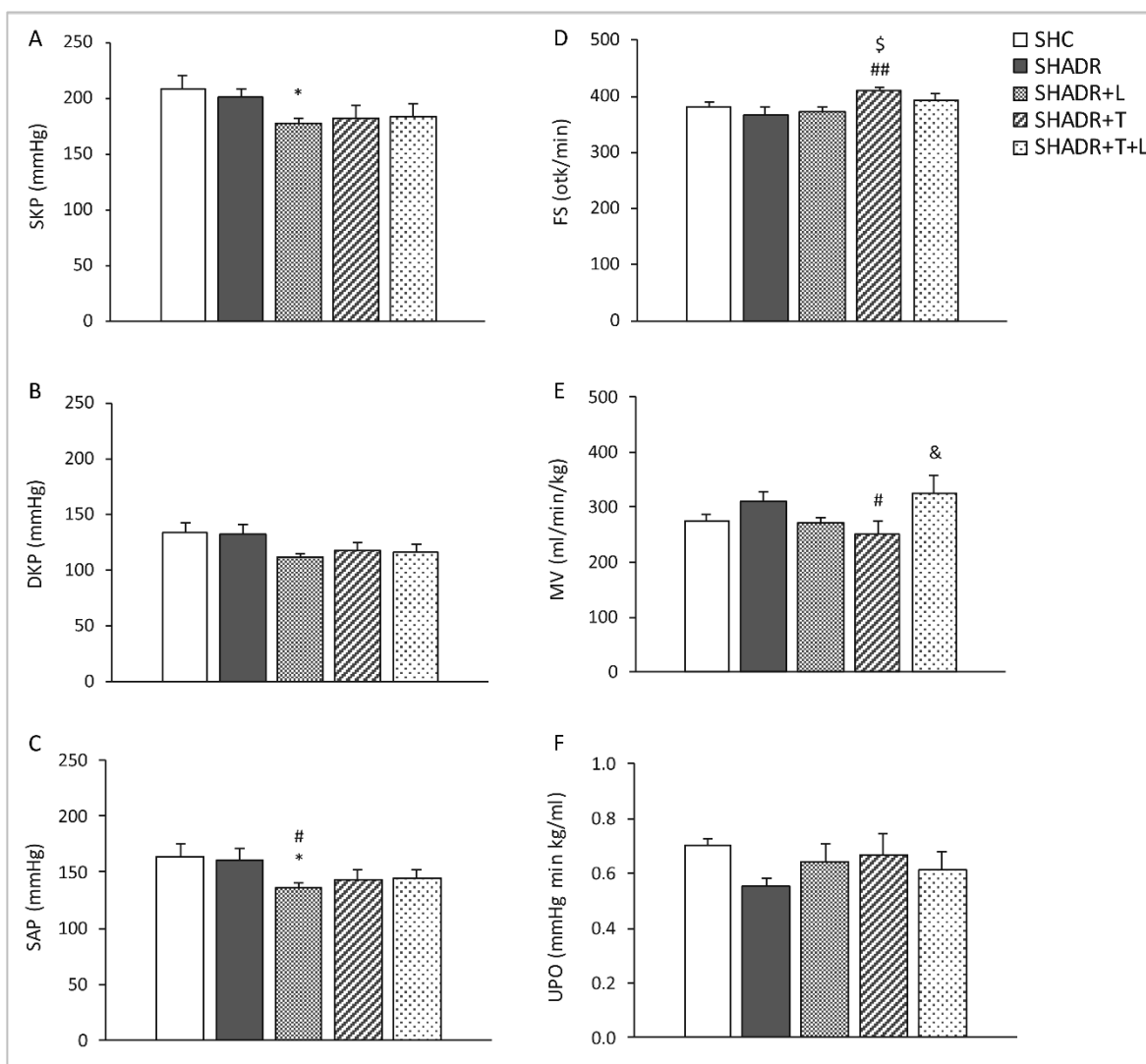


Slika 4-2. Sistolni krvni pritisak (SKP) (A) i frekvencija srčanih kontrakcija (FS) (B) merene indirektnom metodom. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM (n = 8). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. SHADR; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ vs. SHADR+L; && $p < 0,01$ vs. SHADR+T; $^{\delta}$ $p < 0,05$, $^{\delta\delta}$ $p < 0,01$ vs. nulta nedelja (početak tretmana) unutar grupe. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

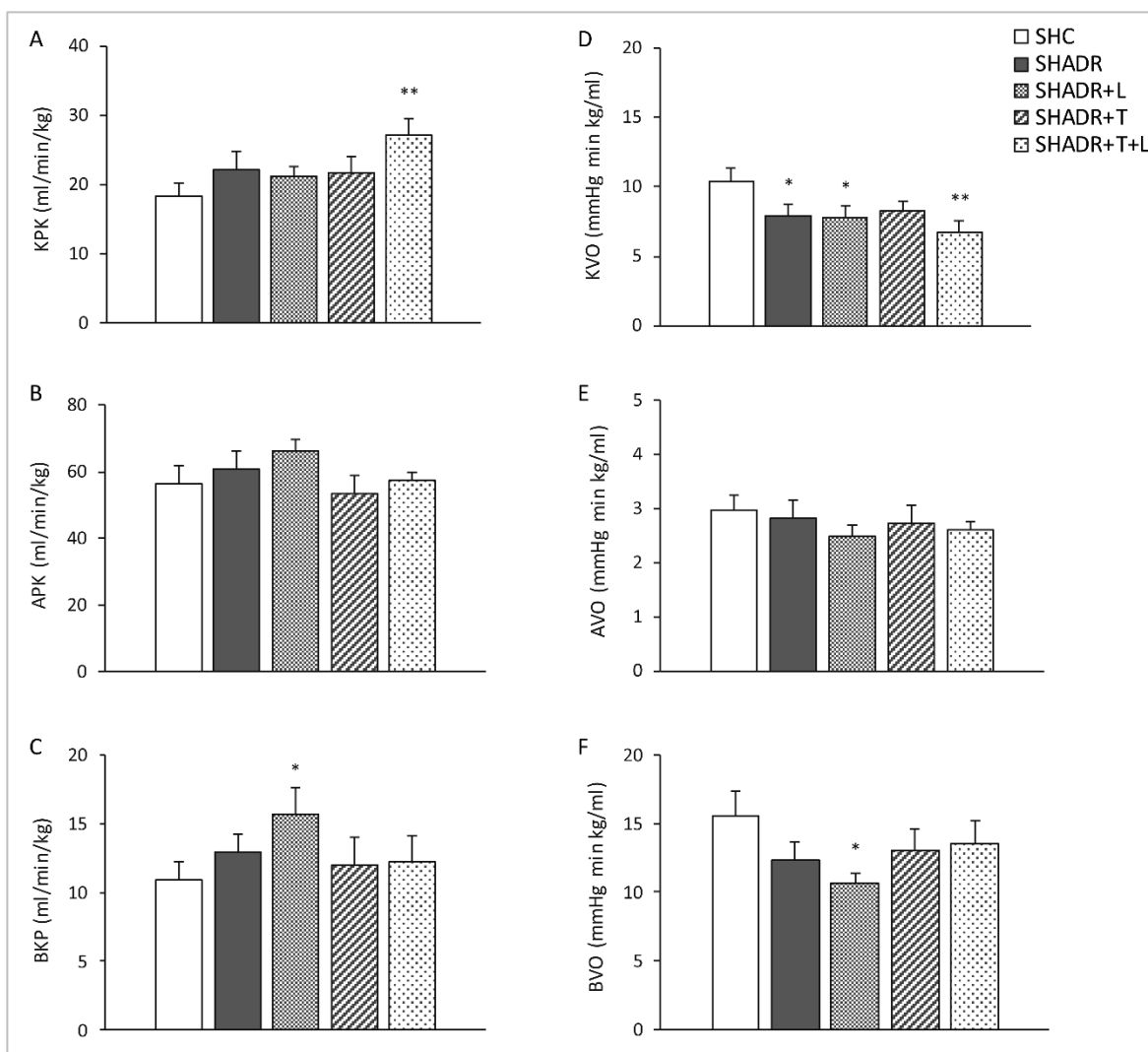
4.3. Sistemski i regionalni hemodinamski parametri na kraju tretmana

Vrednosti sistemskih hemodinamskih parametara: sistolni, dijastolni i srednji arterijski pritisak, frekvencija srčanih kontrakcija, minutni volumen srca i ukupni periferni vaskularni otpor mereni direktnom metodom na kraju tretmana prikazani su na **Slici 4-3.**, a regionalnih hemodinamskih parametara: protok krvi i vaskularni otpor u aorti, karotidnoj i bubrežnoj arteriji na **Slici 4-4.** Dobijeni rezultati su pokazali da nema statistički značajnih razlika u pogledu sistemskih hemodinamskih parametara između SH pacova koji su primili ADR i kontrolnih životinja. Tretman losartanom doveo je do značajnog sniženja sistolnog i srednjeg arterijskog pritiska u odnosu na vrednosti izmerene kod kontrolnih SH pacova ($p < 0,05$), dok je u ovoj grupi i srednji arterijski pritisak bio je snižen i u poređenju sa SH pacovima koji su primili ADR ($p < 0,05$). Tretman tempolom doveo je do značajnog povećanja frekvencije srčanih kontrakcija ($p < 0,01$) i smanjenja minutnog volumena srca ($p < 0,05$) u poređenju sa pacovima SHADR grupe. Takođe, minutni volumen srca kod pacova tretiranih tempolom bio je značajno snižen u poređenju sa vrednostima izmerenim kod pacova koji su dobijali kombinovani tretman. Ukupni periferni vaskularni otpor nije se značajno menjao između eksperimentalnih grupa.

Otpor protoku krvi bio je značajno smanjen u karotidnim arterijama pacova SHADR, SHADR+L i SHADR+T+L grupe u poređenju sa kontrolnim životinjama. Samo je kombinovani tretman (SHADR+T+L) doveo do značajnog povećanja protoka krvi kroz karotidnu arteriju ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Protok krvi i vaskularni otpor u aorti se nisu menjali ni pod jednim primenjenim tretmanom. Tretman losartanom povećao je protok ($p < 0,05$), a smanjio otpor u bubrežnoj arteriji ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednostima izmerenim kod kontrolnih SH pacova.



Slika 4-3. Sistemski hemodinamski parametri: sistolni krvni pritisak (SKP) (A), dijastolni krvni pritisak (DKP) (B), srednji arterijski pritisak (SAP) (C), frekvencija srčanih kontrakcija (FS) (D), minutni volumen srca (MV) (E) i ukupni periferni vaskularni otpor (UPO) (F). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM ($n = 8$). * $p < 0,05$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. SHADR, \$ $p < 0,05$ vs. SHADR+L; & $p < 0,05$ vs. SHADR+T. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

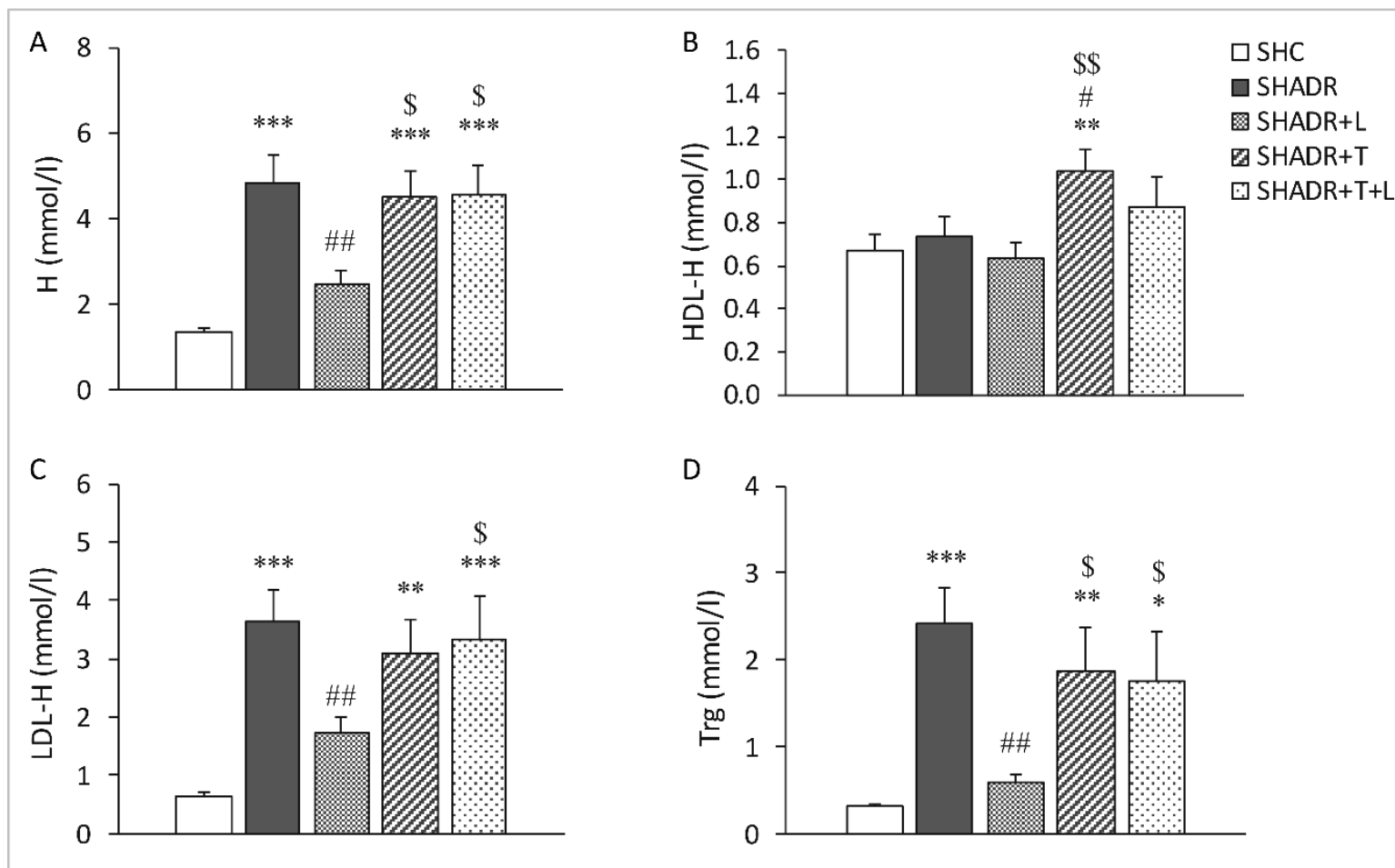


Slika 4-4. Regionalni hemodinamski parametri: (A) protok krvi kroz karotidnu arteriju (KPK), (B) protok krvi kroz aortu (APK), (C) protok krvi kroz bubrežnu arteriju (BPK), (D) vaskularni otpor u karotidnoj arteriji (KVO), (E) vaskularni otpor u aorti (AVO), (F) vaskularni otpor u bubrežnoj arteriji (BVO). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM (n = 7-8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. SHC. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

4.4. Biohemijski parametri

4.4.1. Lipidni status

Rezultati procene lipidnog statusa eksperimentalnih životinja prikazani su na **Slici 4-5**. Ukupni i LDL holesterol, kao i trigliceridi bili su značajno povišeni u plazmi SH pacova koji su primili ADR ($p < 0,001$) u odnosu na vrednosti kontrolnih životinja. Tempol i kombinovani tretman nisu uticali na vrednosti ovih parametara i one su ostale značajno više od vrednosti izmerenih kod kontrolnih pacova. Samo je losartan snizio vrednosti ovih parametara ($p < 0,01$) u odnosu na vrednosti izmerene kod pacova SHADR grupe, do nivoa koji nije bio značajno različit od onih određenih kod kontrolnih pacova. S druge strane, tretman tempolom doveo je do značajnog povećanja HDL holesterola u plazmi pacova SHADR+T grupe u poređenju sa vrednostima izmerenim u plazmi pacova SHADR grupe ($p < 0,05$), kao i u odnosu na vrednosti kod kontrolnih životinja i pacova koji su dobijali losartan ($p < 0,01$).

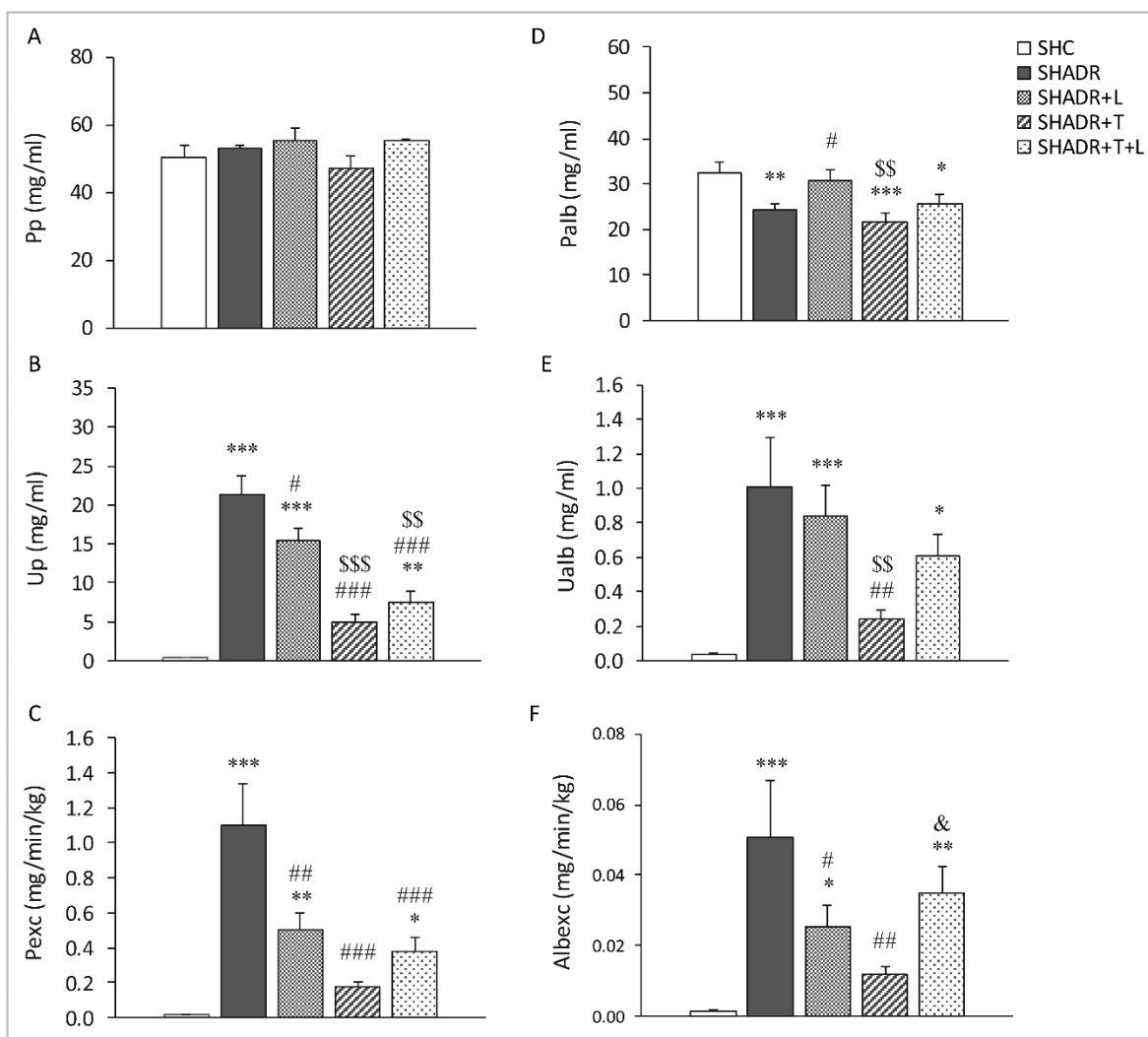


Slika 4-5. Vrednosti ukupnog holesterola (H) (A), HDL holesterola (HDL-H) (B), LDL holesterola (LDL-H) (C) i triglicerida (Tgr) (D) u plazmi. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM (n = 7-8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. SHADR; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ vs. SHADR+L. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol

4.4.2. Procena bubrežne funkcije

Proteinurija (P_{exc}), albuminurija (Alb_{exc}) i odnos koncentracije proteina i kreatinina u urinu ($U_{p/cr}$) predstavljaju parametre koji su korišćeni za procenu bubrežne funkcije. Takođe, brzina glomerulske filtracije određivana je merenjem vrednosti klirensa kreatinina (C_{cr}) i uree (C_u). Dobijeni rezultati pokazuju da nije bilo značajnih razlika u pogledu koncentracije ukupnih proteina u plazmi između eksperimentalnih grupa (**Slika 4-6. A**). Kod SH pacova koji su primili ADR došlo je do značajnog povećanja koncentracije ukupnih proteina u urinu i proteinurije ($p < 0,001$) (**Slika 4-6. B i C**). Svi ispitivani tretmani značajno su smanjili vrednosti ovih parametara u poređenju sa vrednostima izmerenim kod pacova SHADR grupe. Jedino je tretman tempolom smanjio proteinuriju i koncentraciju ukupnih proteina u urinu pacova SHADR+T grupe do nivoa koji nije bio značajno različit od vrednosti izmerenih kod kontrolnih pacova.

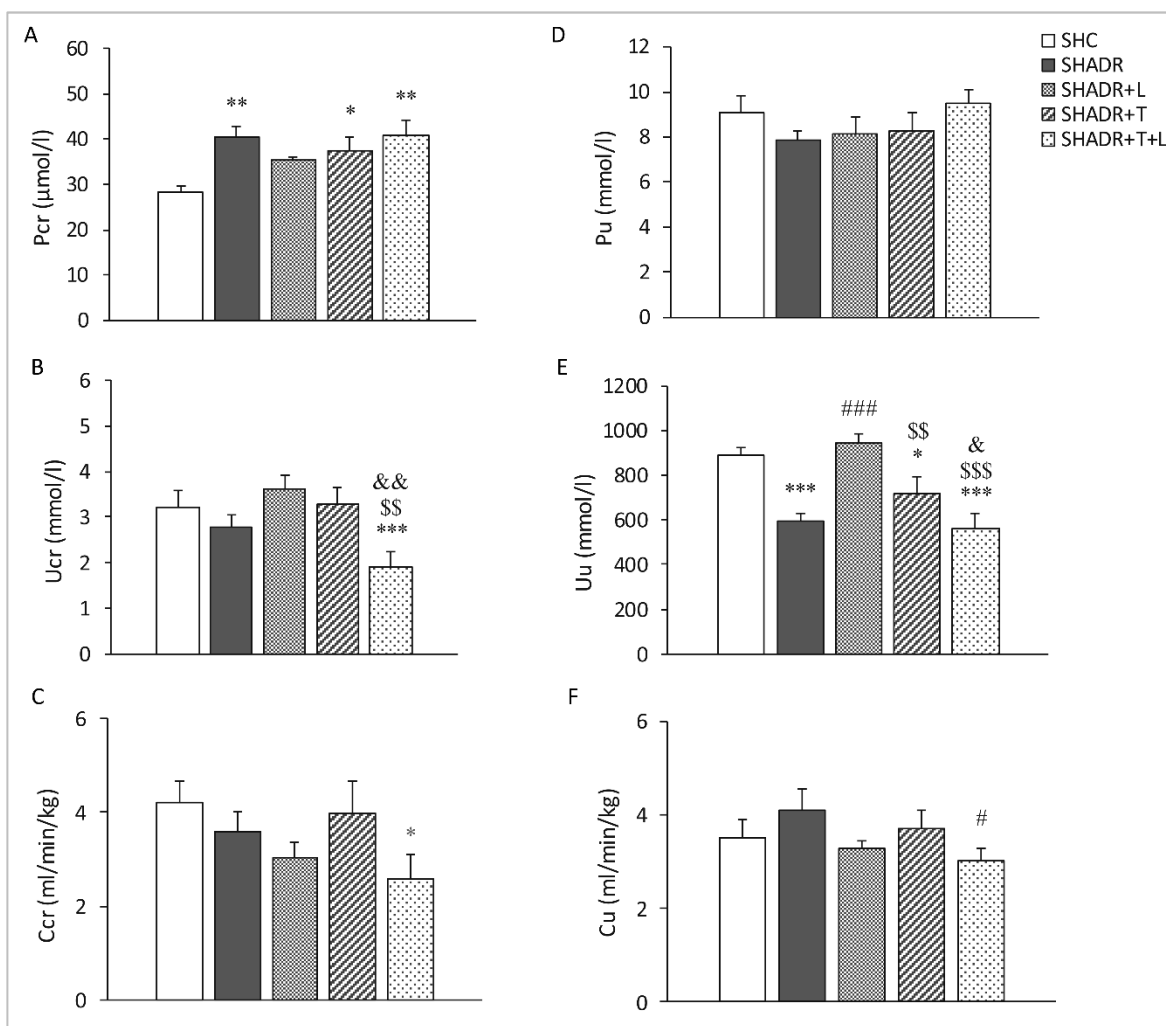
U plazmi SH pacova koji su primili ADR došlo je do značajnog sniženja koncentracije albumina ($p < 0,01$) u odnosu na vrednosti kod kontrolnih životinja. Tretman losartanom je značajno povećao koncentraciju albumina u plazmi ($p < 0,05$) i to do nivoa izmerenih kod kontrolnih životinja (**Slika 4-6. D**). Takođe, kod pacova SHADR grupe došlo je do značajnog povećanja koncentracije albumina u urinu i albuminurije ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnim pacovima (**Slika 4-6. E i F**). Od svih ispitivanih tretmana, jedino je tempol kod pacova SHADR+T grupe doveo do značajnog smanjenja vrednosti ovih parametara ($p < 0,01$), i to do nivoa koji nisu bili značajno različiti od onih izmerenih kod kontrolnih pacova.



Slika 4-6. Koncentracija proteina u plazmi (P_p) (A), koncentracija proteina u urinu (U_p) (B), vrednosti ekskrecije proteina urinom (P_{exc}) (C), koncentracija albumina u plazmi (P_{alb}) (D), koncentracija albumina u urinu (U_{alb}) (E) i vrednost ekskrecije albumina urinom (Alb_{exc}) (F). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM ($n = 7-8$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs. SHADR; \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. SHADR+L. & $p < 0,05$ vs. SHADR+T. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.**

Na osnovu izmerenih vrednosti koncentracije kreatinina u plazmi SH pacova koji su primili ADR došlo do značajnog povećanja koncentracije kreatinina ($p < 0,01$) u odnosu na vrednosti kod kontrolnih životinja (**Slika 4-7. A**). Za razliku od druga dva tretmana, jedino je tretman losartanom smanjio koncentraciju kreatinina u plazmi pacova (SHADR+L) do vrednosti koja nije bila značajno različita od vrednosti kod kontrolnih životinja. Losartan u kombinaciji sa tempolom doveo je do značajnog sniženja koncentracije kreatinina u urinu pacova SHADR+T+L grupe u poređenju sa vrednostima izmerenim kod pacova koji su dobijali pojedinačne tretmane losartanom i tempolom ($p < 0,01$), kao i u odnosu na kontrolne životinje ($p < 0,001$) (**Slika 4-7. B**). Takođe, kod pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L) došlo je do značajnog smanjenja glomerulske filtracije izražene preko klirensa kreatinina ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim životinjama (**Slika 4-7. C**).

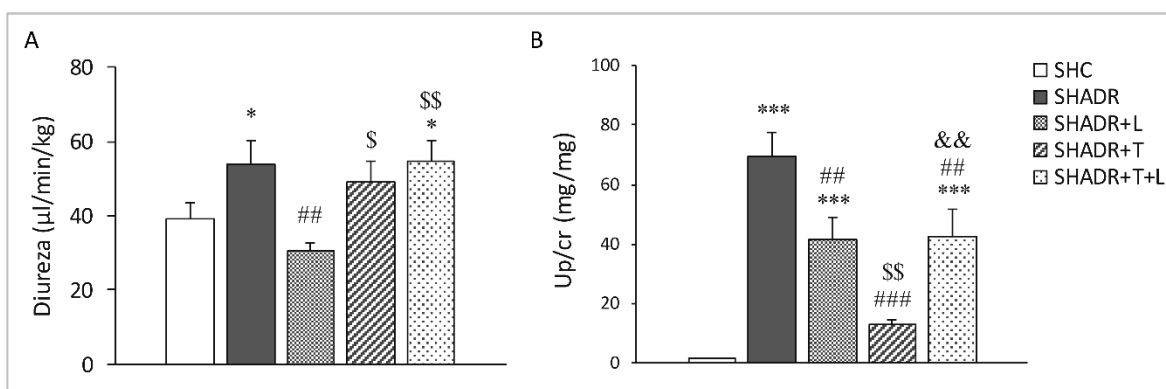
U pogledu koncentracije uree u plazmi nisu uočene značajne razlike između eksperimentalnih grupa (**Slika 4-7. D**). Kod SH pacova koji su primili ADR došlo je do značajnog sniženja koncentracija uree u urinu u poređenju sa kontrolnim životinjama (**Slika 4-7. E**). Za razliku od druga dva tretmana, tretman losartanom značajno je povećao koncentraciju uree u urinu pacova SHADR+L grupe ($p < 0,001$) do nivoa kontrolnih pacova. Klirens uree pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L) bio je statistički značajno snižen ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednošću klirensa uree pacova SHADR grupe (**Slika 4-7. F**).



Slika 4-7. Koncentracija kreatinina u plazmi (P_{cr}) (A), koncentracija kreatinina u urinu (U_{cr}) (B), vrednost klirensa kreatinina (C_{cr}) (C), koncentracija uree u plazmi (P_u) (D), koncentracija uree u urinu (U_u) (E) i vrednost klirensa uree (C_u) (F). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM ($n = 7-8$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. SHADR; \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. SHADR+L; & $p < 0,05$, && $p < 0,01$ vs. SHADR+T. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

Kod SH pacova koji su primili ADR statistički značajno je povećana diureza ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim životinjama (**Slika 4-8. A**). Za razliku od druga dva ispitivana tretmana, jedino je losartan doveo do značajnog smanjenja ($p < 0,01$) diureze kod pacova SHADR+L grupe, do nivoa koji se nije značajno razlikovao od onog kod kontrolnih životinja.

Odnos koncentracije proteina i kreatinina u urinu ($U_{p/cr}$), koji predstavlja još jedan parametar za procenu bubrežne funkcije, bio je značajno povećan kod pacova SHADR grupe ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolne životinje (**Slika 4-8. B**). Tretman losartanom i kombinovani tretman značajno ($p < 0,01$) su smanjili vrednost $U_{p/cr}$ i to do istog nivoa, koji je bio viši u odnosu na grupu kontrolnih pacova ($p < 0,001$). S druge strane, tretman tempolom značajno je smanjio $U_{p/cr}$ ($p < 0,001$) do nivoa koji nije bio značajno različit od kontrolnih životinja.



Slika 4-8. Vrednosti diureze (A) i odnos koncentracije proteina/kreatinina u urinu ($U_{p/cr}$) (B). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM ($n = 7-8$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. SHADR; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ vs. SHADR+L; && $p < 0,01$ vs. SHADR+T. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

4.5. Histopatološke promene i ekspresija vimentina, nestina i MMP-1 u bubrezima

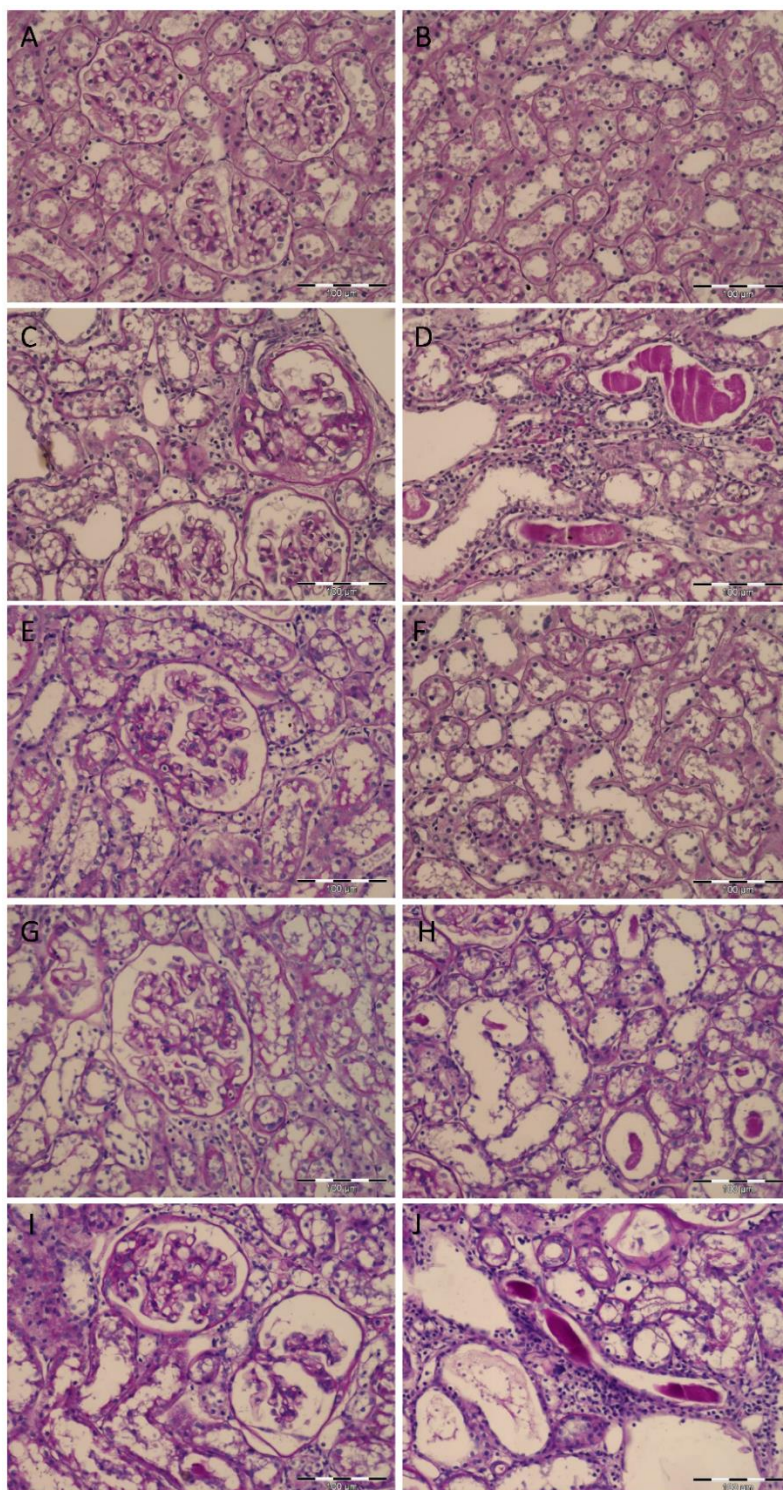
Morfološke promene u bubrezima, kao i ekspresija vimentina i nestina, proteina intermedijarnih filamenata citosketa čija izmenjena organizacija i ekspresija predstavlja pokazatelj oštećenja u tkivu bubrega, ispitivane su kod pacova svih eksperimentalnih grupa. Takođe, u bubrezima je određivana matriksna metaloproteinaza-1 (MMP-1), enzim koji učestvuje u degradaciji vanćelijskog matriksa i ima ulogu u održanju strukturnog i funkcionalnog integriteta glomerula.

4.5.1. Histopatološka analiza tkiva bubrega

Histopatološka analiza strukture bubrega pacova svih eksperimentalnih grupa predstavljena je na **Slici 4-9**. Normalan izgled glomerula i tubulointersticijuma uočen je u bubrezima kontrolnih pacova (SHC) (**Slika 4-9. A, B**). U bubrezima pacova SHADR grupe prisutne su skleroza glomerula sa kapsularnim adhezijama glomerularnog klupka i periglomerularna infiltracija mononuklearnim leukocitima i intersticijska fibroza (**Slika 4-9. C**). Takođe su uočene i tubulointersticijske lezije, koje obuhvataju atrofiju i dilataciju tubula sa PAS pozitivnim sadržajem, intersticijsku fibrozu i infiltraciju mononuklearnih leukocita (**Slika 4-9. D**). Tretman losartanom rezultirao je očuvanjem strukture tubulointersticijuma, dok su u glomerulima prisutne samo umerene promene (SHADR+L) (**Slika 4-9. E, F**). Blage promene u glomerulima sa blagom kapsularnom adhezijom i

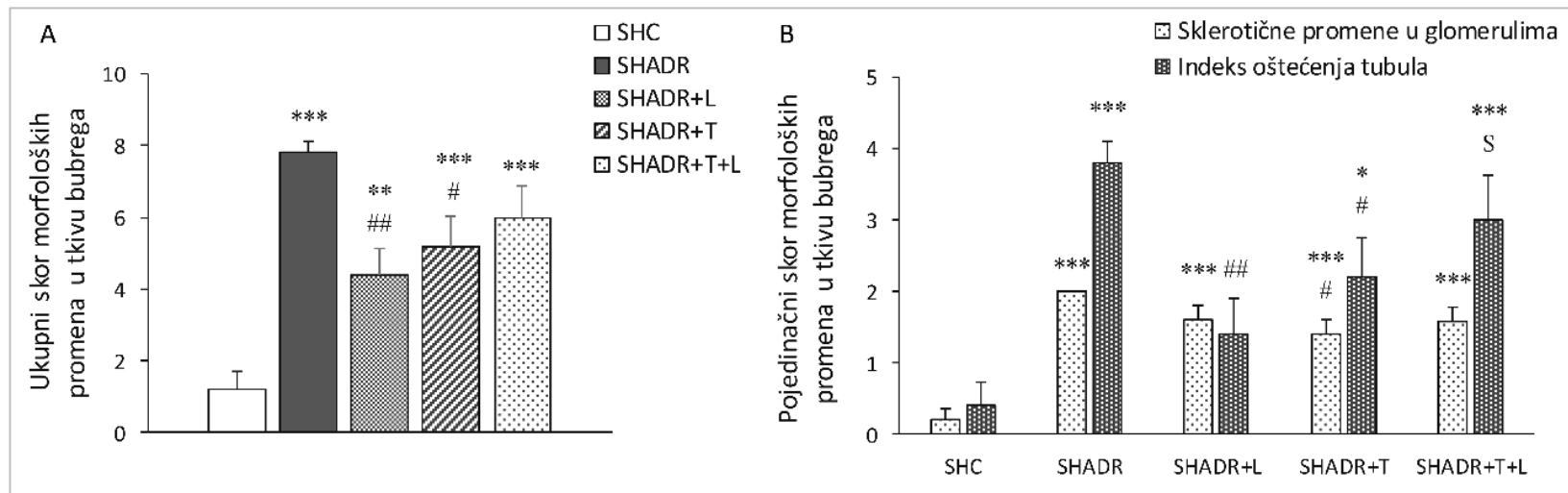
početnom sklerozom, praćene umerenim promenama u tubulima, prisutne su kod pacova koji su dobijali tempol (SHADR+T) (**Slika 4-9. G, H**). S druge strane, u bubrezima pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L) prisutni su glomeruli zahvaćeni sklerozom sa kapsularnim adhezijama i tubulointersticijske lezije slične onima u SHADR grupi (**Slika 4-9. I, J**).

Ukupni zbir morfoloških promena u bubrezima i zbir oštećenja pojedinih struktura bubrega predstavljeni su na **Slici 4-10**. U bubrezima SH pacova koji su primili ADR došlo je do značajnih strukturnih promena, koje su se ogledale u značajno povećanoj sklerози glomerula i oštećenju tubula u poređenju sa kontrolnim životinjama. Pojedinačni tretmani losartanom i tempolom značajno su sprečili ova oštećenja bubrega, a izraženiji efekat u tome pokazao je losartan. U poređenju sa promenama prisutnim u bubrezima pacova SHADR grupe, tretman losartanom bolje je očuvao strukturu tubula, dok je tempol značajno smanjio sklerotične promene u glomerulima. S druge strane, kombinovani tretman nije doveo do poboljšanja strukture bubrega pacova SHADR+T+L grupe u poređenju sa promenama u bubrezima pacova SHADR grupe.



Slika 4-9. Histopatološka analiza strukture bubrega. Normalan izgled glomerula (A) i tubulointersticijuma (B) bubrega pacova kontrolne SH grupe (SHC). Skleroza glomerula (gore

desno), periglomerularna intersticijska fibroza i infiltracija mononuklearnih leukocita (**C**); atrofija i dilatacija tubula sa PAS pozitivnim sadržajem, intersticijska fibroza sa peritubularnom infiltracijom mononuklearnih leukocita (**D**) u bubrezima SH pacova koji su primili ADR (SHADR). Umerena kapsularna adhezija, segmentna skleroza 1/3 glomerularnog klupka (**E**); dobro očuvani tubuli i intersticijum (**F**) u bubrezima pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L). Glomerul sa blagom kapsularnom adhezijom i početnom sklerozom (**G**) i blaga dilatacija tubula sa retkim PAS pozitivnim sadržajem (**H**) u bubrezima pacova koji su dobijali tempol (SHADR+T). Levi glomerul sa kapsularnom adhezijom i segmentnom sklerozom glomerula, desni glomerul sa kapsularnom adhezijom, početnom sklerozom i kolapsom glomerularnog kapilarnog klupka (**I**); dilatacija tubula sa PAS pozitivnim sadržajem, intersticijska infiltracija mononuklearnih leukocita i blaga intersticijska fibroza (**J**) u bubrezima pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L). SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol. PAS bojenje, uveličanje x20, razmera 100 µm.

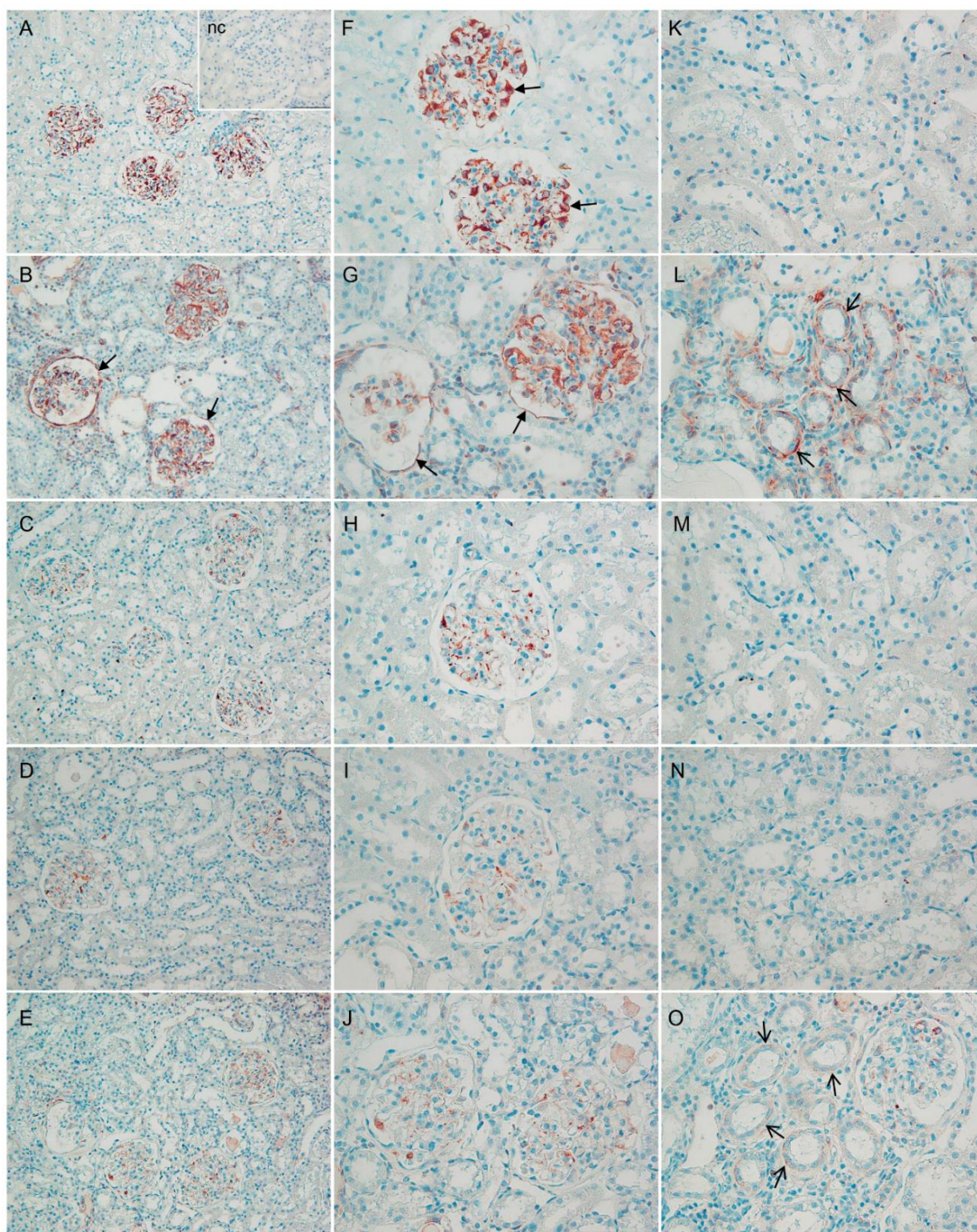


Slika 4-10. Ukupni (A) i pojedinačni (B) skor morfoloških promena u tkivu bubrega. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM (n = 6).
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. SHADR; \$ $p < 0,05$ vs. SHADR+L. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

4.5.2. *Imunohistohemijska detekcija vimentina i nestina u tkivu bubrega*

Vimentin i nestin predstavljaju proteine intermedijarnih filamenata citoskeleta, čija izmenjena organizacija i ekspresija u podocitima, tubulocitima i ćelijama tubulointercijuma predstavlja marker oštećenja tkiva bubrega.

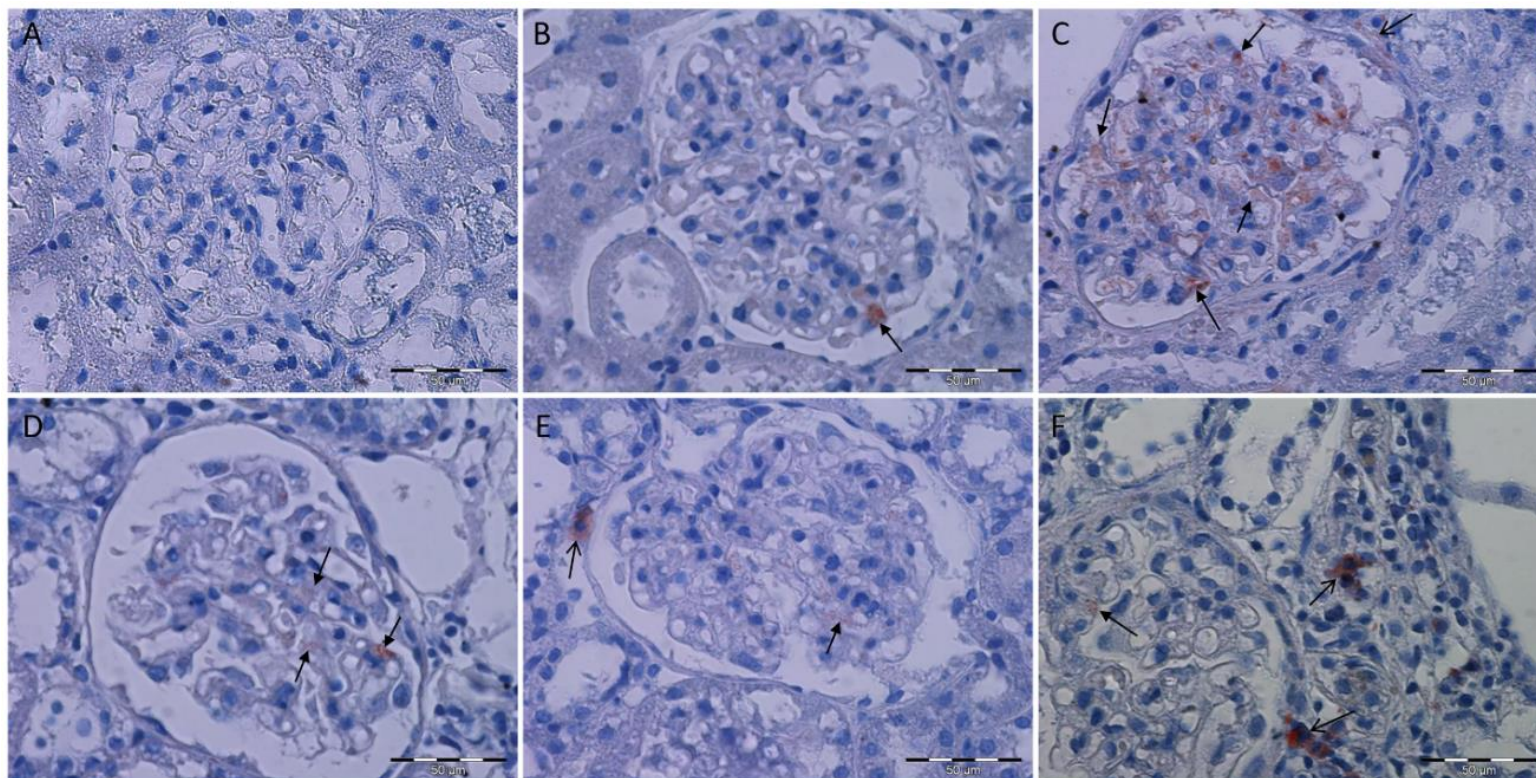
Imunohistohemijska detekcija vimentina u tkivu bubrega prikazana je na **Slici 4-11**. U bubrezima kontrolnih SH pacova prisutna je normalna ekspresija vimentina u podocitima, vaskularnom zidu arteriola i mestimičnim intersticijskim fibroblastima (**Slika 4-11. A, F**), dok su tubulociti negativni za vimentin (**Slika 4-11. K**). U bubrezima pacova SHADR grupe uočena je povećana ekspresija vimentina u podocitima, mezangijalnim ćelijama i parijetalnim epitelnim ćelijama Boumanove kapsule sklerotičnih glomerula (**Slika 4-11. B, G**). Takođe je u tubulointercijumu detektovana *de novo* ekspresija vimentina na mestima gde se dediferencirani tubulociti proksimalnih tubula, fibroblasti i miofibroblasti boje pozitivno na vimentin (**Slika 4-11. L**). Pojedinačni tretmani losartanom (**Slika 4-11. C, H**) i tempolom (**Slika 4-11. D, I**) izrazito su smanjili ekspresiju vimentina u podocitima i mezangijalnim ćelijama, dok su parijetalne ćelije Boumanove kapsule i ćelije tubula negativne za vimentin (**Slika 4-11. M, N**). U bubrezima pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L) umerena *de novo* ekspresija vimentina uočena je u dediferenciranim tubulocitima proksimalnih tubula, kao i fibroblastima i miofibroblastima intersticijuma (**Slika 4-11. O**), dok je ekspresija vimentina u bubrežnim telašcima (**Slika 4-11. E, J**) slična kao kod pacova tretiranih losartanom (SHADR+L) ili tempolom (SHADR+T).



Slika 4-11. Imunohistohemijska detekcija ekspresije vimentina u tkivu bubrega. Normalna ekspresija vimentina u podocitima (pune strelice), vaskularnom zidu arterije i u pojedinačnim fibroblastima intersticijuma (**A, F**); tubulociti negativni za vimentin (**K**) u bubrezima kontrolne grupe

pacova (SHC). Povećana ekspresija vimentina u podocitima, mezangijalnim ćelijama i parijetalnim epitelnim ćelijama Boumanove kapsule (pune strelice) sklerotičnih glomerula (**B**, **G**); *de novo* ekspresija vimentina u tubulointercijumu na mestu gde se dediferencirani tubulociti proksimalnih tubula, fibroblasti i miofibroblasti (otvorene strelice) boje pozitivno na vimentin (**L**) u bubrežima pacova SHADR grupe. Jasno smanjena ekspresija vimentina u podocitima i mezangijalnim ćelijama, dok su parijetalne epitelne ćelije Boumanove kapsule (**C**, **H**) i tubulociti (**M**) negativni za vimentin u bubrežima pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L). U bubrežima pacova koji su dobijali tempol (SHADR+T) intenzitet i obrazac ekspresije vimentina (**D**, **I**, **N**) sličan kao kod pacova SHADR+L grupe. U bubrežima pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L) prisutna je umerena *de novo* ekspresija vimentina u tubulocitima proksimalnih tubula, fibroblastima i miofibroblastima intersticijuma (otvorene strelice), koje se boje pozitivno za vimentin (**O**), dok je ekspresija vimentina u bubrežnim telašcima (**E**, **J**) slična kao kod pacova tretiranih losartanom (SHADR+L) (**H**) ili tempolom (SHADR+T) (**I**). nc – negativno kontrolno bojenje; SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol. Uveličanje x20 (A-E), razmera 200 µm; uveličanje x40 (nc, F-O), razmera 100 µm.

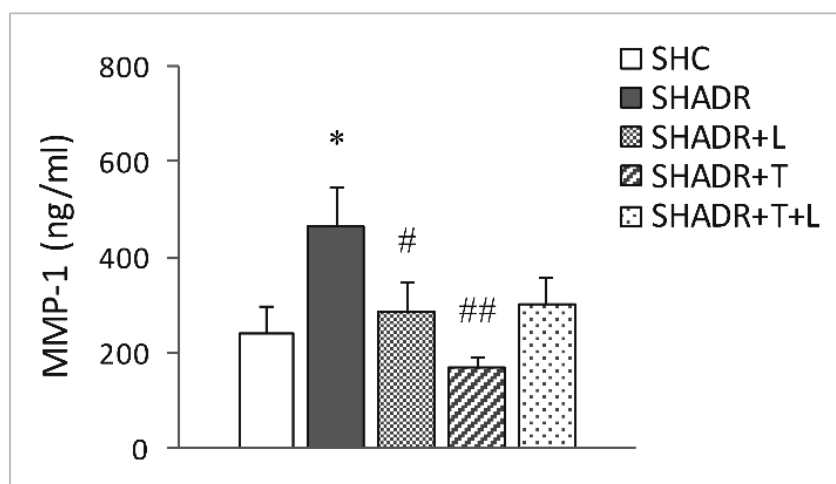
Imunohistohemijska detekcija nestina u tkivu bubrega prikazana je na **Slici 4-12**. U bubrežima pacova kontrolne grupe (SHC) uočeno je fokalno pozitivno bojenje za nestin, prisutno u nekim bubrežnim telašcima ograničeno na pojedine podocite (**Slika 4-12. B**). U bubrežima pacova SHADR grupe ekspresija nestina prisutna je u skoro svim podocitima (**Slika 4-12. C**). Tretmani losartanom (**Slika 4-12. D**), tempolom (**Slika 4-12. E**) i njihovom kombinacijom (**Slika 4-12. F**) znatno su smanjili ekspresiju nestina, koja je bila slična kao kod kontrolnih životinja. Pozitivno bojenje na nestin detektovano je u nekim intersticijskim ćelijama, uglavnom u periglomerularnoj zoni (**Slika 4-12. E, F**).



Slika 4-12. Imunohistohemijska detekcija ekspresije nestina u tkivu bubrega. Negativno kontrolno bojenje (A). Fokalna ekspresija nestina u nekim bubrežnim telašcima, ograničena na pojedine podocyte (puna strelica) u bubrezima kontrolnih životinja (SHC) (B). Ekspresija nestina u skoro svim podocitima (pune strelice) (C) prisutna je u bubrezima pacova SHADR grupe. U bubrezima pacova koji su dobijali losartan (D), tempol (E) i kombinovani tretman (F) znatno je snižena ekspresija nestina i slična kao kod kontrolnih životinja. U periglomerularnoj zoni pojedine intersticijske ćelije (otvorene strelice) se boje pozitivno za nestin (E, F). SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol. Uveličanje x40, razmera 50 μm.

4.5.3. Kvantifikacija matriks metaloproteinaze-1 u bubrezima

U bubrezima pacova eksperimentalnih grupa ispitivana je matriksna metaloproteinaza-1 (MMP-1), koja ima ulogu u degradaciji vanćelijskog matriksa i očuvanju integriteta glomerula. U homogenatu bubrega SH pacova koji su primili ADR došlo je do statistički značajnog povećanja koncentracije MMP-1 ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim životinjama (**Slika 4-13**). Od svih ispitivanih tretmana, tempol je najviše snizio ovaj parametar ($p < 0,01$) u poređenju sa vrednostima izmerenim u bubrezima pacova SHADR grupe. S druge strane, koncentracija MMP-1 kod pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L) ($p < 0,05$) ili kombinovani tretman (SHADR+T+L) snižena je do nivoa kontrolnih pacova.



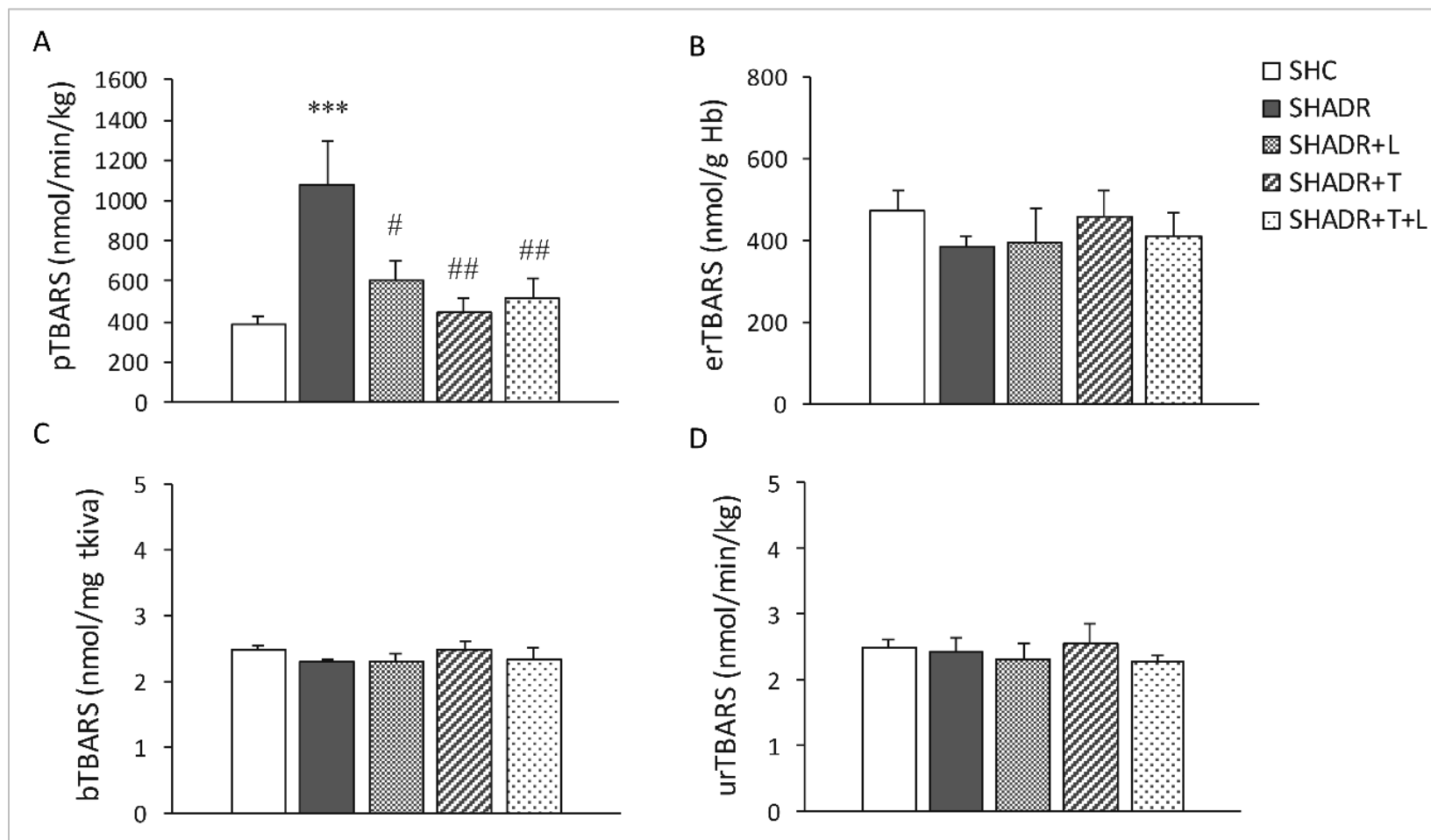
Slika 4-13. Koncentracija matriksne metaloproteinaze-1 (MMP-1) u homogenatu bubrega (ELISA metoda). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0,05$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. SHADR. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

4.6. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne odbrane

U cilju merenja nivoa oksidativnog stresa u ovom istraživanju određivani su markeri lipidne peroksidacije (TBARS, supstance koje su nusprodukti lipidne peroksidacije i reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom) i oksidativne modifikacije proteina (PCOs, nivo karbonilovanih proteina). Parametri antioksidativne odbrane koji su određivani kod pacova eksperimentalnih grupa obuhvatali su enzime antioksidativne odbrane (SOD, CAT, GPx i GR) i antioksidativni kapacitet primenom ABTS testa.

4.6.1. Lipidna peroksidacija

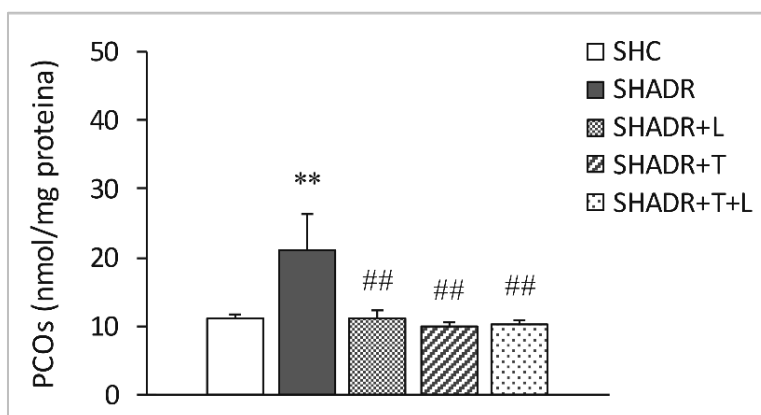
Procena lipidne peroksidacije vršena je merenjem nivoa TBARS-a, nusprodukata lipidne peroksidacije koji reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom. U plazmi SH pacova koji su primili ADR brzina oslobađanja TBARS-a bila je značajno povećana ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnim životinjama (**Slika 4-14. A**). Svi ispitivani tretmani značajno su smanjili brzinu oslobađanja TBARS-a u plazmi pacova SHADR+L ($p < 0,05$), kao i SHADR+T i SHADR+T+L ($p < 0,01$) grupe, a do nivoa koji su bili slični vrednostima kod kontrolnih životinja. Nisu uočene značajne razlike u pogledu nivoa TBARS-a u eritrocitima i homogenatu bubrega, kao ni u brzini ekskrecije TBARS-a urinom između eksperimentalnih grupa (**Slika 4-14. B, C i D**).



Slika 4-14. Brzina oslobađanja TBARS-a (nusprodukti lipidne peroksidacije koji reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom) u plazmi (pTBARS) (A), nivo TBARS-a u eritrocitima (erTBARS) (B), nivo TBARS-a u homogenatu bubrega (bTBARS) (C) i brzina ekskrecije TBARS-a urinom (urTBARS) (D). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM (n = 6-8). *** $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. SHADR. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempo

4.6.2. Sadržaj karbonilovanih proteina

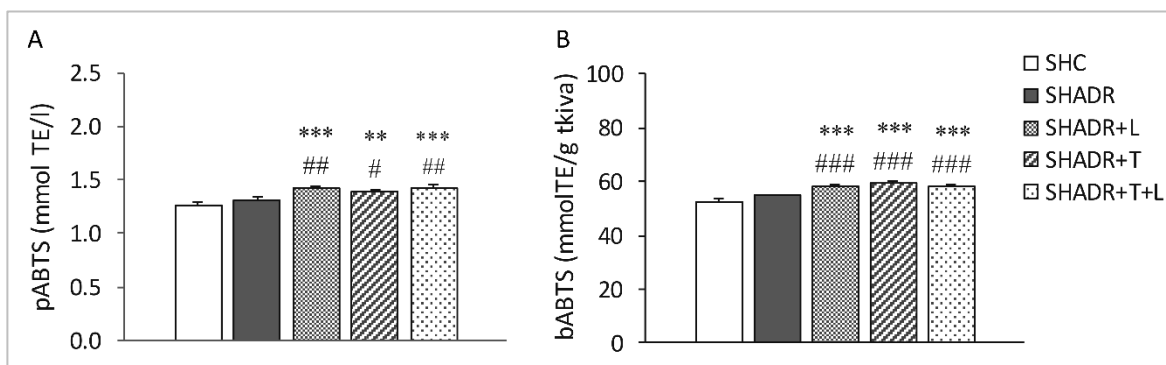
Određivanje markera oksidacije proteina u homogenatu bubrega vršeno je na osnovu prisustva karbonilnih grupa (PCOs, engl. *protein carbonyl content*). U homogenatima bubrega SH pacova koji su primili ADR koncentracija karbonilovanih proteina (PCOs) statistički značajno je povećana ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolne pacove (**Slika 4-15.**). Svi ispitivani tretmani značajno su smanjili koncentracije karbonilovanih proteina u homogenatima bubrega pacova ($p < 0,01$), do nivoa kontrolnih životinja.



Slika 4-15. Koncentracija karbonilovanih proteina (PCOs) u homogenatu bubrega. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM ($n = 6$). ** $p < 0,01$ vs. SHC; ## $p < 0,01$ vs. SHADR. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

4.6.3. Antioksidativni kapacitet

Antioksidativni kapacitet plazme i homogenata bubrega, meren pomoću ABTS testa, nije bio promenjen kod SH pacova koji su primili ADR u poređenju sa kontrolnim životinjama (**Slika 4-16**). Svi ispitivani tretmani doveli su do statistički značajnog povećanja ovog parametra u plazmi i homogenatu bubrega pacova SHADR+L, SHADR+T i SHADR+T+L grupe, kako u poređenju sa kontrolnim životinjama, tako i u poređenju sa pacovima SHADR grupe.

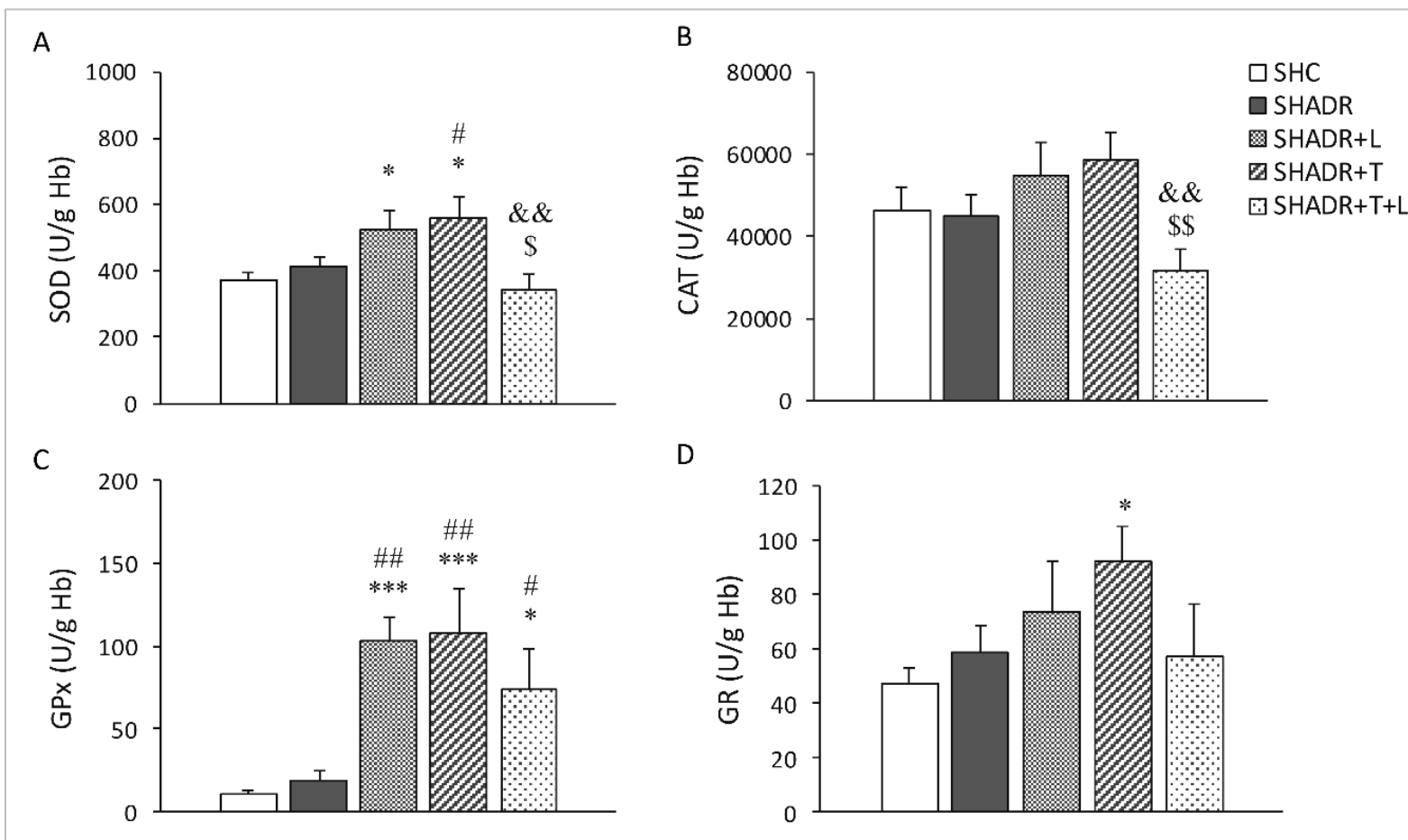


Slika 4-16. Nivo redukovanog ABTS radikal-katjona u plazmi (pABTS) (A) i homogenatu bubrega (bABTS) (B) kao parametar određivanja antioksidativnog kapaciteta. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM (n = 6-8). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. SHADR. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

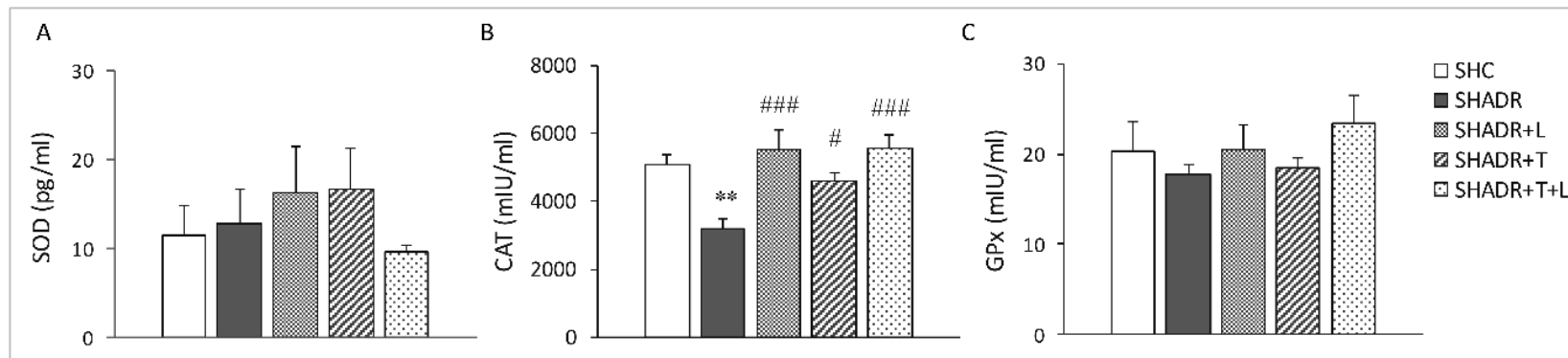
4.6.4. Enzimi antioksidativnog sistema

Aktivnosti enzima antioksidativnog sistema (SOD, CAT, GP_x i GR) u lizatu eritrocita SH pacova koji su primili ADR bile su na nivou vrednosti kontrolnih životinja (**Slika 4-17**). U eritrocitima pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L) ili tempol (SHADR+T) došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti SOD i GP_x ($p < 0,05$, $p < 0,001$), dok je u eritrocitima pacova SHADR+T grupe značajno povećana i aktivnost GR ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim životinjama. Takođe, tretman tempol značajno je povećao aktivnost SOD ($p < 0,05$), dok su oba pojedinačna tretmana losartanom i tempolom povećala aktivnost GP_x ($p < 0,01$) i u poređenju sa aktivnostima ovih enzima u eritrocitima pacova SHADR grupe. S druge strane, kombinovani tretman značajno je smanjio aktivnosti SOD i CAT u eritrocitima u odnosu na aktivnosti ovih antioksidativnih enzima nakon pojedinačnih tretmana losartanom i tempolom. Aktivnost GP_x u eritrocitima pacova koji su dobijali kombinovani tretman bila je značajno povećana ($p < 0,05$) u poređenju sa pacovima SHADR grupe i kontrolne grupe životinja.

Nivo ekspresije enzima antioksidativnog sistema u lizatu eritrocita prikazan je na **Slici 4-18**. U eritrocitima pacova SHADR grupe došlo je do značajnog smanjenja koncentracije CAT ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolnim pacovima. Svi ispitivani tretmani značajno su povećali koncentraciju CAT i vratili ovu vrednost na nivo kontrole. Nisu uočene značajne razlike u koncentracijama enzima SOD i GP_x u lizatima eritrocita između eksperimentalnih grupa.

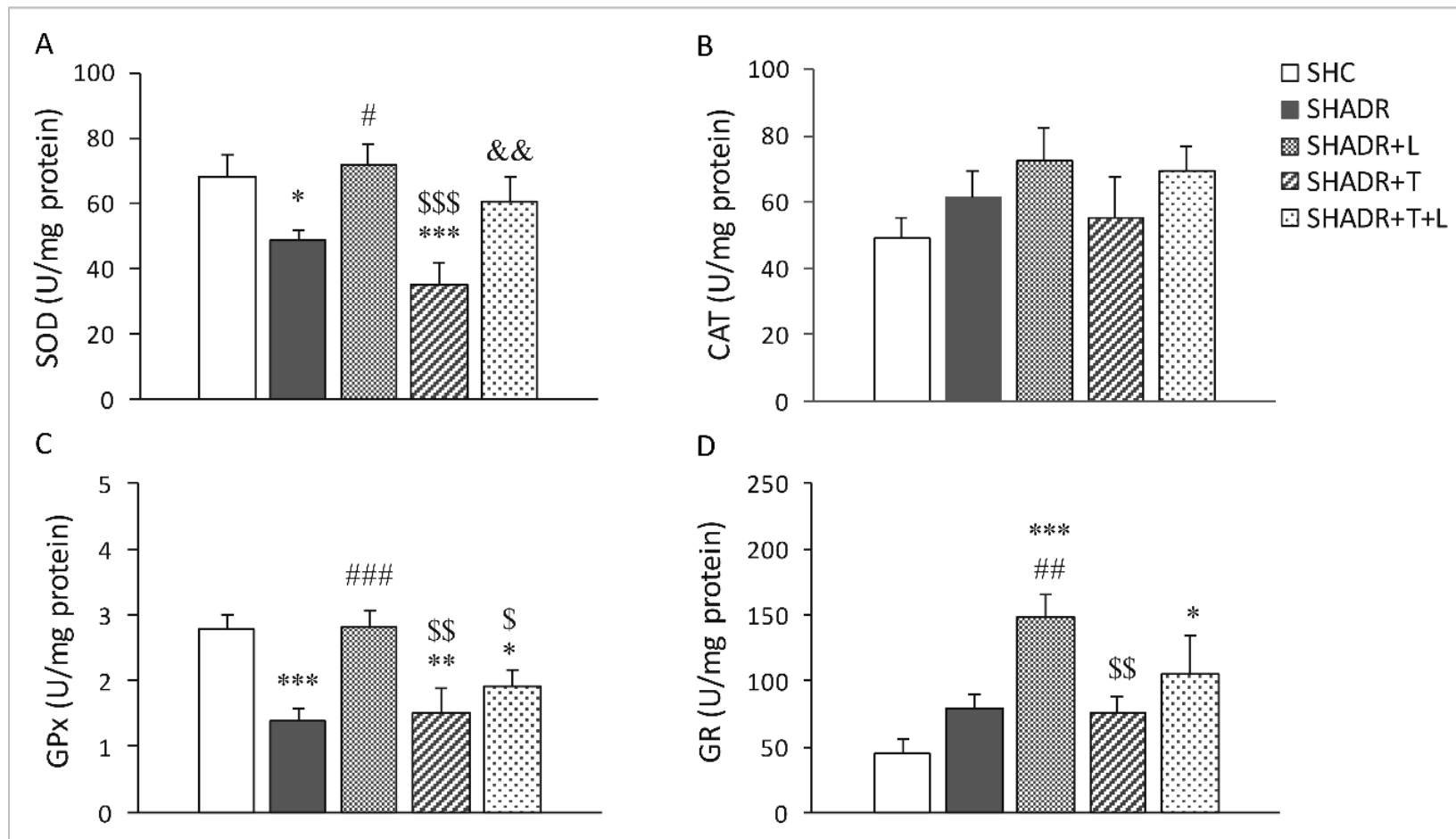


Slika 4-17. Aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u lizatu eritrocita: superoksid dismutaze (SOD) (A), katalaze (CAT) (B), glutation peroksidaze (GP_x) (C) i glutation reduktaze (GR) (D). Predstavljene su srednje vrednosti ± SEM (n = 6-7). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. SHADR; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$ vs. SHADR+L; && $p < 0,01$ vs. SHADR+T. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.



Slika 4-18. Ekspresija enzima antioksidativnog sistema u lizatu eritrocita: superoksid dismutaza (SOD) (A), katalaza (CAT) (B) i glutation peroksidaza (GP_x) (C). Predstavljene su srednje vrednosti ± SEM (n = 6-7). ** $p < 0,01$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. SHADR. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

Aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u homogenatu bubrega pacova svih eksperimentalnih grupa prikazane su na **Slici 4-19**. U homogenatu bubrega SH pacova koji su primili ADR došlo je do značajnog sniženja aktivnosti SOD i GP_x ($p < 0,05$, $p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnom grupom životinja. Tretman losartanom značajno je povećao aktivnosti ovih antioksidativnih enzima, SOD i GP_x ($p < 0,05$, $p < 0,001$), i to do nivoa izmerenih kod kontrolnih životinja. Takođe, losartan je u homogenatu bubrega pacova SHADR+L grupe značajno povećao aktivnost GR, kako u odnosu na pacove SHADR, tako i u odnosu na kontrolne životinje. Tretman tempolom nije uticao na promenu aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima u poređenju sa vrednostima izmerenim kod pacova SHADR grupe. S druge strane, kombinovani tretman je značajno povećao aktivnost SOD ($p < 0,01$) u poređenju sa vrednostima kod pacova koji su dobijali tempol, a do nivoa koji je bio blizak vrednostima izmerenim kod pacova kontrolne i SHADR+L grupe. S druge strane, aktivnost GP_x u homogenatu bubrega pacova koji su dobijali kombinovani tretman bila je značajno niža ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim životinjama, a slična vrednostima pacova SHADR i SHADR+T grupe. Kombinovani tretman doveo je do značajnog povećanja aktivnosti GR ($p < 0,05$) u poređenju sa aktivnošću GR u homogenatu bubrega pacova kontrolne grupe. Aktivnost CAT nije se menjala u homogenatima bubrega između eksperimentalnih grupa pacova.



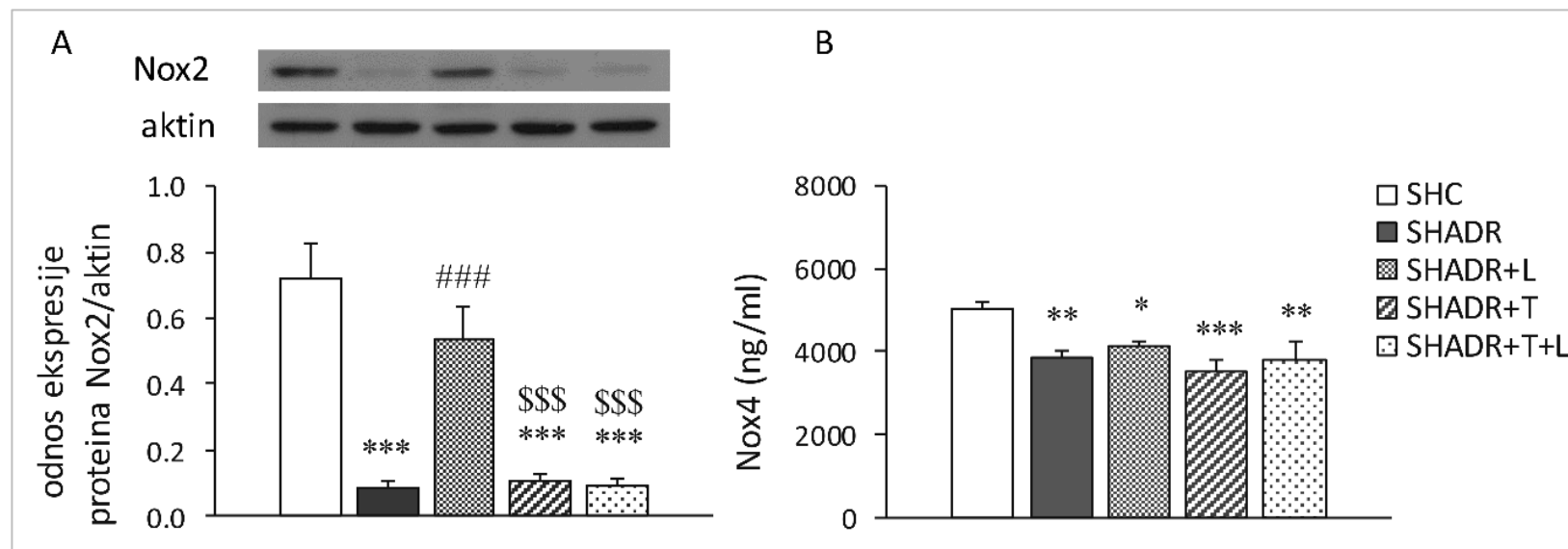
Slika 4-19. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u homogenatu bubrega: superoksid dismutaza (SOD) (A), katalaza (CAT) (B), glutation peroksidaza (GP_x) (C) i glutation reduktaza (GR) (D). Predstavljene su srednje vrednosti ± SEM (n = 8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. SHADR; \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. SHADR+L; && $p < 0,01$ vs. SHADR+T. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

4.6.5. Ekspresija i lokalizacija NADPH oksidaza

NADPH oksidaza predstavlja glavni izvor ROS u ćeliji i uključena je u proces inflamacije. U ovom istraživanju ispitivane su Nox2 i Nox4 izoforme katalitičke subjedinice NADPH oksidaze, koje se eksprimiraju u bubrezima.

4.6.5.1. Nivo ekspresije proteina Nox2 i Nox4 izoforme katalitičkih subjedinica NADPH oksidaze u homogenatu bubrega

U homogenatu bubrega SH pacova koji su primili ADR došlo je do značajnog smanjenja ekspresije obe izoforme katalitičke subjedinice NADPH oksidaze, Nox2 i Nox4 ($p < 0,001$, $p < 0,01$), u poređenju sa kontrolnim životinjama (**Slika 4-20.**). Od svih ispitivanih tretmana samo je losartan značajno povećao ekspresiju Nox2 proteina ($p < 0,001$) u homogenatu bubrega pacova SHADR+L grupe i to do nivoa koji je sličan vrednosti kod kontrolnih životinja. Ekspresija Nox4 proteina bila je značajno snižena ($p < 0,05$) kod pacova koji su dobijali losartan u poređenju sa kontrolnim životinjama. Nisu uočene značajne razlike u pogledu ekspresije Nox2 i Nox4 kod pacova koji su dobijali tempol (SHADR+T) ili kombinovani tretman (SHADR+T+L) u poređenju sa vrednostima izmerenim kod pacova SHADR grupe.

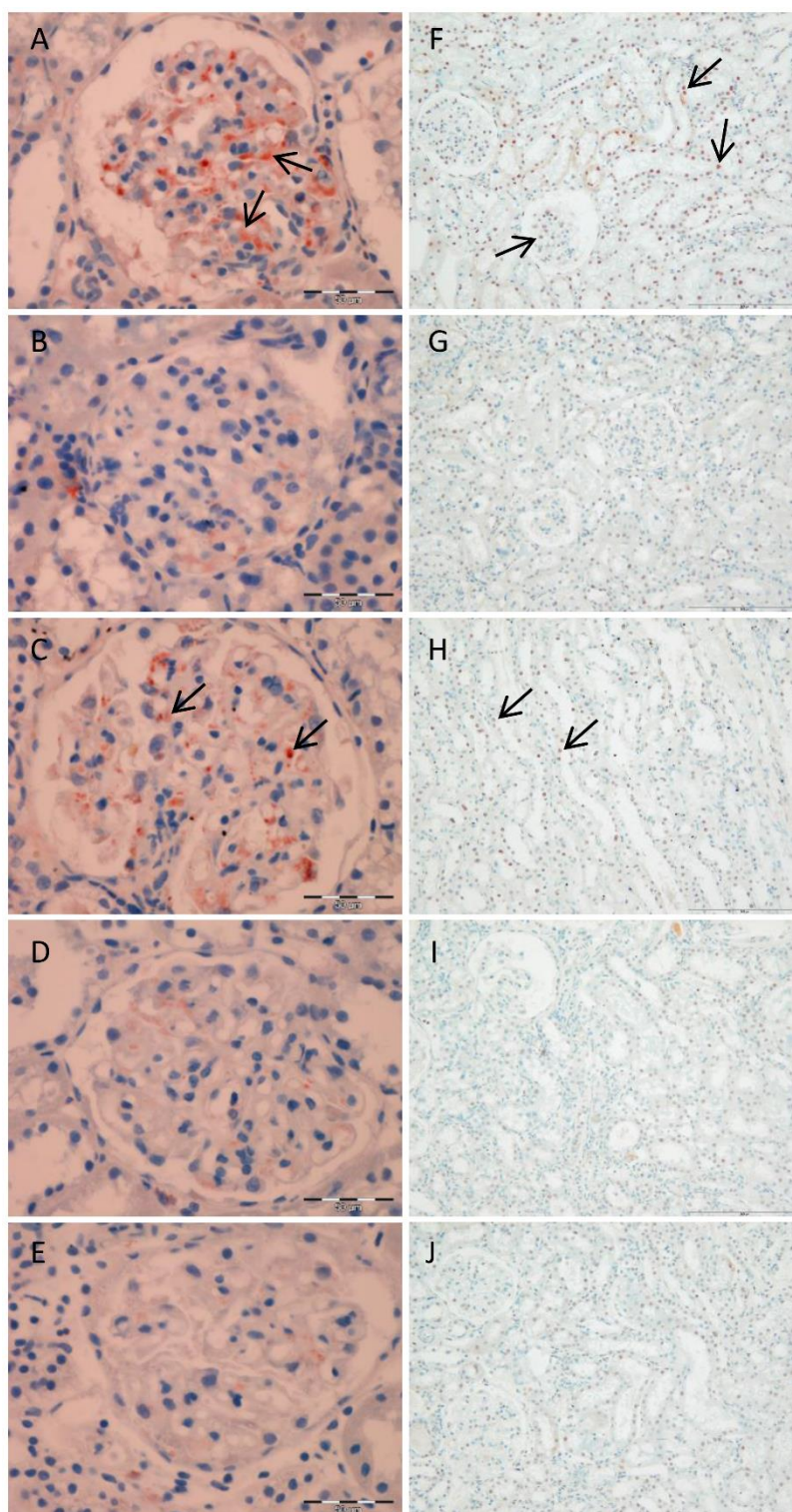


Slika 4-20. Nivo ekspresije proteina Nox2 i Nox4 u homogenatu bubrega. Prikaz reprezentativnih imunoblotova za Nox2 i aktin; odnos ekspresije proteina Nox2 i aktina (aktin primenjen kao kontrola za približno istu količinu proteina u uzorcima) (A) i nivo ekspresije Nox4 proteina (ELISA metoda) (B). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM (n = 6-7). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; ### $p < 0,001$ vs. SHADR; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. SHADR+L. SHC – kontrolna grupa, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol

4.6.5.2. Imunohistohemijska detekcija Nox2 i Nox4 u tkivu bubrega

Imunohistohemijska detekcija proteina Nox2 i Nox4 u tkivu bubrega prikazana je na **Slici 4-21**. U bubrezima pacova kontrolne grupe bojenje na Nox2 jasno je uočeno u svim mezangijalnim ćelijama glomerula (**Slika 4-21. A**). U bubrezima pacova SHADR grupe prisutno je samo slabo, fokalno bojenje (**Slika 4-21. B**). Kod pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L) intenzitet i lokalizacija bojenja na Nox2 unutar glomerula slični su onim detektovanim kod kontrolnih životinja (**Slika 4-21. C**). Smanjena i vrlo slaba ekspresija Nox2 proteina u mezangijalnim ćelijama detektovana je u bubrezima pacova koji su dobijali tempol (SHADR+T) (**Slika 4-21. D**). Nakon kombinovanog tretmana uočeno je skoro potpuno odsustvo Nox2 bojenja u mezangijalnim ćelijama glomerula (**Slika 4-21. E**).

U bubrezima kontrolne grupe uočeno je intenzivno bojenje na Nox4 u jedrima tubulocita, dok je u glomerulima Nox4 bojenje bilo manje izraženo (**Slika 4-21. F**). U bubrezima pacova SHADR grupe mali broj jedara u ćelijama tubula je pozitivan na Nox4 (**Slika 4-21. G**). Kod pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L) prisutno je jasno bojenje na Nox4 u tubulocitima (**Slika 4-21. H**). S druge strane, u bubrezima pacova koji su dobijali tempol (SHADR+T) (**Slika 4-21. I**) ili kombinovani tretman (SHADR+T+L) (**Slika 4-21. J**) detektovano je slabo bojenje na Nox4 u manjem broju tubulocita.



Slika 4-21. Imunohistohemijska detekcija Nox2 (A-E) i Nox4 (F-J) proteina u tkivu bubrega. Jasno Nox2 bojenje (strelice) u mezangijalnim ćelijama glomerula (A) i intenzivno Nox4 bojenje

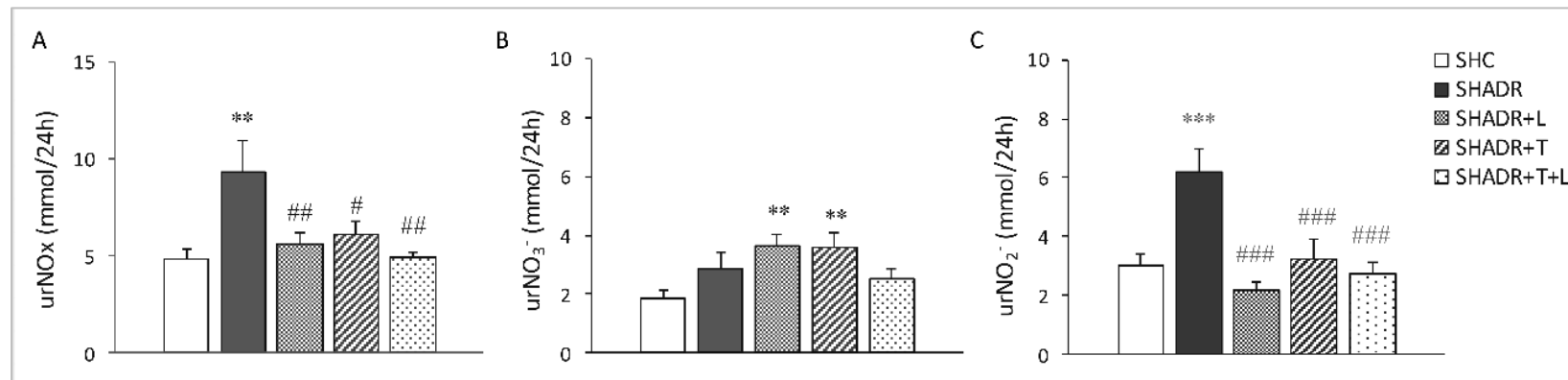
(strelice) u jedrima tubulocita, uz manje izraženo Nox4 bojenje u glomerulima (**F**) pacova kontrolne grupe (SHC). Slabo i fokalno Nox2 bojenje u glomerulima (**B**) i manji broj jedara tubulocita sa pozitivnim Nox4 bojenjem (**G**) u bubrezima pacova SHADR grupe. U glomerulima intenzitet i distribucija bojenje na Nox2 (strelice) slični pacovima kontrolne grupe (**C**) i jasno bojenje na Nox4 (strelice) u tubulocitima (**H**) bubrega pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L). Nekoliko ćelija u glomerulu pozitivno obojene na Nox2 (**D**) i slabo bojenje Nox4 u tubulocitima (**I**) bubrega pacova koji su dobijali tempol (SHADR+T). Slabo Nox2 bojenje u glomerulu (**E**) i manji broj slabo obojenih jedara na Nox4 u tubulima (**J**) pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L). SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol. Uveličanje x40 (A-E), razmera 50 µm; uveličanje x20 (F-J), razmera 200 µm.

4.7. Metaboliti NO-a i ekspresija izoformi NOS

U homogenatima bubrega pacova svih eksperimentalnih grupa određivan je nivo ekspresije sve tri izoforme NOS. Takođe, lokalizovane su ekspresije tri izoformi NOS u tkiva bubrega. Kao indirektni pokazatelj aktivnosti NOS, određivana je koncentracija metabolita NO (nitrita i nitrata) u homogenatima bubrega. Osim toga, određivana je i ukupna produkcija nitrita i nitrata kod pacova merenjen ekskrecije metabolita NO urinom.

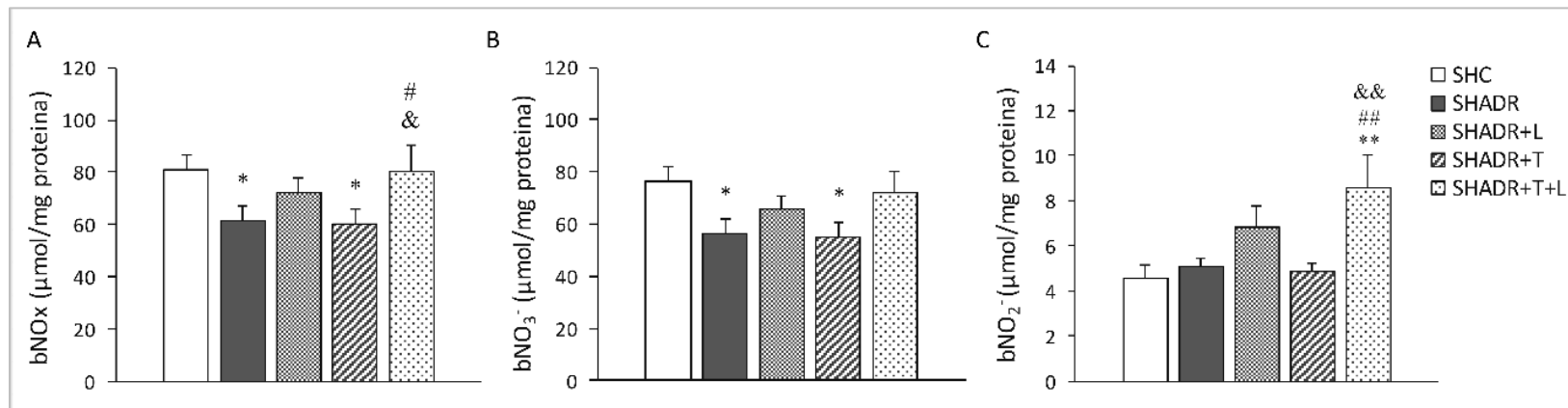
4.7.1. Ekskrecija NO metabolita urinom i nivo NO metabolita u homogenatu bubrega

Ekskrecija NO_3^- i NO_2^- urinom, kao i vrednosti NO_x (ukupni metaboliti NO) predstavljene su na **Slici 4-22**. Kod SH pacova koji su primili ADR došlo je do značajnog povećanja ekskrecije ukupnih NO metabolita i nitrita ($p < 0,01$, $p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnim životinjama. Svi ispitivani tretmani značajno su smanjili ekskreciju NO_x i nitrita urinom do nivoa izmerenih kod kontrolnih životinja. Ekskrecije nitrata značajno se povećala kod pacova koji su dobijali losartan ili tempol ($p < 0,01$) u poređenju sa životinjama kontrolne grupe.



Slika 4-22. Ekskrecija metabolita NO urinom: ekskrecija ukupnih NO metabolita (urNO_x) (A), ekskrecija nitrata (urNO₃⁻) (B) i ekskrecija nitrita (urNO₂⁻) (C). Predstavljene su srednje vrednosti ± SEM (n = 7-8). ** *p* < 0,01, *** *p* < 0,001 vs. SHC; # *p* < 0,05, ## *p* < 0,01, ### *p* < 0,001 vs. SHADR. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

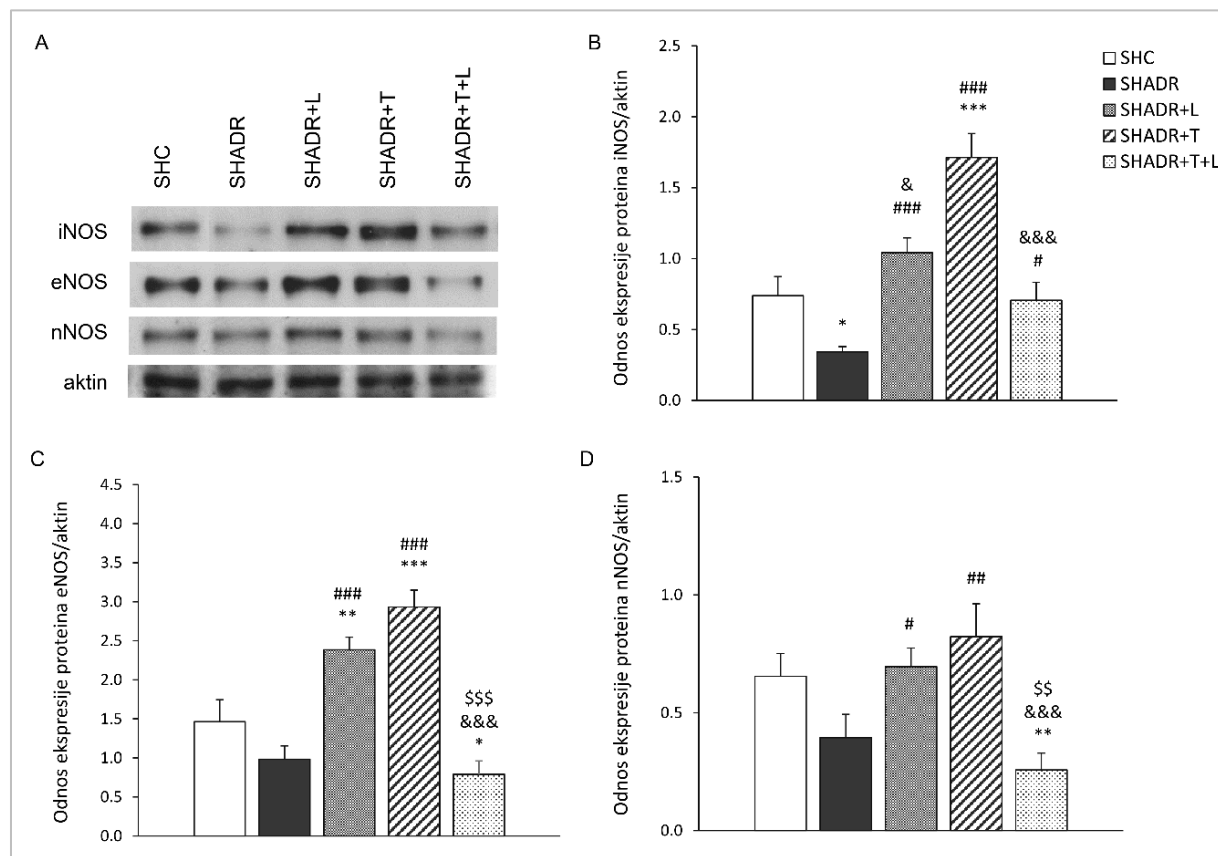
Nivoi NO_3^- i NO_2^- , kao i NO_x u homogenatu bubrega prikazani su na **Slici 4-23**. U poređenju sa kontrolnim životinjama uočen je statistički značajan pad u koncentraciji nitrata i ukupnih NO metabolita ($p < 0,05$) u homogenatu bubrega pacova SHADR grupe i pacova koji su dobijali tempol (SHADR+T). Losartan primenjen sam ili u kombinaciji sa tempolom, povećao je koncentraciju nitrata i ukupnih metabolita NO u homogenatu bubrega do nivoa kontrolnih životinja. Nivo nitrita bio je značajno povećan ($p < 0,01$) samo kod pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L) u poređenju sa koncentracijom nitrita u homogenatu bubrega pacova kontrolne, SHADR i SHADR+T grupe.



Slika 4-23. Nivo metabolita NO u homogenatu bubrega: koncentracija ukupnih NO metabolita (bNO_x) (A), koncentracija nitrata (bNO₃⁻) (B) i koncentracija nitrita (bNO₂⁻) (C). Predstavljene su srednje vrednosti ± SEM (n = 8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. SHADR; & $p < 0,05$, && $p < 0,01$ vs. SHADR+T. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

4.7.2. Ekspresije tri izoforme NOS proteina u homogenatu bubrega

Ekspresije proteina iNOS, eNOS i nNOS u homogenatu bubrega prikazane su na **Slici 4-24**. U poređenju sa kontrolnim životinjama, u homogenatu bubrega SH pacova koji su primili ADR došlo je do statistički značajnog smanjenja iNOS ($p < 0,05$), dok su ekspresije proteina nNOS i eNOS bile izrazito, ali ne i statistički značajno smanjene. Tretmani losartanom i tempolom značajno su povećali ekspresiju sve tri izoforme NOS u poređenju sa vrednostima izmerenim kod pacova SHADR grupe. Takođe, ekspresija iNOS u homogenatu bubrega pacova koji su dobijali tempol bila je značajno povećana i u poređenju sa ostalim eksperimentalnim grupama. S druge strane, kombinovani tretman značajno je smanjio ekspresije konstitutivnih izoformi NOS (eNOS, nNOS) u poređenju sa vrednostima izmerenim kod kontrolnih životinja i pacova tretiranih pojedinačnim tretmanima, do nivoa koji je bio sličan kao kod pacova SHADR grupe. Takođe, kombinovani tretman doveo je do značajnog povećanja ekspresije iNOS ($p < 0,05$) u homogenatu bubrega pacova SHADR+T+L grupe u poređenju sa pacovima SHADR grupe.



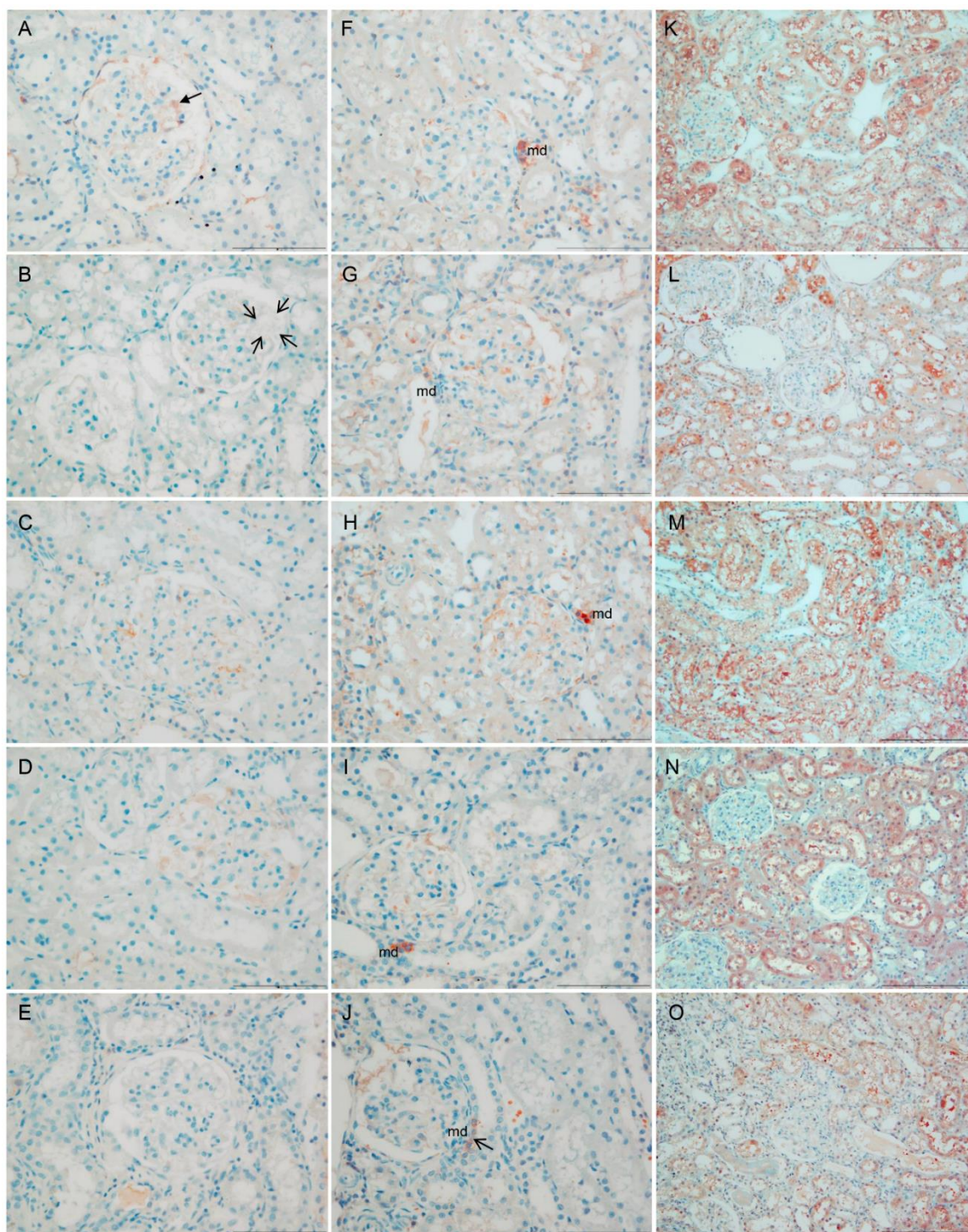
Slika 4-24. Ekspresije izoformi NO sintaze (NOS) u homogenatu bubrega: prikaz reprezentativnih imunoblotova za iNOS, eNOS, nNOS i aktin (A), odnos ekspresije ispitivanih proteina i aktina (aktin primenjen kao kontrola za približno istu količinu proteina u uzorcima): inducibilna NOS (iNOS) (B), endotelna NOS (eNOS) (C) i neuronalna NOS (nNOS) (D). Predstavljene su srednje vrednosti \pm SEM (n = 6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. SHC; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. SHADR; \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ vs. SHADR+L; & $p < 0,05$, &&& $p < 0,001$ vs. SHADR+T. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol.

4.7.3. Imunohistohemijska detekcija tri izoforme NOS-a u tkivu bubrega

Imunohistohemijska detekcija ekspresije eNOS proteina u ćelijama glomerula kod pacova svih eksperimentalnih grupa prikazana je na **Slici 4-25. (A-E)**. Endotelne ćelije glomerula kontrolnih SH pacova se boje pozitivno na eNOS (**Slika 4-25. A**). Kod SH pacova koji su primili ADR znatno je slabije eNOS bojenje, dok je ono jedva uočljivo na mestima izražene ekspanzije mezangijuma u glomerulima sa umerenim lezijama i sklerotičnim glomerulima (**Slika 4-25. B**). U bubrezima pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L) prisutna je znatno veća ekspresija eNOS u glomerulima (**Slika 4-25. C**), a slično je uočeno i nakon tretmana tempolom (SHADR+T) (**Slika 4-25. D**). S druge strane, kombinovani tretman je u glomerulima smanjio ekspresiju eNOS ili je ona bila skoro potpuno odsutna (SHADR+T+L) (**Slika 4-25. E**).

Kod kontrolnih pacova pozitivno bojenje za nNOS je jasno izraženo u zoni *macula dense* (**Slika 4-25. F**), dok je znatno slabije bojenje detektovano kod SH pacova koji su primili ADR (**Slika 4-25. G**). Tretmani losartanom (**Slika 4-25. H**) i tempolom (**Slika 4-25. I**) znatno su povećali ekspresiju nNOS u zoni *macula dense*, dok je nakon kombinovanog tretmana u ovoj zoni pozitivno bojenje za nNOS jasno smanjeno (**Slika 4-25. J**).

Pozitivno iNOS bojenje detektovano je u tubulima bubrega svih eksperimentalnih grupa (**Slika 4-25. K-O**). Kod kontrolnih pacova iNOS bojenje je uočeno u proksimalnim i distalnim tubulima i u sabirnim kanalićima (**Slika 4-25. K**). U bubrezima pacova SHADR grupe iNOS bojenje je slabije u tubulocitima (**Slika 4-25. L**). Za razliku od kombinovanog tretmana (**Slika 4-25. O**), pojedinačni tretmani losartanom (**Slika 4-25. M**) i tempolom (**Slika 4-25. N**) doveli su do povećane ekspresije iNOS u tubulocitima.



Slika 4-25. Imunohistohemijska detekcija ekspresije eNOS, nNOS i iNOS proteina u tkivu bubrega. eNOS (A-E): (A) Pozitivno eNOS bojenje u endotelnim ćelijama glomerula (strelica) kontrolnih pacova; (B) Slabiji intenzitet eNOS bojenja u glomerulu zahvaćenim sklerozom (levo); u

glomerulu gore-desno zapaža se nedostatak pozitivnog bojenja na mestu gde je prisutna ekspanzija mezangijuma (deo okružen strelicama) kod pacova SHADR grupe; **(C)** Intenzivnije/jasno povećano eNOS bojenje u glomerulu pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L); **(D)** Ekspresija eNOS u glomerulu pacova tretiranih tempolom slična kao kod pacova SHADR+L grupe; **(E)** Smanjena i skoro potpuno odsutna ekspresija eNOS u glomerulu pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L). **nNOS (F-J):** **(F)** Snažna ekspresija nNOS u zoni *macula dense* (md) kontrolnih pacova; **(G)** Samo pojedine ćelije zone *macula dense* su pozitivne na nNOS kod pacova SHADR grupe; U bubrezima pacova koji su dobijali losartan **(H)** ili tempol **(I)** zapaža se izrazito pozitivno nNOS bojenje, dok je kombinovani tretman jasno smanjio ekspresija nNOS u zoni *macula dense* **(J)**. **iNOS (K-O):** **(K)** Pozitivno iNOS bojenje u svim tubulima kontrolnih pacova; **(L)** Znatno smanjeno iNOS bojenje u oštećenim tubulima pacova SHADR grupe; **(M)** Snažno iNOS bojenje u proksimalnim i distalnim tubulima, kao i sabirnim kanalićima pacova koji su dobijali losartan (SHADR+L); **(N)** Sličan obrazac ekspresije iNOS u bubrezima pacova koji su dobijali tempol kao kod pacova SHADR+L grupe; **(O)** Snižena ekspresija iNOS na mestima umerenih oštećenja tubula pacova koji su dobijali kombinovani tretman (SHADR+T+L). NOS – azot-monoksid sintaza, e – endotelna, n – neuronska, i – inducibilna. SHC – kontrolna grupa pacova, SHADR – SH pacovi tretirani adrijamicinom, L – losartan, T – tempol. Uveličanje x40 (A-J), razmera 100 μm; uveličanje x20 (K-O), razmera 200 μm.

4.8. Korelacije ispitivanih parametara

Međusobna povezanost ispitivanih parametara analizirana je pomoću Pearson-ove linearne korelacije, a dobijeni rezultati su prikazani u **Tabeli 4-2.** i **Tabeli 4-3.** Poređenjem parametara oksidativnog stresa i bubrežne funkcije, dobijeni rezultati su pokazali da je značajna pozitivna korelacija uočena između odnosa koncentracije proteina i kreatinina u urinu ($U_{p/cr}$) i brzine oslobađanja TBARS-a u plazmi ($r = 0,4377$, $p = 0,037$), kao i sadržaja karbonilovanih proteina u homogenatu bubrega ($r = 0,6131$, $p = 0,002$) (**Tabela 4-2.**). Takođe, nivoi strukturnih promena u glomerulima i tubulima (sklerotične promene u glomerulima i indeks oštećenja tubula) bili su u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa vrednošću $U_{p/cr}$. Osim toga, indeks oštećenja tubula je bio u pozitivnoj korelaciji sa sklerotičnim promenama glomerula ($r = 0,6269$, $p = 0,001$), a ovi parametri morfoloških promena bubrega bili su u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa vrednostima koncentracije kreatinina u plazmi (P_{cr}), kao i sa ekskrecijom albumina (Alb_{exc}) i proteina (P_{exc}) urinom (**Tabela 4-2.**). Nivo matriksne metaloproteinaze-1 (MMP-1) u homogenatu bubrega bio je u pozitivnoj korelaciji sa $U_{p/cr}$ ($r = 0,4740$, $p = 0,022$), brzinom oslobađanja TBARS-a u plazmi ($r = 0,4947$, $p = 0,016$), kao i sa nivoom karbonilovanih proteina u bubrezima ($r = 0,5284$, $p = 0,010$) (**Tabela 4-2.**). Poređenjem aktivnosti enzima antioksidativnog sistema, dobijeni rezultati su pokazali da je aktivnost SOD bila u pozitivnoj korelaciji sa CAT i GP_x , kako u eritrocitima, tako i u bubrezima (**Tabela 4-3.**). Takođe, uočena je pozitivna korelacija između aktivnosti GR i drugih antioksidativnih enzima SOD, CAT i GP_x u eritrocitima (**Tabela 4-3.**).

Tabela 4-2. Korelacije parametara oksidativnog statusa i strukture i funkcije bubrega eksperimentalnih životinja (n = 23).

	P _{cr} (μ mol/l)	U _{p/cr} (mg/mg)	P _{exc} (mg/min/kg)	Alb _{exc} (mg/min/kg)	pTBARS (nmol/min/kg)	PCOs (nmol/mg proteina)	MMP-1 (ng/ml)	Sklerotične promene u glomerulima	Indeks oštećenja tubula
P _{cr} (μ mol/l)		r=0,3448 p=0,107	r=0,3123 p=0,147	r=0,3273 p=0,127	r=0,1332 p=0,544	r=0,0099 p=0,964	r=-0,0853 p=0,699	r=0,5124 p=0,012	r=0,5118 p=0,013
U _{p/cr} (mg/mg)	r=0,3448 p=0,107		r=0,8866 p=0,000	r=0,3534 p=0,098	r=0,4377 p=0,037	r=0,6131 p=0,002	r=0,4740 p=0,022	r=0,5190 p=0,011	r=0,5369 p=0,008
P _{exc} (mg/min/kg)	r=0,3123 p=0,147	r=0,8866 p=0,000		r=0,3679 p=0,084	r=0,4244 p=0,044	r=0,4920 p=0,017	r=0,2810 p=0,194	r=0,4319 p=0,040	r=0,4571 p=0,028
Alb _{exc} (mg/min/kg)	r=0,3273 p=0,127	r=0,3534 p=0,098	r=0,3679 p=0,084		r=0,1463 p=0,505	r=0,2288 p=0,294	r=0,3371 p=0,116	r=0,5275 p=0,010	r=0,5904 p=0,003
pTBARS (nmol/min/kg)	r=0,1332 p=0,544	r=0,4377 p=0,037	r=0,4244 p=0,044	r=0,1463 p=0,505		r=0,4027 p=0,057	r=0,4947 p=0,016	r=0,2329 p=0,285	r=0,0888 p=0,687
PCOs (nmol/mg proteina)	r=0,0099 p=0,964	r=0,6131 p=0,002	r=0,4920 p=0,017	r=0,2288 p=0,294	r=0,4027 p=0,057		r=0,5284 p=0,010	r=0,3855 p=0,069	r=0,2296 p=0,292
MMP-1 (ng/ml)	r=-0,0853 p=0,699	r=0,4740 p=0,022	r=0,2810 p=0,194	r=0,3371 p=0,116	r=0,4947 p=0,016	r=0,5284 p=0,010		r=0,3356 p=0,117	r=0,1614 p=0,462
Sklerotične promene u glomerulima	r=0,5124 p=0,012	r=0,5190 p=0,011	r=0,4319 p=0,040	r=0,5275 p=0,010	r=0,2329 p=0,285	r=0,3855 p=0,069	r=0,3356 p=0,117		r=0,6269 p=0,001
Indeks oštećenja tubula	r=0,5118 p=0,013	r=0,5369 p=0,008	r=0,4571 p=0,028	r=0,5904 p=0,003	r=0,0888 p=0,687	r=0,2296 p=0,292	r=0,1614 p=0,462	r=0,6269 p=0,001	

P_{cr} – koncentracija kreatinina u plazmi, U_{p/cr} – odnos koncentracije proteina/kreatinina u urinu, P_{exc} – ekskrecija proteina urinom, Alb_{exc} – ekskrecija albumina urinom, pTBARS – brzina oslobađanja TBARS-a u plazmi, PCOs – sadržaj karbonilovanih proteina u homogenatu bubrega, MMP-1 – nivo matriks metaloproteinaze-1 u homogenatu bubrega. Korelacije su smatrane značajnim kada je $p < 0,05$; N = 23.

Tabela 4-3. Korelacije između aktivnosti SOD, CAT, GP_x i GR u eritrocitima i bubrezima eksperimentalnih životinja (n = 39).

	erSOD (U/g Hb)	erCAT (U/g Hb)	erGP _x (U/g Hb)	erGR (U/g Hb)	bSOD (U/mg proteina)	bCAT (U/mg proteina)	bGP _x (U/mg proteina)
erSOD (U/g Hb)		r=0,8146 p=0,000	r=0,4406 p=0,005	r=0,4745 p=0,002	r=-0,0749 <i>p=0,650</i>	r=-0,0243 <i>p=0,883</i>	r=0,0772 <i>p=0,640</i>
erCAT (U/g Hb)	r=0,8146 p=0,000		r=0,2047 <i>p=0,211</i>	r=0,4744 p=0,002	r=-0,1861 <i>p=0,257</i>	r=-0,1562 <i>p=0,342</i>	r=-0,0017 <i>p=0,992</i>
erGP _x (U/g Hb)	r=0,4406 p=0,005	r=0,2047 <i>p=0,211</i>		r=0,3860 p=0,015	r=-0,1396 <i>p=0,397</i>	r=0,2457 <i>p=0,132</i>	r=0,0220 <i>p=0,894</i>
erGR (U/g Hb)	r=0,4745 p=0,002	r=0,4744 p=0,002	r=0,3860 p=0,015		r=-0,1371 <i>p=0,405</i>	r=0,0556 <i>p=0,737</i>	r=0,0495 <i>p=0,765</i>
bSOD (U/mg proteina)	r=-0,0749 <i>p=0,650</i>	r=-0,1861 <i>p=0,257</i>	r=-0,1396 <i>p=0,397</i>	r=-0,1371 <i>p=0,405</i>		r=0,6222 p=0,000	r=0,7892 p=0,000
bCAT (U/mg proteina)	r=-0,0243 <i>p=0,883</i>	r=-0,1562 <i>p=0,342</i>	r=0,2457 <i>p=0,132</i>	r=0,0556 <i>p=0,737</i>	r=0,6222 p=0,000		r=0,6037 p=0,000
bGP _x (U/mg proteina)	r=0,0772 <i>p=0,640</i>	r=-0,0017 <i>p=0,992</i>	r=0,0220 <i>p=0,894</i>	r=0,0495 <i>p=0,765</i>	r=0,7892 p=0,000	r=0,6037 p=0,000	

SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, GP_x – glutation peroksidaza, GR – glutation reduktaza, er – eritrociti, b – bubreg. Korelacije su smatrane značajnim kada je $p < 0,05$; N = 39.

4.9. Sumarni prikaz dobijenih rezultata

U adrijamicinskoj nefropatiji kod spontano hipertenzivnih pacova dolazi do:

- povećanja koncentracije kreatinina u plazmi, nastanka hipoalbuminemije i hiperlipidemije;
- razvoja masivne proteinurije i albuminurije i povećanja diureze;
- fokalne skleroze glomerula, atrofije i dilatacije tubula (prisutan PAS pozitivni sadržaj), periglomerularne i peritubularne infiltracije mononuklearnim leukocitima i razvoja intersticijske fibroze;
- povećanja ekspresije nestina i vimentina u podocitima, a vimentin je povećan u mezangijalnim ćelijama glomerula, parijetalnim epitelnim ćelijama Boumanove kapsule, dok je u tubulointersticijumu detektovana *de novo* ekspresije vimentina u oštećenim tubulocitima proksimalnih tubula, okolnim fibroblastima i miofibroblastima;
- povećanja ekspresije MMP-1 u bubrezima;
- povećanja lipidne peroksidacije plazme;
- povećanja PCOs i smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i GP_x u bubrezima;
- smanjenja ekspresija Nox2 i Nox4 u bubrezima;
- povećanja ekskrecije ukupnih metabolita NO (NO_x) urinom;
- smanjenja ekspresije iNOS, uz izrazito, ali statistički neznačajno smanjenje ekspresije konstitutivnih izoformi NOS, praćeno smanjenom koncentracijom NO_x u bubrezima;
- smanjenja vaskularnog otpora u karotidnoj arteriji, bez promena u vrednostima krvnog pritiska.

Hronični tretman losartanom (blokator AT1R) doveo je do:

- normalizacije koncentracije albumina u plazmi, smanjenja koncentracije kreatinina, ukupnog holesterola, triglicerida i LDL holesterola;
- smanjenja proteinurije, albuminurije i diureze;
- smanjenja ukupnih histopatoloških promena, sa izraženijim povoljnim efektom na strukturu tubula i inflamaciju tubulointercijuma;
- smanjenja ekspresije nestina i vimentina u bubrežnim telašcima, izostanka *de novo* ekspresije vimentina u tubulointercijumu;
- smanjenja ekspresije MMP-1 u bubrežima;
- smanjenja lipidne peroksidacije plazme i povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i GP_x u eritrocitima i antioksidativnog kapaciteta plazme
- smanjenja PCOs, normalizovanja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i GP_x i povećanja aktivnosti GR u bubrežima i povećanja antioksidativnog kapaciteta bubrega;
- normalizacije ekspresije Nox2 i blagog, ali statistički neznačajnog povećanja ekspresije Nox4 u bubrežima;
- normalizacija ekskrecije NO_x urinom;
- povećanja ekspresije svih izoformi NOS i koncentracije NO_x u bubrežima;
- sniženja sistolnog i srednjeg krvnog pritiska, povećanja protoka krvi i smanjenja vaskularnog otpora u bubrežnoj arteriji.

Hronični tretman tempolom (antioksidans, stabilni nitroksid radikal) doveo je do:

- povećanja vrednosti HDL holesterola;
- snažnog smanjenja proteinurije i albuminurije;
- smanjenja ukupnih histopatoloških promena, sa izraženijim povoljnim efektom na strukturu glomerula i periglomerularnu inflamaciju;
- smanjenja ekspresije nestina i vimentina u bubrežnim telašcima, izostanka *de novo* ekspresije vimentina u tubulointercijumu;
- snažnog smanjenja ekspresije MMP-1 u bubrežima;

- smanjenja lipidne peroksidacije plazme, povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, GP_x i GR u eritrocitima i antioksidativnog kapaciteta plazme;
- smanjenja PCOs u bubrezima i povećanja antioksidativnog kapaciteta bubrega;
- normalizacija ekskrecije NO_x urinom;
- povećanja ekspresije svih izoformi NOS u bubrezima;
- povećanja frekvence srčanih kontrakcija i smanjenja minutnog volumena, bez promene krvnog pritiska.

Hronični kombinovani tretman doveo je do:

- smanjenja proteinurije do nivoa kao kod pacova tretiranih losartanom i povećanja albuminurije u odnosu na nivo nakon tretmana tempolom;
- sniženja klirensa kreatinina i uree;
- smanjenja ekspresije nestina i vimentina u bubrežnim telašcima, uz prisutnu ekspresiju vimentina u tubulocitima proksimalnih tubula zahvaćenim oštećenjem i okolnim fibroblastima i miofibroblastima intersticijuma;
- smanjenja ekspresije MMP-1 u bubrezima;
- povećanja antioksidativnog kapaciteta plazme i bubrega;
- smanjenja lipidne peroksidacije plazme, povećanja antioksidativnog kapaciteta plazme i aktivnosti GP_x u eritrocitima, dok su aktivnosti SOD i CAT smanjene u odnosu na vrednosti izmerene nakon pojedinačnih tretmana losartanom i tempolom;
- smanjenja PCOs, povećanja aktivnosti SOD i GR i antioksidativnog kapaciteta bubrega;
- normalizaciju ekskrecije NO_x urinom;
- povećanja ekspresija iNOS, uz smanjene ekspresije eNOS i nNOS u bubrezima, praćeno povećanom koncentracijom metabolita NO u bubrezima;
- povećanja protoka krvi i smanjenja vaskularnog otpora u karotidnoj arteriji, bez uticajaj na krvni pritisak.

5. DISKUSIJA

U brojnim dosadašnjim istraživanjima ispitivana je uloga renin angiotenzin sistema u patogenezi i progresiji FSGS, ali je uloga oksidativnog stresa u ovim procesima ostala nedovoljno razjašnjena. Kako je oksidativni stres prisutan u hroničnoj bubrežnoj slabosti i doprinosi napredovanju bolesti, istraživanja u okviru ove disertacije su bila usmerena ka ispitivanju povezanosti RAS i oksidativnog stresa u patogenezi i progresiji FSGS, koja je kod SH pacova izazvana adrijamicinom. S tim u vezi ispitivan je efekat losartana (blokator AT1R), tempola (stabilni nitroksid radikal - SOD mimetik, sakupljač slobodnih radikala), kao i njihov kombinovani tretman na progresiju FSGS izazvane adrijamicinom kod SH pacova.

Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima pokazali su da aplikacija ADR dovodi do značajnog povećanja kreatinina u plazmi i razvoja hiperlipidemije, hipoalbuminemije, proteinurije i albuminurije, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (Manabe i sar., 2000, Malarkodi i sar., 2003, El-Shitany i sar., 2008, Yang i sar., 2012, Chen i sar., 2012). Međutim, ADR nije uticao na promenu koncentracije uree u plazmi SH pacova, što je pokazano i u ranijim istraživanjima drugih autora (Chen i sar., 2012, Yang i sar., 2012), koji su primenili dva puta veću dozu ADR kod Sprague-Dawley pacova. Rezultati prethodnih istraživanja izvedenih u okviru naše grupe (Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009) pokazali su da do značajnog povećanja koncentracija uree u plazmi dolazi tek nakon 12 nedelja od aplikacije ADR kod SH pacova. Takođe, rezultati ove disertacije su pokazali da se u plazmi ni koncentracija ukupnih proteina nije menjala nakon aplikacije ADR. Yang i saradnici (2012) su pokazali da do značajnog smanjenja ukupnih proteina u cirkulaciji dolazi nakon 14 nedelja od aplikacije adrijamicina (4 mg/kg). S druge strane, kada je ADR primenjen u visokoj kumulativnoj dozi (20 mg/kg) kod *Wistar* pacova uočen je značajan pad koncentracije albumina u plazmi, praćen značajnim sniženjem ukupnih proteina, kao i porast koncentracije kreatinina i uree u cirkulaciji (Rashikh i sar.,

2012). Može se pretpostaviti da su zabeležene razlike u vrednostima ovih biohemijskih parametara posledica različitih doza ADR, dužine trajanja eksperimenta, kao i soja ispitivanih eksperimentalnih životinja.

Literaturni podaci ukazuju da hiperlipidemija i proteinurija predstavljaju nezavisne faktore rizika koji mogu da dovedu do progresije FSGS (Remuzzi i sar., 2005, Abrantes i sar., 2006, Ruan i sar., 2009). Hronična blokada AT1R losartanom dovela je do poboljšanja lipidnog statusa kako u ovde prikazanim, tako i u istraživanjima drugih autora (Chen i sar., 2012). Takođe, koncentracija kreatinina u plazmi i hipoalbuminemija normalizovane su nakon tretmana losartanom, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Rashikh i sar., 2012, Chen i sar., 2012). Prethodna istraživanja izvedena na SH pacovima sa ADR nefropatijom u okviru naše grupe (Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009) pokazala su da je tretman losartanom značajno sprečio gubitak proteina urinom, ali je proteinurija ostala na značajno višem nivou u poređenju sa kontrolnim životinjama. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji potvrdili su da je losartan poboljšao bubrežnu funkciju jer je došlo do značajnog smanjenja albuminurije i proteinurije, bez obzira što su vrednosti ovih parametara značajno više u poređenju sa vrednostima kontrolnih životinja. Slična zapažanja publikovali su Munoz i saradnici (2011), koji su pokazali da aplikacijom veće doze ADR (6 mg/kg) kod Sprague-Dauley pacova dolazi do razvoja proteinurije, koja je nakon tretmana losartanom (15 mg/kg/dan) značajno snižena, ali takođe nije u potpunosti sprečen gubitak proteina urinom.

Ispitivanjem protektivnih svojstava hroničnog tretmana tempolom, dobijeni rezultati su pokazali da u cirkulaciji dolazi do značajnog povećanja koncentracije HDL holesterola, bez promene vrednosti ukupnog holesterola, triglicerida i LDL holesterola. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima El-Shitany i saradnika (2008), koji su pratili uticaj različitih flavonoida na lipidni status pacova nakon aplikacije visoke doze ADR (10 mg/kg). Do sličnih rezultata došli su i Ebenezer i saradnici (2009), koji su u modelu dijabetesne nefropatije udružene sa metaboličkim sindromom pokazali da desetonedeljni tretman tempolom značajno povećava koncentraciju HDL holesterola i smanjuje vrednosti ukupnog holesterola i triglicerida u plazmi, značajno smanjuje albuminuriju i poboljšava strukturu glomerula u ranoj fazi ove nefropatije. Publikovani rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u okviru ovih istraživanja, gde je pokazano da hronični tretman tempolom značajno snižava albuminuriju i proteinuriju do nivoa koji

nisu značajno različiti od kontrole. Može se pretpostaviti da je tempol u glomerulima ostvario svoj protektivni efekat, gde je mogao da doprinese ponovnom uspostavljanju selektivne propustljivosti filtracione membrane i usporavanju daljeg gubitka proteina urinom.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazuju da u plazmi SH pacova sa ADR nefropatijom nisu značajno promenjene vrednosti koncentracije kreatinina, albumina, triglicerida, LDL holesterola i ukupnog holesterola, kako nakon primene pojedinačnog tretmana tempolom, tako i nakon tretmana tempolom u kombinaciji sa losartanom. Koncentracija HDL holesterola bila je blago, ali ne i statistički značajno povećana, dok su vrednosti albuminurije, proteinurije i $U_{p/cr}$ bile slične vrednostima zabeleženim nakon tretmana losartanom. Prikazani rezultati pokazuju da tretman tempolom u uslovima hronične blokade AT1R losartanom nije uticao na dodatno smanjenje gubitka proteina urinom u ovom eksperimentalnom modelu FSGS.

Brzina glomerulske filtracije praćena je preko klirensa kreatinina i uree (Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009). Dobijeni rezultati su pokazali da kod SH pacova koji su primili ADR nije došlo do poremećaja brzine glomerulske filtracije na kraju šeste nedelje eksperimenta, što je bilo u saglasnosti sa ranije publikovanim rezultatima naše grupe (Jovanovic i sar., 2009, Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009). Takođe, rezultati drugih istraživanja (Remuzzi i sar., 1985) pokazali su da ADR, u sličnoj dozi od 5 mg/kg, kod Sprague-Dawely pacova nije narušio bubrežni protok plazme, kao ni brzinu glomerulske filtracije merene preko klirensa inulina. Aplikovana doza ADR, primenjena u ovom istraživanju, dovela je do značajne proteinurije i albuminurije, ukazujući na narušenu bubrežnu funkciju, što u ovom stadijumu FSGS ne mora nužno da bude praćeno promenjenim vrednostima klirensa kreatinina ili uree. Za razliku od pojedinačnih tretmana losartanom i tempolom, koji nisu uticali na glomerulsku filtraciju, tempol u kombinaciji sa losartanom značajno je smanjio brzinu glomerulske filtracije. Rezultati albuminurije, proteinurije i $U_{p/cr}$ nakon kombinovanog tretmana se nisu dodatno smanjile, već su ostale slične onim izmerenim kod pacova tretiranih losartanom, a još uvek više od onih prisutnih kod pacova tretiranih samo tempolom, što ukazuje da kombinovani tretman nema pozitivan sinergistički efekat.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazali su da je ADR kod SH pacova, pored povećanja diureze, doveo do povećanja indeksa mase bubrega u kojima su detektovana

značajna strukturna oštećenja: fokalne skleroze glomerula, dilatacije i atrofije tubula, intersticijske inflamacije i fibroze, što je u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja naše grupe (Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009). Povoljan efekat losartana na strukturu i funkciju bubrega SH pacova sa ADR nefropatijom (Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009) takođe su potvrdili rezultati dobijeni u ovoj disertaciji. Tretman tempolom uticao je na snažnije smanjenje proteinurije i albuminurije, što je bilo praćeno značajno smanjenim strukturnim oštećenjima bubrega, uz izraženije očuvanje strukture glomerula. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Ebenezer i sar., 2009, Luan i sar., 2012, Ahmed i sar., 2014), koji su pokazali da tempol ispoljava protektivne efekte i u drugim modelima proteinurične nefropatije (dijabetesna nefropatija, dijabetesna nefropatija udružena sa metaboličkim sindromom, cisplatinom izazvana nefropatija). Međutim, tretman tempolom u kombinaciji sa losartanom nije uticao na promenu ukupnog zbira morfoloških promena u bubrezima nastalih usled dejstva ADR.

Literaturni podaci ukazuju da se u podocitima u odgovoru na oštećenja aktiviraju mehanizmi koji dovode do povećane ekspresije nestina i vimentina, sve u cilju postizanja veće mehaničke stabilnosti citoskeletne mreže (Jefferson i sar., 2011). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da šest nedelja nakon aplikacije ADR u bubrezima SH pacova došlo je do povećane ekspresije nestina i vimentina u podocitima. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Zou i saradnika (2006), koji su pokazali da je u podocitima došlo do povećane ekspresije nestina, vimentina i dezmina u ranoj fazi eksperimentalno izazvane FSGS. Takođe, u prikazanom istraživanju u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom detektovano je pozitivno bojenje na vimentin u mezangijalnim ćelijama sklerotičnih glomerula, u parijetalnim epitelnim ćelijama Boumanove kapsule, u oštećenim tubulocitima proksimalnih tubula i okolnim fibroblastima i miofibroblastima intersticijuma. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima publikovanim od strane Van Beneden i saradnika (2008), koji su *Wistar* pacovima aplikovali ADR u istoj dozi kao i u ovom istraživanju. Rezultati istraživanja drugih autora, izvedenih na eksperimentalnom modelu nefropatije izazvane adrijamicinom (Galli i sar., 2001, Shu i sar., 2002) ili ciklosporinom A (Young i sar., 1995, Carlos i sar., 2014), takođe su pokazali prisustvo povećane ekspresije vimentina u oštećenim tubulima i intersticijumu bubrega. Podaci iz literature ukazuju da ekspresija vimentina detektovana u tubulointersticijumu predstavlja adekvatan pokazatelj epitelo-

mezenhimalne transformacije (Lan i sar., 2003), a da je *de novo* ekspresija vimentina u tubulocitima proksimalnih tubula jasan znak oštećenja i transformacije u ovim segmentima bubrega (Young i sar., 1995, Bravo i sar., 2003). Osim toga, rezultati istraživanja Sakairi i saradnika (2007) na pacovima kojima su bubrezi zahvaćeni tubulointersticijskom fibrozom pokazali su da intersticijske ćelije koje se boje pozitivno na nestin predstavljaju miofibroblaste, koje mogu da vode poreklo od lokalno aktiviranih fibroblasta, uočene na mestima zahvaćenim oštećenjem. U ovom istraživanju pojedinačni tretmani losartanom i tempolom smanjili su ekspresije nestina i vimentina u podocitima, a u parijetalnim epitelnim ćelijama Boumanove kapsule i tubulointersticijumu nije bila detektovana ekspresija vimentina, što je bilo u skladu sa poboljšanom funkcijom i značajno smanjenim strukturnim oštećenjima bubrega. U ovom istraživanju po prvi put su prikazani efekti kombinovanog tretmana losartanom i tempolom na ekspresiju nestina i vimentina u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom. Kombinovani tretman je smanjio ekspresiju ispitivanih strukturnih proteina citoskeleta u bubrežnim telašcima, dok je u tubulocitima proksimalnih tubula detektovana ekspresija vimentina, a nestina u nekim intersticijskim ćelijama (miofibroblaste) periglomerulne zone, što ukazuje na prisustvo oštećenja u tim delovima bubrega.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da kod pacova koji su primili ADR pored povećane mase bubrega pacova došlo je do smanjenja telesne mase, što je u saglasnosti sa publikovanim rezultatima (Okuda i sar., 1986, Van den Branden i sar., 2000, Wang i sar., 2016). Rezultati drugih istraživanja na modelu ADR nefropatije (Viswanatha Swamy i sar., 2011, Wang i sar., 2016) takođe su pokazali da primena antioksidansa (vitamin C) ili blokatora AT1R utiče na normalizaciju telesne mase, što je potvrđeno ovim istraživanjem, budući da je telesna masa pacova tretiranih losartanom, tempolom i njihovom kombinacijom bila na istom nivou kao kod kontrolnih životinja.

Eksperimentalne i kliničke studije ukazale su na blisku povezanost oksidativnog stresa sa nastankom i progresijom hronične bubrežne slabosti (Kuo i sar., 2010, Sung i sar., 2013, Chen i sar., 2013, Tan i sar., 2015). Poznato je da ADR prelazi u semikvinon radikal, koji u reakciji sa molekulom kiseonika dovodi do nastanka $\cdot O_2^-$, a prekomerno generisanje ROS uzrokuje oksidativna oštećenja u ćeliji (Yagmurca i sar., 2004, Zima i sar., 1998). Do sada je već pokazano da aplikacija ADR kod SH pacova dovodi do

značajnih strukturnih i funkcijskih oštećenja glomerula i tubula. Takođe, adrijamicin dovodi do značajnog povećanja lipidne peroksidacije plazme, što ukazuje na sistemski oksidativni stres, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja na modelu ADR nefropatije (Yagmurca i sar., 2004, Malarkodi i sar., 2003). Fadilloğlu i saradnici (2003) su takođe pokazali da je ADR povećao nivo TBARS-a (supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom, a predstavljaju sporedne produkte lipidne peroksidacije) u plazmi, ukazujući na povećan sistemski oksidativni stres. Osim toga, ista grupa autora, kao i drugi istraživači (Fadilloğlu i sar., 2003, Milic i sar., 2009, Misiti i sar., 2003), pokazali su da aplikacija ADR nije uticala na promene u aktivnostima antioksidativnih enzima SOD, CAT, GP_x i GR u eritrocitima, što je u skladu sa rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji. Rezultati istraživanja na modelu ADR nefropatije Van den Branden i saradnici (2000) su pokazali da su razlike u pogledu nivoa ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima prisutne nakon aplikacije ADR. U ovom istraživanju u eritrocitima SH pacova takođe je uočena razlika u ekspresiji i aktivnosti antioksidativnog enzima CAT, koja je bila manje eksprimirana i nepromenjene aktivnosti nakon primene ADR.

U ovom eksperimentalnom modelu FSGS hronični tretmani losartanom, tempolom i njihovom kombinacijom doveli su do poboljšanja oksidativnog statusa. Naime, ispitivani tretmani su uticali na povećanje antioksidativnog potencijala plazme i aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u eritrocitima, dovodeći do značajnog smanjenja lipidne peroksidacije plazme. Chuang i saradnici (2012) su takođe pokazali da blokada AT1R kod pacova sa izazvanom nefrektomijom dovodi do značajnog smanjenja sistemskog oksidativnog stresa. U istraživanju na SH pacovima kojima je inhibirana NOS (Yanes i sar., 2004), pokazano je da hronični tretman tempolom značajno poboljšava antioksidativni kapacitet plazme i smanjuje oksidativni stres. Takođe, Elmarakby i saradnici (2007) su u eksperimentalnom modelu hipertenzije pokazali da tretman tempolom, pojedinačno i u kombinaciji sa ACE inhibitorom, smanjuje oksidativni stres u plazmi, kao i produkciju $\cdot\text{O}_2^-$ u aorti. Istraživanja Dobrian i saradnika (2001) izvedena na pacovima sa renalnom hipertenzijom, pokazala su da tempol u kombinaciji sa losartanom značajno sprečava produkciju $\cdot\text{O}_2^-$ u aorti ovih pacova. Stoga, uzimajući u obzir rezultate ovih autora, može se pretpostaviti da je tretman tempolom u

kombinaciji sa hroničnom blokadom AT1R u ovom istraživanju doveo do smanjene aktivnosti SOD i CAT u eritrocitima, verovatno zbog smanjene produkcije $\cdot\text{O}_2^-$.

Publikovani podaci drugih autora (Deman i sar., 2001, Zima i sar., 1998, Quiles i sar., 2002) pokazali su da je ADR u bubrezima doveo do prekomerne produkcije ROS, što je moglo da utiče na slabljenje bubrežne funkcije. U ovom istraživanju ADR je doveo do značajnog povećanja koncentracije karbonilovanih proteina i smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD i GP_x u bubrezima, što je bilo u saglasnosti sa rezultatima prethodnih istraživanja drugih autora na modelu ADR nefropatije (Arozal i sar., 2010, Yagmurca i sar., 2004, Rashikh i sar., 2012). Takođe, drugi autori (Luan i sar., 2012, Fujita i sar., 2012) su pokazali da je narušena bubrežna funkcija praćena smanjenom aktivnošću antioksidativnih enzima u uslovima dijabetesne nefropatije. Aplikovana doza ADR od 4 mg/kg nije uticala na promenu TBARS u bubrezima, što je u saglasnosti sa rezultatima Zima i saradnika (1998), koji su pokazali da ADR u sličnoj dozi od 5 mg/kg nije doveo do promena u vrednosti TBARS u bubrezima. Takođe, kada je primenjena visoka doza ADR (10 mg/kg) kod BALB/c miševima nije detektovana značajna promena u vrednosti TBARS u bubrezima nakon prve nedelje od aplikacije ADR (Tan i sar., 2015). Osim toga, u bubrezima ovih miševa došlo je do značajnog smanjenja ekspresija SOD nakon prve nedelje, koja se nije menjala do kraja eksperimenta (Tan i sar., 2015). Na osnovu svega iznetog može se pretpostaviti da je oslabljena antioksidativna odbrana u bubrezima doprinela opadanju bubrežne funkcije i progresiji strukturnih oštećenja kod SH pacova sa ADR nefropatijom.

Dobijeni rezultati su pokazali da je hronična blokada AT1R losartanom značajno sprečila oksidaciju proteina u bubrezima mehanizmom koji bar delimično uključuje značajno povećane aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, GP_x i GR u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživanja izvedenim na modelu ADR nefropatije, kao i na drugim modelima HBS, kao što su nefrektomija i dijabetesna nefropatija (Rashikh i sar., 2012, Fujita i sar., 2012, Satoh i sar., 2008, Trejo i sar., 2017). Takođe, u ovom istraživanju tretman losartanom uticao je na značajno povećanje antioksidativnog kapaciteta bubrega. Publikovani i rezultati iz ove disertacije ukazuju na to da se protektivna svojstva selektivnih blokatora AT1R mogu bar delimično pripisati njihovim antioksidativnim efektima u bubrezima (Fujita i sar., 2012).

Prethodna istraživanja su pokazala da tempol štiti proteine od oksidativnih oštećenja (Wilcox i sar., 2010). Tempol u reakciji sa ROS može da vrši dismutaciju $\cdot\text{O}_2^-$ u vodonik peroksid, a poseduje i sposobnost direktnog neutralisanja slobodnih radikala (Chatterjee i sar., 2000), kada preuzimanjem elektrona prelazi u redukovani oblik hidroksilamin, koji se u reakciji sa H_2O_2 ili prelaznim metalima konvertuje nazad u nitroksid (Wilcox i sar., 2008, Wilcox i sar., 2010). U ovom istraživanju pokazano je da hronični tretman tempolom značajno sprečava oksidaciju proteina u bubrezima, a pri tome nije uticao na promenu aktivnosti ispitivanih antioksidativnih enzima u bubrezima. Antioksidativne efekte tempola u bubrezima pacova potvrdili su Sainz i saradnici (2005) u modelu hipertenzije izazvane sa L-NAME, neselektivnim inhibitorom NOS. Asaba i saradnici (2007) su pokazali da tempol, zahvaljujući maloj molekulskoj masi i sposobnosti da lako prolazi kroz glomerulobazalnu membranu, značajno sprečava produkciju H_2O_2 u glomerulima pacova sa dijabetesnom nefropatijom.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazali su da je kombinovani tretman uticao na značajno povećanje aktivnosti SOD i istovremeno smanjenje aktivnosti GP_x , što je moglo da dovede do nagomilavanja H_2O_2 u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom. Ranija istraživanja su utvrdila da SOD u reakciji sa H_2O_2 može da produkuje potencijalno štetne hidroksil radikale (Brown 1995, Offer i sar., 2000), koji potom reaguju sa NO dovodeći do njegove inaktivacije i formiranja peroksinitrita, što su potvrdila prethodna istraživanja McBride i saradnici (1999). Isti autori su opisali ovaj alternativni put formiranja peroksinitrita, gde su pokazali da peroksinitriti mogu nastati u reakciji SOD sa H_2O_2 i NO, u slučaju kada su NO i H_2O_2 prisutni u povećanoj koncentraciji. Na osnovu svega iznetog, može se pretpostaviti da je ovo jedan od potencijanih mehanizama patoloških promena koje su detektovane nakon kombinovanog tretmana u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom, kod kojih je takođe izmerena značajno povećana koncentracija nitrita u bubrezima. Literaturni podaci pokazuju da NO može u interakciji sa tiolnim grupama seleno-cisteinskih rezidua u katalitičkom centru GP_x da dovede do inhibicije enzima (Asahi i sar., 1995) i time doprinese povećanju nivoa H_2O_2 , a posledično i povećanoj produkciji peroksinitrita. Dobijeni rezultati su pokazali da je nakon kombinovanog tretmana snižena aktivnost GP_x u bubrezima praćena značajno povećanom aktivnošću GR, ukazujući na aktivaciju adaptivnog odgovora u ćelijama koje

su izložene oksidativnom stresu putem stimulacije kompenzatornog mehanizma produkcije GSH (Deman i sar., 2001).

Imajući u vidu da u uslovima hronične blokade AT1R, tretman tempolom nije sprečio nastanak značajnih strukturnih oštećenja bubrega SH pacova sa ADR nefropatijom, može se pretpostaviti da je povećana aktivnost SOD u bubrezima ovih pacova mogla da doprinese nastanku oštećenja. U ranijim istraživanjima Offer i saradnici (2000) su ukazali na pro-oksidativni efekat tempola, SOD mimetika, kao i samog enzima SOD. Poznato je da tempol može da uklanja $\cdot\text{O}_2^-/\text{HO}_2\cdot$ zahvaljujući prelasku iz radikalske forme nitroksida u okso-amonijum katijon formu (Offer i sar., 2000, Wilcox i sar., 2010). Osim toga, Offer i saradnici (2000) su pokazali da nitroksid, kada se ponaša kao SOD mimetik može takođe da ispoljava pro-oksidativne efekte, slično kao i SOD. Naime, pomenuti autori su pokazali da je u uslovima sa prisutnim visokim nivoom SOD ili SOD mimetika najveći deo $\cdot\text{O}_2^-$ uklonjen dismutacijom, dok su enzim i SOD mimetik ostali u oksidovanoj formi (Cu(II),Zn-SOD i okso-amonijum katijon), te mogu reagovati i oksidovati ciljne molekule koje su prvobitno trebali da zaštite od oštećenja. Iako nisu u potpunosti razjašnjeni efekti kombinovanog tretmana prikazani u ovoj disertaciji, pretpostavka je da su bar neki od opisanih mehanizama odgovorni za nastanak oštećenja u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom.

Rezultati ispitivanja NADPH oksidaze u ovoj disertaciji pokazali su da su ekspresije obe izoforme katalitičke subjedinice ovog enzima, Nox2 i Nox4, u bubrezima SH pacova bile značajno smanjene nakon aplikacije ADR. Imunohistohemijska analiza tkiva bubrega pokazala je da je ekspresija Nox2 lokalizovana u glomerulima SH pacova, a da je nakon aplikacije ADR ovo pozitivno bojenje na Nox2 bilo slabo i fokalno raspoređeno u glomerulima. S druge strane, u tubulima kontrolnih životinja je detektovana ekspresija Nox4, koja je bila smanjena nakon aplikacije ADR. Osim toga, u bubrezima SH pacova koji su primili ADR prisutna je povećana infiltracija mononuklearnih leukocita i intersticijska fibroza u regionima oko sklerotičnih glomerula, dilatiranih i atrofiranih tubula. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u istraživanjima drugih autora (Babelova i sar., 2012, Khodo i sar., 2012), koji su ispitivali ulogu Nox4 i Nox2 u različitim eksperimentalnim modelima hronične bubrežne slabosti. Naime, Babelova i saradnici (2012) su pokazali da kod miševa sa dijabetesom dolazi do značajnog povećanja vrednosti albuminurije kada se ekspresija

Nox4 spreči delovanjem tamoksifena. Ista grupa autora takođe je pokazala da se ekspresija Nox4, lokalizovana uglavnom u tubulocitima, smanjuje sa napredovanjem bolesti. U istraživanju Khodo i saradnika (2012) pokazano je da je u poređenju sa *wild-type* miševima, izazivanje unilateralne opstrukcije uretre kod Nox4-*knockout* miševa dovelo do razvoja intenzivnije fibroze intersticijuma, usled povećane apoptoze tubulocita, što je uticalo i na veću atrofiju tubula, a bilo je praćeno i značajno povećanim oksidativnim stresom u bubrezima.

Podaci iz literature pokazuju da u fiziološkim uslovima Nox4 može da ima protektivnu ulogu (Babelova i sar., 2012). Naime, Nox4 u ćelijama tubula predstavlja glavni izvor H₂O₂ koji se u fiziološkim uslovima generiše u niskim koncentracijama kada može aktivirati Nrf-2/Keap1 signalni put, koji stimuliše antioksidativni i anti-inflamatorni odgovor (Brewer i sar., 2011, Khodo i sar., 2012). Khodo i saradnici (2012) su pokazali da u nedostatku Nox4, antioksidativna odbrana u tubulocitima može biti oslabljena u uslovima prekomerne produkcije ROS. Takođe, isti autori su pokazali da Nox4 ne promoviše napredovanje bolesti, već ima presudnu ulogu u preživljavanju tubulocita nakon oštećenja. Na osnovu rezultata dobijenih u istraživanjima izvedenim na različitim modelima HBS, Babelova i saradnici (2012) su pretpostavili da Nox4 može da ima malu, ali značajnu ulogu u sprečavanju inflamacije, fibroze i albuminurije, kao i daljeg napredovanja bubrežne bolesti.

Ranija istraživanja Zhang i saradnika (2009) pokazala su da kod Nox2- ili p47^{phox}-*knockout* miševa nakon aplikacije lipopolisaharida (LPS, endotoksin poreklom iz bakterija) dolazi do značajnog povećanja inflamatornog odgovora, koji je bio praćen povećanom genskom ekspresijom medijatora inflamacije i intenzivnom infiltracijom neutrofila. Isti autori su ukazali na to da ROS, produkovane od strane NADPH oksidaze, različitim signalim putevima ne promovišu, već limitiraju inflamatorni odgovor. U uslovima kada je ekspresija Nox2 smanjena, može da dođe do hiperinflamatornog odgovora usled sprečavanja procesa koji su stimulisani ROS, kao što su ROS-zavisna apoptoza inflamatornih ćelija i ROS-inhibirana produkcija citokina. Takođe je sprečena i oksidativna inaktivacija proinflamatornih medijatora, a ovi pomenuti procesi ukazuju da NADPH oksidaza može da ima ulogu u limitiranju inflamatornog odgovora (Bedard i sar., 2007).

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazali su da je hronična blokada AT1R losartanom uticala na značajno povećanje ekspresije Nox2 u glomerulima, dok je ekspresija Nox4 bila blago, ali ne statistički značajno povećana u tubulima SH pacova sa ADR nefropatijom. Ovo je bilo praćeno značajno smanjenim strukturnim oštećenjima bubrega i smanjenom inflamacijom intersticijuma. Uzivajući u obzir ove, ali i prethodno prikazane protektivne efekte losartana, može se pretpostaviti da bi ponovno uspostavljanje anti-inflamatornog signalnog puta, koji uključuje Nox2 i bar delimično Nox4, moglo da doprinese smanjenju strukturnih i funkcijskih oštećenja bubrega uzrokovanih adrijamicinom. Tretman tempolom, iako nije uticao na ekspresiju Nox2 i Nox4, svojim antioksidativnim i anti-inflamatornim efektima značajno je smanjio proteinuriju, glomeruloskleroza i periglomerularnu inflamaciju, dovodeći do usporavanja progresije bubrežne slabosti. Međutim, u uslovima hronične blokade AT1R, tempol poništava protektivni anti-inflamatorni efekat losartana u pogledu ekspresije Nox2 u bubrežima, što su potvrdili i dobijeni rezultati histopatološke analize, koji su pokazali da je pored periglomerularne, detektovana i peritubularna infiltracija mononuklearnim leukocitima, ukazujući na prisutnu inflamaciju intersticijuma bubrega SH pacova sa ADR nefropatijom.

Prethodna istraživanja pokazala su da ROS poreklom od NADPH oksidaze mogu biti uključene u regulaciju ekspresije i aktivacije MMP (Inoue i sar., 2001, Grote i sar., 2003, Bedard i sar., 2007) i da se ovim signalnim putem uglavnom stimuliše ekspresija MMP. Pokazano je da peroksinitriti mogu izazvati oksidaciju cisteina i posledično dovesti do aktivacije MMP (Okamoto i sar., 2001, Chow i sar., 2007). Međutim, u *in vivo* studijama izvedenim na Nox2-deficijentnim miševima pokazano je da bi nedostatak Nox2 mogao da utiče na povećanje nivoa MMP (Bedard i sar., 2007). Uzimajući ovo u obzir, može se pretpostaviti da je značajno snižena ekspresija Nox2 u bubrežima SH pacova sa ADR nefropatijom mogla uticati na povećanu ekspresiju MMP-1 u ovom modelu ADR nefropatije. Istraživanja Ahmed i saradnika (2007) obuhvatala su imunohistohemijske analize tkiva bubrega *Wistar* pacova sa izazvanom nefrektomijom, a dobijeni rezultati su pokazali da je u glomerulobazalnoj membrani i mezangijumskom matriksu glomerula detektovana snažna ekspresija MMP-1 i povećana aktivnost ovog enzima. Njihovi rezultati su takođe pokazali da povećana aktivnost MMP-1 može imati značajan uticaj na strukturne promene u glomerulima, koje obuhvataju remodelovanje i

razvoj glomeruloskleroze. Pomenuti autori su pretpostavili da povećana degradacija ECM dovodi do oštećenja GBM i mezangijumskog matriksa, što može da stimuliše kompenzatorne mehanizme koji dovode do remodelovanja, odnosno do prekomerne produkcije komponenti ECM i formiranja neadekvatnog i dezorganizovanog matriksa.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da su svi ispitivani tretmani značajno smanjili ekspresiju MMP-1 u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom, što je bilo praćeno značajno smanjenom oksidacijom proteina. Tretman tempolom se pokazao kao najuspešniji u sprečavanju prekomerne ekspresije MMP-1, redukciji proteinurije i smanjenju glomeruloskleroze. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da tempol, zahvaljujući svojoj antioksidativnoj aktivnosti, može da spreči oksidativne modifikacije proteina i remodelovanje u oštećenim glomerulima. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Castro i saradnika (2009), koji su pokazali da je hronični tretman tempolom doveo do smanjenja sistemskog i vaskularnog oksidativnog stresa i ekspresije i aktivnosti MMP, sprečavajući na taj način vaskularno remodelovanje u modelu renalne hipertenzije. S druge strane, prikazani rezultati pokazuju da tempol u kombinaciji sa losartanom ne utiče na dodatno smanjenje ekspresije MMP-1 i proteinurije u odnosu na vrednosti izmerene nakon tretmana losartanom. Takođe, u bubrezima kombinovani tretman nije sprečio strukturalna oštećenja: glomerulosklerozu, dilataciju i atrofiju tubula, infiltraciju mononuklearnih leukocita i intersticijsku fibrozu.

Brojne studije izvedene na animalnim modelima i u humanoju populaciji ukazale su da je nedostatak NO, nastao putem aktivacije različitih mehanizama (Baylis 2008), povezan sa patogenezom hronične bubrežne slabosti i doprinosi daljoj progresiji bolesti (Schmidt i sar., 2000, Baylis, 2008, Tain i sar., 2007, Aiello i sar., 1997). Ekskrecija nitrita i nitrata urinom, kao i koncentracija nitrita i nitrata u plazmi danas su široko prihvaćeni indirektni pokazatelji ukupne produkcije NO u biološkim sistemima (Schmidt i sar., 2000, Baylis 2008, Tain i sar., 2007). Rezultati ove disertacije su pokazali da aplikacija ADR kod SH pacova dovodi do značajnog porasta ekskrecije ukupnih nitrita i nitrata (NO_x) urinom, na račun ekskrecije nitrita. S druge strane, u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom utvrđen je značajan pad u koncentraciji NO_x , što je bilo povezano sa značajno smanjenom ekspresijom iNOS, dok su ekspresije konstitutivnih izoformi NOS (eNOS i nNOS) bile smanjene, ali ne statistički značajno. Pokazano je da bubrezi, za razliku od vaskularnog endotela, predstavljaju manji izvor NO u organizmu i da

lokalna produkcija NO u bubrežima ima manji udeo u ukupnoj produkciji NO (Baylis i sar., 1998). Kao što je navedeno, aplikacija ADR kod SH pacova značajno je povećala ekskreciju nitrata urinom, dok je u bubrežima uticala na značajno smanjenje produkcije NO. Dobijeni rezultati ukazuju na prisutne razlike između ukupne produkcije NO i one izmerene u bubrežima, o čemu svedoče i ranije publikovana istraživanja drugih autora izvedena na različitim modelima HBS (Erdely i sar., 2004, Tain i sar., 2007, Baylis i sar., 2008, Raij i sar., 1995). Aiello i saradnici (1997) su pokazali da se kod pacova sa nefrektomijom tokom vremena smanjuje produkcija NO u bubrežima, što je bilo u korelaciji sa progresijom oštećenja bubrega. Prisustvo smanjene produkcije NO u bubrežima ovih pacova posledica je smanjene ekspresije iNOS i progresivnog opadanja aktivnosti NOS, što je bilo praćeno značajno smanjenom ekskrecijom stabilnih metabolita NO, odnosno njihovom povećanom koncentracijom u plazmi (Aiello i sar., 1997). Isti autori su pretpostavili da je povećana koncentracija NO metabolita u plazmi verovatno poreklom iz endotela krvnih sudova, što potvrđuju i rezultati povećane ekspresije iNOS i eNOS, kao i povećana aktivnost NOS u aorti ispitivanih pacova. U studiji izvedenoj na hipertenzivnim pacijentima sa hroničnim glomerulonefritisom koji su bili na hemodijalizi (Meenakshi i sar., 2013), pored povećane vrednosti kreatinina, značajno je povećan nivo NO u serumu i ovi parametri su bili u značajnoj pozitivnoj korelaciji. Isti autori su pretpostavili da je povećanje NO u serumu ovih pacijenata posledica povećane aktivnosti iNOS stimulisane citokinima. Takođe, Qin i saradnici (2008) su pokazali da visoka kumulativna doza ADR (2 mg/kg svaki drugi dan tokom 8 nedelja, *i.p.*) značajno povećava produkciju NO u plazmi, što je bila posledica povećane aktivnosti NOS, naročito iNOS koja ima ključnu ulogu u povećanom stvaranju NO u odgovoru na stres. Rezultati publikovanih istraživanja ukazuju na bar neke od mehanizama koji bi mogli da budu odgovorni za nastanak razlike između ukupne produkcije NO i one izmerene u bubrežima, koje su detektovane u ovoj disertaciji kod SH pacova sa ADR nefropatijom.

U prikazanom istraživanju rezultati imunohistohemijske detekcije izoformi NOS u bubrežima su pokazali da je ekspresija iNOS široko rasprostranjena u tubulima kontrolnih životinja, a da su značajna oštećenja tubulointercijuma praćena sniženom ekspresijom iNOS u bubrežima SH pacova sa ADR nefropatijom. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Rangan i saradnika (2001), koji su pokazali da je hronična

blokada iNOS uzrokovala bržu progresiju ADR nefropatije kod *Wistar* pacova. Osim toga, u bubrezima ovih pacova bio je prisutan povećan oksidativni stres, kao i izražena atrofija tubula i inflamacija intersticijuma. Na osnovu dobijenih rezultata pomenuti autori su pretpostavili da NO poreklom od iNOS može da ima protektivnu ulogu u sprečavanju oštećenja tubulointersticijuma stimulacijom mehanizama koji sprečavaju akumulaciju monocita i produkciju ROS. Takođe, istraživanja drugih autora (Craven i sar., 1997, Mazroa i sar., 2009) pokazala su da inhibicija iNOS u uslovima dijabetesa može da ubrza slabljenje bubrežne funkcije usled nastanka većih strukturnih oštećenja bubrega i izraženije proteinurije. Mazroa i saradnici (2009) su nakon izazivanja dijabetesa kod *iNOS-knockout* miševa ustanovili veću ekspanziju mezangijuma i intenzivniju fibrozu tubulointersticijuma, što je ukazalo na protektivnu ulogu iNOS u usporavanju progresije dijabetesne nefropatije.

Rezultati istraživanja Vaziri i saradnika (1998) pokazala su da nakon nefrektomije kod Sprague-Dawley pacova dolazi do značajnog sniženja ekspresije i aktivnosti eNOS u bubrezima. Ekspresija eNOS u bubrezima ograničena je na endotelne ćelije glomerula, gde ima važnu ulogu u održanju endotelne funkcije (Han i sar., 2005). Poznato je da NO poreklom od eNOS, zahvaljujući svojim anti-inflamatornim, antiproliferativnim i antitrombogenim efektima, učestvuje u očuvanju integriteta vaskularnog endotela (Nakayama i sar., 2009). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da ekspresija eNOS nije bila detektovana u glomerulima zahvaćenim sklerozom i prisutnom ekspanzijom mezangijuma kod SH pacova sa ADR nefropatijom, što je bilo praćeno značajnom proteinurijom i albuminurijom, ukazujući na narušenu endotelnu funkciju u glomerulima. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa raspoloživim podacima u literaturi. Naime, Nakayama i saradnici (2009) su pokazali da je nefrektomija kod *eNOS-knockout* miševa dovela do intenzivnijeg pogoršanja bubrežne funkcije, izraženije glomeruloskleroze i većih oštećenja tubula, praćenih intenzivnijom infiltracijom makrofaga i intersticijskom fibrozom. Takođe, isti autori su pokazali da je nedostatak eNOS doveo do gubitka endotelnih ćelija kapilarnog klupka glomerula i u peritubularnoj kapilarnoj mreži, što je moglo da ubrza progresiju bolesti. U istraživanjima drugih autora (Nakagawa i sar., 2007, Takahashi i sar., 2014), koji su *eNOS-knockout* miševima izazivali dijabetesnu nefropatiju, takođe je potvrđeno da je nedostatak eNOS doveo do većih oštećenja bubrega, a da je nedostatak NO u endotelu ubrzao progresiju nefropatije.

Sun i saradnici (2013) su ustanovili da narušena endotelna funkcija u glomerulima eNOS-*knockout* miševa kojima je izazvana ADR nefropatija može doprineti nastanku i progresiji glomeruloskleroze, odnosno da oštećene endotelne ćelije ranije podležu apoptozi nego podociti, ukazujući na to da endotelna disfunkcija u glomerulima takođe ima važnu ulogu u nastanku i progresiji hronične bubrežne slabosti.

Literaturni podaci pokazuju da je ekspresija nNOS pretežno lokalizovana u tubulocitima proksimalnih tubula u zoni *macula dense* i u sabirnim kanalićima unutrašnjeg segmenta medule bubrega (Bachmann i sar., 1995, Smith i sar., 2009). Rezultati ove disertacije potvrđuju da je nNOS predominantno lokalizovana u zoni *macula dense*, a aplikacija ADR dovela je do smanjene ekspresije nNOS u ovim delovima bubrega. Szabo i saradnici (2003) su pokazali da je nakon nefrektomije došlo do smanjenja ekspresije nNOS u korteksu i meduli bubrega, što je bilo povezano sa strukturnim i funkcijskim promenama bubrega, koje su obuhvatale razvoj značajne glomeruloskleroze i proteinurije. Rezultati istraživanja Muller i saradnika (2010) su takođe pokazali da je hronična selektivna inhibicija nNOS u bubrezima miševa sa izazvanom nefrektomijom, uticala na razvoj izraženije albuminurije i značajnije ekspanzije mezangijuma, što je bilo praćeno glomerulosklerozom, atrofijom tubula i intersticijskom inflamacijom i fibrozom. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji u saglasnosti su sa raspoloživim podacima u literaturi, koji ukazuju da nedostatak NO poreklom od nNOS u bubrezima može imati važnu ulogu u progresiji hronične bubrežne slabosti.

Prethodna istraživanja su pokazala da RAS može biti uključen u mehanizam koji dovodi do narušene produkcije NO u eksperimentalnim modelima HBS (Roczniak i sar., 1999, Ashab i sar., 1995, Roson i sar., 2010). U ovom istraživanju hronična blokada AT1R losartanom u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom uticala je na značajno povećanje ekspresije sve tri izoforme NOS, što je bilo praćeno povećanjem koncentracije ukupnih metabolita NO u bubrezima do nivoa izmerenih kod kontrolnih pacova. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa raspoloživim podacima u literaturi. Naime, Rocznik i saradnici (1999) su pokazali da je tretman losartanom kod pacova sa nefrektomijom povećao ekspresiju nNOS u korteksu bubrega, uz normalizaciju ekskrecije nitrata i nitrita urinom. Takođe, u istom modelu pokazano je da losartan utiče na povećanu ekspresiju eNOS u korteksu bubrega (Trejo i sar., 2017). Istraživanja Satoh i saradnika (2008) na

modelu dijabetesne nefropatije pokazala su da je losartan sprečio produkciju ROS u bubrežima, što je bilo praćeno povećanom biodostupnošću BH₄, što je održalo eNOS u formi dimera i posledično dovelo do normalizacije produkcije NO u bubrežima. Uzimajući u obzir da u modelu ADR nefropatije NO poreklom od iNOS ima antioksidativni i anti-inflamatorni efekat, kao što su pokazali Rangan i saradnici (2001), može se pretpostaviti da u ovom istraživanju povećana ekspresija iNOS nakon hronične blokade AT1R bar delimično uticala na poboljšanje bubrežne funkcije i da je doprinela očuvanju tubula i smanjenju intersticijske inflamacije u ranoj fazi ADR nefropatije. U istraživanjima Ji i saradnika (2005), izvedenim na pacovima kojima je izazvana HBS sa većim stepenom oštećenja (unilateralna nefrektomija i *i.v.* aplikacija ADR 6 mg/kg), potvrđeno je da hronični tretman losartanom (40 mg/kg) normalizuje ekspresiju iNOS u bubrežima i značajno smanjuje proteinuriju i oštećenja bubrega, usporavajući dalji razvoj glomeruloskleroze.

Istraživanja hronične bubrežne slabosti na modelu nefrektomije pokazala su da je nedostak eNOS u bubrežima povezan sa većim strukturnim oštećenjima glomerula, pogoršanjem bubrežne funkcije i povećanom produkcijom $\cdot\text{O}_2^-$ (Mendoza i sar., 2008, Vaziri i sar., 1998), a nastanak ovih promena bio je sprečen tretmanom L-argininom u kombinaciji sa vitaminima C i E (Mendoza i sar., 2008). Slične rezultate publikovali su i drugi autori (Vaziri i sar., 2002, Tain i sar., 2007), koji su pokazali da je tretman vitaminom E u modelu nefrektomije uticao na smanjenje lipidne peroksidacije plazme i produkcije $\cdot\text{O}_2^-$ u bubrežima, što je bilo praćeno povećanom ekspresijom sve tri izoforme NOS u bubrežima. Takođe su Roson i saradnici (2010) pokazali da tempol utiče na značajno povećanje ekspresije eNOS u korteksu i meduli bubrega hipertenzivnih pacova. Kada je u pitanju ukupna produkcija NO, Vasiri i saradnici (2003) su pokazali da tretman tempolom u modelu nefrektomije normalizuje ekskreciju NO_x urinom, što su potvrdili i rezultati dobijeni u ovom istraživanju. Osim toga, tretman tempolom je kod SH pacova sa ADR nefropatijom uticao na značajno povećanje ekspresije sve tri izoforme NOS u bubrežima. Međutim, kod ovih pacova koncentracija ukupnih metabolita NO u bubrežima bila je nepromenjena, tj. na nivou pacova koji su primili ADR. Takođe, tempol je održao visoku vrednost diureze, koja je bila slična onoj izmerenoj kod pacova koji su primili ADR. Imajući u vidu da pored drugih fizioloških uloga NO u bubrežima promoviše diurezu i natriurezu (Mount i sar., 2006), kao i to da je tempol značajno

povećao ekspresije sve tri izoforme NOS u bubrezima, može se pretpostaviti da je prisustvo nepromenjenog nivoa ukupnih metabolita NO u bubrezima pacova tretiranih tempolom verovatno posledica povećane diureze.

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji su pokazali da, za razliku od pojedinačnih tretmana losartanom i tempolom, kombinovani tretman uticao je na smanjenje ekspresije konstitutivnih izoformi NOS (eNOS i nNOS), dok je ekspresija iNOS značajno povećana, uz povećanu produkciju nitrita u bubrezima. Osim toga, dobijeni rezultati su pokazali da u uslovima hronične blokade AT1R, tretman tempolom nije uticao na dodatno sniženje vrednosti proteinurije, dok je došlo do značajnog pada u brzini glomerulske filtracije. Takođe, kombinovani tretman nije uticao na smanjenje strukturnih oštećenja glomerula i tubula, nastala usled dejstva ADR. Slična opažanja publikovali su Furu i saradnici (1998) u studiji izvedenoj na pacijentima sa proliferativnim glomerulonefritisom, koji su pokazali da je stepen oštećenja glomerula u negativnoj korelaciji sa ekspresijom eNOS, a u pozitivnoj sa ekspresijom iNOS u hroničnoj bubrežnoj slabosti. Osim toga, Ozen i saradnici (2001) su u svojim istraživanjima pretpostavili da bi povećana produkcija nitrita od strane iNOS mogla da bude odgovorna za nastanak proteinurije kod *Wistar* pacova sa ADR nefropatijom. Usled vrlo kratkog poluživota, NO svoje efekte postiže u zavisnosti od mesta produkcije i koncentracije na mestu delovanja. Uzimajući u obzir činjenicu da konstitutivne izoforme NOS (eNOS i nNOS) produkuju male količine NO, dok iNOS sintetiše veće količine NO (Raj i sar., 1995), može se pretpostaviti da značajno povećanje nitrita u bubrezima pacova koji su dobijali kombinovani tretman može biti posledica povećane aktivnosti iNOS, čija je povećana ekspresija prisutna u bubrezima ovih pacova. Takođe, u ovoj disertaciji ranije je prikazano da je u bubrezima ovih pacova moglo da dođe do nagomilavanja H₂O₂ usled povećane aktivnosti SOD i smanjene aktivnosti GP_x. Poznato je da peroksinitriti nastaju interakcijom veoma reaktivnog NO[•] i O₂^{•-} (Vaziri i sar., 1999, Pacher i sar., 2007), a osim tog opisani su i alternativni putevi formiranja peroksinitrita, koji pokazuju da peroksinitrit može nastati reakcijom nitrita sa H₂O₂ (Robinson i sar., 2005) ili pri povećanoj koncentraciji NO i H₂O₂ u reakciji sa SOD (McBride i sar., 1999). Stoga, pretpostavka je da su ovo potencijalni mehanizmi nastanka peroksinitrita koji su mogli da dovedu do patoloških promena koje su detektovane nakon kombinovanog tretmana u bubrezima SH pacova sa ADR nefropatijom. S druge strane, pokazano je da se

peroksinitrit kada deluje kao oksidans, raspada na nitrit i hidroksilni anjon, pre nego da se izomerizuje u nitrat (Pacher i sar., 2007), a osim toga, opisana je i reakcija između ONOO^- i ONOOH (peroksinitritna kiselina) u kojoj kao produkti mogu nastati NO_2^- i O_2 i da se prinos NO_2^- povećava sa povećanjem koncentracije peroksinitrita (Molina i sar., 2013). Stora se može pretpostaviti da povećana koncentracija nitrita u bubrezima pacova nakon kombinovanog tretmana može, bar delimično, da bude usled povećanog stvaranja peroksinitrita, koji su mogli da uzrokuju oštećenja i naruše bubrežnu funkciju, što je konačno moglo da bude jedan od mehanizama brže progresije bubrežne slabosti.

U ranijim istraživanjima Okuda i saradnika (1986a) pokazano je da ADR nije uticao na promenu sistolnog krvnog pritiska kod SH pacova kojima je fokalna glomeruloskleroza izazivana na isti način kao i u ovom eksperimentu. Ovde prikazani rezultati su potvrdili da se vrednosti sistolnog, dijastolnog i srednjeg arterijskog pritiska nisu promenile kod SH pacova nakon aplikacije ADR, što je bilo u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja naše grupe (Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009). U prikazanom istraživanju sistemski hemodinamski parametri, kao što su minutni volumen srca, frekvencija srčanih kontrakcija i ukupni periferni vaskularni otpor, takođe se nisu menjali kod SH pacova koji su primili ADR. Rezultati ispitivanja akutnog efekta ADR na sistemsku hemodinamiku kod zečeva (Rabkin i sar., 1982) pokazali su da ADR nije uticao na krvni pritisak i frekvencu srca, dok je značajno smanjio minutni volumen i povećao ukupni periferni vaskularni otpor. U srcu i krvnim sudovima ADR može da ispolji citotoksičan efekat, kada stimuliše apoptozu ili inhibira ćelijsku deobu, a ovo su neki od mehanizama kardiotoksičnog delovanja ADR (Zhang i sar., 1996, Bielak-Zmijewska i sar., 2014).

Rezultati prikazani u okviru ove disertacije pokazali su da nije uočena značajna promena u protoku krvi nakon aplikacije ADR, osim u slučaju karotidne arterije, gde je zabeležen značajno smanjen vaskularni otpor. Bielak-Zmijewska i saradnici (2014) su pokazali da ćelije glatkih mišića krvnih sudova tretirane ADR ostaju u G2/M fazi ćelijskog ciklusa i ne kompletiraju deobu. Takođe, literaturni podaci ukazuju da ADR stimuliše apoptozu (Zhang i sar., 1996). U istraživanjima drugih autora (Han i sar., 2012, Hayoz i sar., 1993) pokazano je da se karotidne arterije SH pacova odlikuju smanjenom elastičnošću i zadebljalim vaskularnim zidovima. Stoga, na osnovu svega iznetog može se pretpostaviti da u karotidnim arterijama SH pacova adrijamicin može da dovede do

zmanjenja hipertrofije i proliferacije ćelija glatkih mišića, a posledično i do smanjenja vaskularnog otpora protoku krvi u ovim krvnim sudovima. U istraživanjima izvedenim na zečevima (Wanless i sar., 1987) primena kumulativne doze ADR od 8 mg/kg, dva puta veće doze od one primenjene u ovim eksperimentalnim uslovima, dovela je do smanjenja protoka krvi u bubrežima, slezini, tankom crevu, skeletnim mišićima, ali ne i u koronarnim i cerebralnim krvnim sudovima. U drugom istraživanju na zečevima (Arnolda i sar., 1985), gde je primenjena još veća kumulativna doza ADR od 16 mg/kg, došlo je do značajnog povećanja vaskularnog otpora i sniženja protoka krvi u bubrežima. Takođe, Tvette i saradnici (1982) su pokazali da primena ADR u visokim dozama usporava protok krvi kroz bubrege. S druge strane, u prethodnim istraživanjima naše grupe pokazano je da tek nakon 12 nedelja od druge injekcije ADR, primenjenog u istoj dozi kao i u ovom eksperimentu, dolazi do značajne promene protoka krvi i vaskularnog otpora bubrežne arterije, odnosno u kasnom stadijumu ADR nefropatije kod SH pacova (Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009).

Dobro je poznato da RAS ima značajnu uloga u patogenezi hipertenzije kod SH pacova (Suzuki i sar., 1995, Schnackenberg i sar., 1998). Takođe, drugi autori su utvrdili prekomernu produkciju $\cdot O_2^-$ kod SH pacova (Schnackenberg i sar., 1998). Ranija istraživanja su pokazala da AngII može aktivirati mehanizme koji dovode do povećane produkcije ROS i oksidativnog stresa (Romero i sar., 1999). Usled prekomerne produkcije ROS, nastali $\cdot O_2^-$ može u reakciji sa NO da dovede do njegove inaktivacije i formiranja peroksinitrita. Pokazano je da peroksinitriti mogu da oksiduju arahidonsku kiselinu, a nastali izoprostani (potentni vazokonstriktori) mogu dodatno da pojačavaju vazokonstriktorni efekat AngII (Romero i sar., 1999). Dobijeni rezultati su pokazali da je hronična blokada AT1R losartanom značajno snizila krvni pritisak SH pacova sa ADR nefropatijom, što je u saglasnosti sa publikovanim rezultatima naše grupe (Mihailovic-Stanojevic i sar., 2009). Kako je pokazano, tretman losartanom značajno je smanjio lipidnu peroksidaciju i povećao antioksidativni kapacitet plazme uz povećanje ukupne produkcije nitrata, što ukazuje na to da krvni pritisak kod ovih pacova može biti regulisan mehanizmima koji obuhvataju značajno smanjenje sistemskog oksidativnog stresa i inhibiciju vazokonstriktornog efekta AngII putem blokade AT1R.

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da je tretman tempolom doveo do blagog, ali statistički neznačajnog sniženja srednjeg arterijskog pritiska, dok je uticao

na značajno povećanje frekvence, koje je bilo praćeno smanjenim minutnim volumenom srca, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. Naime, rezultati hemodinamskih studija na minijaturnim svinjama, publikovani od strane Hahn i saradnika (1999), pokazali su da je tempol davan intravenozno u rastućim dozama pokazao dozno-zavisni hipotenzivni efekat, tj. smanjenje srednjeg arterijskog pritiska, i istovremeno je doveo do refleksne tahikardije (povećanja frekvence srčanih kontrakcija) i smanjenja indeksa sistemskog vaskularnog otpora. Do sličnih rezultata su došli i Campese i saradnici (2004), koji su pokazali da tempola kod Sprague-Dawley pacova utiče na sniženje srednjeg arterijskog pritiska i povećanje frekvence srca. Isti autori su pretpostavili da je tempol mogao da dovede do direktne vazodilatacije perifernih krvnih sudova i refleksne aktivacije simpatičkog nervnog sistema.

Efekte hronične primene losartana, tempola i njihove kombinacije ispitivali su Dobrian i saradnici (2001) u eksperimentalnom modelu renalne hipertenzije. Njihovi rezultati su pokazali da su pojedinačni tretmani losartanom i tempolom doveli do umerenog sniženja srednjeg krvnog pritiska i produkcije $\cdot\text{O}_2^-$ u aorti, dok je kombinovani tretman značajno snizio vrednosti ovih parametara. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da kombinovani tretman značajno smanjuje sistemski oksidativni stres i dovodi do blagog, ali ne statistički značajnog sniženja srednjeg arterijskog pritiska. Takođe, kombinovani tretman je povećao protok krvi i snizio vaskularni otpor u karotidnoj arteriji SH pacova sa ADR nefropatijom. Imajući u vidu opisane efekte kombinovanog tretmana, može se pretpostaviti da promene u karotidnoj arteriji mogu biti posledica istovremene blokade vazokonstriktornog efekta AngII i produkcije $\cdot\text{O}_2^-$ u vaskularnom zidu ovog krvog suda.

Hronična blokada AT1R losartanom u ovom istraživanju dovela je do značajnog povećanja protoka krvi i smanjenja vaskularnog otpora u bubrežnoj arteriji SH pacova sa ADR nefropatijom. Dobijeni rezultati su u skladu sa raspoloživim podacima u literaturi. U studiji koja je uključivala pacijente sa dijabetesom (Fliser i sar., 2005) pokazano je da je hronična blokada AT1R, pored sniženog krvnog pritiska i oksidativnog stresa, uticala na smanjenje intrarenalnog vaskularnog otpora. AT1R i AT2R predominantno se eksprimiraju u vaskulaturi korteksa i proksimalnim tubulima spoljašnjeg dela medule bubrega (Miyata i sar., 1999). S obzirom da je vazokonstriktorni efekat koji AngII ostvaruje vezivanjem za AT1R (Arendshorst i sar., 1999) sprečen

primenom losartana, pretpostavka je da se u ovakvim uslovima AngII vezuje za AT2R i aktivira signalne puteve koji dovode do vazodilatacije putem stimulacije produkcije bradikinina, NO i cGMP u bubrežnim arterijama (Siragy i sar., 2000). U prilog ovoj pretpostavci govore i dobijeni rezultati koji su pokazali da je tretman losartanom u bubrežima SH pacova sa ADR nefropatijom doveo do značajnog povećanja koncentracije ukupnih NO metabolita do nivoa kontrolnih životinja. Povećana produkcija NO u bubrežima ovih pacova dovela je do smanjenja vaskularnog otpora bubrežne arterije i intraglomerularnog pritiska, a posledično i do povećanja selektivne propustljivosti filtracione membrane glomerula.

Tretman tempolom nije menjao protok krvi kroz bubrežnu arteriju, ali je sprečio gubitak proteina urinom i smanjio je oštećenja glomerula nastala usled dejstva ADR. Međutim, kada se losartan primeni u kombinaciji sa tempolom, gubi se povoljan efekat losartana u vidu poboljšanja protoka krvi i smanjenja vaskularnog otpora u bubrežnoj arteriji. Osim toga, kombinovani tretman nije doveo do poboljšanja strukture i funkcije bubrega. Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ovih istraživanja može se konstatovati da u ranoj fazi ADR nefropatije kod SH pacova kombinovani tretman losartanom i tempolom nije značajno sprečio strukturna oštećenja, niti je doveo do poboljšanja funkcije bubrega, što može ukazati na to da u ispitivanim dozama izostaje njihov udružen povoljan efekat na usporavanje progresije FSGS kod SH pacova izazvane adrijamicinom.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima da se ispita povezanost sistema renin angiotenzin i oksidativnog stresa u patogenezi i progresiji FSGS izazvane adrijamicinom kod SH pacova, rezultati dobijeni i prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da:

1. Losartan (blokator AT1R) i tempol (sakupljač slobodnih radikala, SOD mimetik), pojedinačno, smanjuju strukturalna oštećenja bubrega izazvana adrijamicinom (fokalno segmentnu glomerulosklerozu, atrofiju i dilataciju tubula, intersticijsku inflamaciju i fibrozu), ali sinergistički ne deluju jer ne menjaju ukupni zbir morfoloških promena;
2. Tretmani losartanom i tempolom poboljšavaju bubrežnu funkciju jer smanjuju proteinuriju i albuminuriju, ali tempol u kombinaciji sa losartanom dodatno ne sprečava gubitak proteina urinom i smanjuje brzinu glomerulske filtracije;
3. Losartan normalizuje vrednosti triglicerida, ukupnog holesterola i LDL holesterola, a tempol povećava nivo HDL holesterola u plazmi, međutim u kombinaciji oni ne utiču na poboljšanje u lipidnom statusu;
4. Svi ispitivani tretmani poboljšavaju oksidativni status, odnosno povećavaju antioksidativni kapacitet, a smanjuju lipidnu peroksidaciju u plazmi i karbonilaciju proteina u bubrezima; takođe, povećavaju aktivnosti enzima antioksidativnog sistema u eritrocitima; losartan povećava aktivnosti SOD, GP_x i GR, dok tempol u kombinaciji sa losartanom povećava aktivnost SOD u bubrezima;
5. Losartan povećava ekspresiju Nox2 i sprečava periglomerularnu i peritubularnu inflamaciju intersticijuma, ukazujući na anti-inflamatornu ulogu NADPH oksidaze koja sadrži Nox2 izoformu katalitičke subjedinice;

6. Pojedinačni tretmani losartanom i tempolom povećavaju ekspresiju sve tri izoforme NOS, dok kombinovani tretman povećava samo ekspresiju iNOS u bubrezima;
7. Losartan, pojedinačno ili u kombinaciji sa tempolom, povećava produkciju metabolita NO u homogenatu bubrega; svi ispitivani tretmani smanjuju ukupnu produkciju metabolita NO putem urina;
8. Losartan snižava sistolni i srednji arterijski pritisak, a povećava protok i smanjuje vaskularni otpor u bubrežnoj arteriji; tempol povećava frekvencu srčanih kontrakcija i smanjuje minutni volumen, dok kombinovani tretman povećava protok i smanjuje vaskularni otpor u karotidnoj arteriji, bez promene krvnog pritiska.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da u uslovima hronične blokade AT1R losartanom, tretman tempolom ne sprečava strukturna oštećenja i ne doprinosi daljem usporavanju progresije FSGS, uprkos povećanom antioksidativnom kapacitetu i smanjenom oksidativnom stresu, u ranoj fazi adrijamicinske nefropatije kod SH pacova. Takođe, oslabljen anti-inflamatorni odgovor, delimično posredovan NADPH oksidazom, kao i promene u aktivnostima enzima antioksidativne odbrane i NOS u bubrezima ovih pacova, ukazuju na nedostatak udruženog pozitivnog efekta kombinovanog tretmana na usporavanje progresije bolesti u ovim eksperimentalnim uslovima. Stoga, neophodna su dodatna istraživanja kako bi se bolje razumeli mehanizmi nastalih promena i postiglo efikasnije sprečavanje progresije hronične bubrežne slabosti.

7. LITERATURA

1. Abrantes MM, Cardoso LS, Lima EM, Penido Silva JM, Diniz JS, et al. (2006) Predictive factors of chronic kidney disease in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*, 21:1003-12.
2. Agarwal R, Campbell RC, Warnock DG (2004) Oxidative Stress in Hypertension and Chronic Kidney Disease: Role of Angiotensin II. *Seminars in Nephrology*, 24:101-114.
3. Ahmed AK, Haylor JL, El Nahas AM, Johnson TS (2007) Localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental progressive kidney scarring. *Kidney Int*, 71:755–763.
4. Ahmed LA, Shehata NI, Abdelkader NF, Khattab MM (2014) Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through alleviation of mitochondrial dysfunction in mice. *PLoS One*, 9:1–11.
5. Aiello S, Noris M, Todeschini M, Zappella S, Foglieni C, et al. (1997) Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney Int.*, 52:171-181.
6. Andrew PJ, Mayer B (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.*, 43:521-531.
7. Arendshorst WJ, Brannstrom K, Ruan X (1999) Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. *J Am Soc Nephrol*, 10:S149-S161.
8. Arnolda L, McGrath B, Cocks M, Sumithran E, Johnston C (1985) Adriamycin cardiomyopathy in the rabbit: an animal model of low output cardiac failure with activation of vasoconstrictor mechanisms. *Cardiovasc Res.*, 19:378-82.
9. Arozal W, Watanabe K, Veeraveedu PT, Ma M, Thandavarayan RA, et al. (2010) Protective effect of carvedilol on daunorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Toxicology*, 274:18–26.

10. Aryal B, Jeong J, Rao VA (2014) Doxorubicin-induced carbonylation and degradation of cardiac myosin binding protein C promote cardiotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111:2011–6.
11. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Fujita T (2007) Double-edged action of SOD mimetic in diabetic nephropathy. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 49:13–9.
12. Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, et al. (1995) Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. *JBiolChem.*, 270:21035–21039.
13. Ashab I, Peer G, Blum M, Wollman Y, Chernihovsky T, et al. (1995) Oral administration of L-arginine and captopril in rats prevents chronic renal failure by nitric oxide production. *Kidney Int.*, 47:1515–1521.
14. Babelova A, Avaniadi D, Jung O, Fork C, Beckmann J, et al. (2012) Role of Nox4 in murine models of kidney disease. *Free Radic Biol Med.*, 53:842–853.
15. Bachmann S, Bosse HM, Mundel P (1995) Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*, 268:F885–F898.
16. Baborun T, Soobrattee MA, Luximon-Ramma V, Aruoma OI (2006) Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet Journal of Medical Update*, 1:25-41.
17. Balakumar P, Chakkarwar VA, Kumar V, Jain A, Reddy J, et al. (2008) Experimental models for nephropathy. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 9:189-95.
18. Baltatzi M, Savopoulos Ch, Hatzitolios A (2011) Role of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in hypertension of chronic kidney disease and renoprotection. *Hippokratia*, 15:27-32.
19. Baylis C (2008) Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294:F1-9.
20. Baylis C (2012) Nitric oxide synthase derangements and hypertension in kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 21:1–6.
21. Baylis C, Vallance P (1998) Measurement of nitrite and nitrate (NO_x) levels in plasma and urine; what does this measurement tell us about the activity of the endogenous nitric oxide. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 5:1-4.
22. Bedard K, Krause KH (2007) The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*, 87:245–313.

23. Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG (2001) Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281:H2337–H2365.
24. Bertelli E, Regoli M, Fonzi L, Occhini R, Mannucci S, et al. (2007) Nestin expression in adult and developing human kidney. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55:411–421.
25. Beutler E (1982) Catalase in red cell metabolism, a manual of biochemical methods. (3rd ed.) Grune and Stratton, New York, 105-106.
26. Bielak-Zmijewska A, Wnuk M, Przybylska D, Grabowska W, Lewinska A, et al. (2014) A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. *Biogerontology*, 15:47–64.
27. Bolton WK, Abdel-Rahman E (2001) Pathogenesis of Focal Glomerulosclerosis. *Nephron*, 88:6–13.
28. Bravo J, Quiroz Y, Pons H, Parra G, Herrera-Acosta J, et al. (2003) Vimentin and heat shock protein expression are induced in the kidney by angiotensin and by nitric oxide inhibition. *Kidney Int.*, 64:546–551.
29. Brenner BM (1985) Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol.*, 249:F324–337.
30. Brewer AC, Murray TV, Arno M, Zhang M, Anilkumar NP, et al. (2011) Nox4 regulates Nrf2 and glutathione redox in cardiomyocytes in vivo. *Free Radic Biol Med*, 51:205–215.
31. Brown RH, Jr (1995) Amyotrophic lateral sclerosis: recent insights from genetics and transgenic mice. *Cell*, 80:687-692.
32. Cai H (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular Research*, 68:26–36.
33. Campese VM, Ye S, Zhong H, Yanamadala V, Ye Z et al. (2004) Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287:H695–H703.
34. Carlos CP, Sonehara NM, Oliani SM, Burdmann EA (2014) Predictive usefulness of urinary biomarkers for the identification of cyclosporine A-induced nephrotoxicity in a rat model. *PLoS ONE*, 9:e103660, 11 pages.

35. Carroll RT, Galatsis P, Borosky S, Kopec KK, Kumar V, et al. (2000) 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem Res Toxicol*, 13:294-300.
36. Carvajal G, Rodriguez-Vita J, Rodrigues-Diez R, Sanchez-Lopez E, Ruperez M, et al. (2008) Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney International*, 74:585–595.
37. Castro MM, Rizzi E, Rodrigues GJ, Ceron CS, Bendhack LM, et al. (2009) Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radical Biology & Medicine*, 46:1298–1307.
38. Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PAJ, Zacharowski K, Stewart KN, et al. (2000) Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int.*, 58:658–673.
39. Chen J, Boyle S, Zhao M, Su W, Takahashi K, et al. (2006) Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *J Am Soc Nephrol*, 17:1283–1291.
40. Chen S, Meng XF, Zhang C (2013) Role of NADPH Oxidase-Mediated Reactive Oxygen Species in Podocyte Injury. *BioMed Research International*, 2013: ID839761, 7 pages.
41. Chen Z, Zhu L, Zhen Y, Li D, Tang B, et al. (2012) Anti-proteinuric effect of sulodexide in adriamycin-induced nephropathy rats. *Lat. Am. Pharm.*, 31:963-7.
42. Chow AK, Cena J, Schulz R (2007) Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *British Journal of Pharmacology*, 152:189–205.
43. Chuang YC, Wu MS, Su YK, Fang KM (2012) Effects of olmesartan on arterial stiffness in rats with chronic renal failure. *Cardiovascular Diabetology*, 11: 66, 9 pages.
44. Craven PA, De Rubertis FR, Melhem M (1997) Nitric oxide in diabetic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.*, 60:S46-S53.
45. D'Agati V, Fogo A, Brujin J, Jennette J (2004) Pathological classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis*, 43:368-82.

46. D'Agati VD, Alster JM, Jennette JC, Thomas DB, Pullman J, et al. (2013) Association of histologic variants in FSGS clinical trial with presenting features and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*, 8:399-406.
47. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ (2011) Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*, 365:2398-2411.
48. De Boer E, Navis G, Tiebosch ATM, De Jong PE, De Zeeuw D (1999) Systemic factors are involved in the pathogenesis of proteinuria-induced glomerulosclerosis in adriamycin nephrotic rats. *J Am Soc Nephrol*, 10:2359-2366.
49. de Mik SML, Hoogduijn MJ, de Bruin RW, Dor FJMF (2013) Pathophysiology and treatment of focal segmental glomerulosclerosis: the role of animal models. *BMC Nephrology*, 14:74, 10 pages.
50. Deman A, Ceysens B, Pauwels M, Zhang J, Houte KV, et al. (2001) Altered antioxidant defence in a mouse adriamycin model of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 16:147-150.
51. Dincer Y, Sekercioglu N, Pekpak M, Gunes KN, Akcay T (2008) Assessment of DNA oxidation and antioxidant activity in hypertensive patients with chronic kidney disease. *Renal Failure*, 30:1006-1011.
52. Ding G, Reddy K, Kapasi AA, Franki N, Gibbons N et al. (2002) Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Renal Physiol*, 283:F173-F180.
53. Dobrian D, Schriver SD, Prewitt RL (2001) Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension*, 38:361-6.
54. Drabkin D, Austin H (1935) Spectrophotometric studies preparations from washed blood cells. *J Biol Chem*, 112:51-65.
55. Đukanovic L, Susic D, Jovanovic D, Varagic J, Jovanovic D, et al. (1994) Effects of captopril and hydralazine on progression of adriamycin nephropathy in spontaneously hypertensive rats. *Isr J Med Sci.*, 30:742-6.
56. Ebenezer PJ, Mariappan N, Elks CM, Haque M, Francis J (2009) Diet-induced renal changes in Zucker rats are ameliorated by the superoxide dismutase mimetic TEMPOL. *Obesity (Silver Spring)*, 17:1994-2002.

-
57. Eddy AA, Giachelli CM (1995) Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int*, 47:1546-57.
58. Elmarakby AA, Williams JM, Imig JD, Pollock JS, Pollock DM (2007) Synergistic actions of enalapril and tempol during chronic angiotensin II-induced hypertension. *Vascul Pharmacol.*, 46:144–151.
59. El-Shitany N, El-Haggar S, El-Desoky K (2008) Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46:2422-2428.
60. Erdely A, Freshour G, Maddox DA, Olson JL, Samsell L, et al. (2004) Renal disease in rats with type 2 diabetes is associated with decreased renal nitric oxide production. *Diabetologia*, 47:1672–1676.
61. Fadillioğlu E (2003) Effects of erdosteine treatment against doxorubicin-induced toxicity through erythrocyte and plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Pharmacol Res.*, 47:317–322.
62. Fliser D, Wagner KK, Loos A, Tsikas D, Haller H (2005) Chronic angiotensin ii receptor blockade reduces (intra)renal vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 16:1135-1140.
63. Forstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33:829–837.
64. Fourquet S, Guerois R, Biard D, Toledano MB (2010) Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *J Biol Chem*, 285:8463–8471.
65. Fujimoto S, Satoh M, Horike H, Hatta H, Haruna Y, et al. (2008) Olmesartan ameliorates progressive glomerular injury in subtotal nephrectomized rats through suppression of superoxide production. *Hypertens Res*, 31:305–313.
66. Fujita H, Fujishima H, Morii T, Sakamoto T, Komatsu K, et al. (2012) Modulation of renal superoxide dismutase by telmisartan therapy in C57BL/6-Ins2(Akita) diabetic mice. *Hypertens Res. Nature Publishing Group*, 35:213–220.
67. Furusu A, Miyazaki M, Abe K, Tsukasaki S, Shiohita K, et al. (1998) Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 53:1760–1768.

-
68. Galle J (2001) Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 16:2135-2137.
69. Galli LG, Volpini RA, Costa RS, da Silva CG, Coimbra TM (2001) Tubular cell lesion, albuminuria and renal albumin handling in rats treated with adriamycin. *Ren Fail*, 23:693–703.
70. Gill PS, Wilcox CS (2006) NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid Redox Signal*, 8:1597–1607.
71. Gipson DS, Gibson K, Gipson PE, Watkins S, Moxey-Mims M (2007) Therapeutic approach to FSGS in children. *Pediatr Nephrol*, 22:28–36.
72. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K (1974) Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*, 30:665-667.
73. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, et al. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126:131-138.
74. Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, et al. (2003) Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res*, 92:e80–86.
75. Hahn SM, Sullivan FJ, Deluca AM, Bacher JD, Liebmann J, et al. (1999) Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics. *Free Radical Biology & Medicine*, 27:529–535.
76. Halliwell B (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 31:261-272.
77. Han KH, Lim JM, Kim WY, Kim H, Madsen KM, et al. (2005) Expression of endothelial nitric oxide synthase in developing rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288:F694–F702.
78. Han Y, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Ikeda K, et al. (2012) Role of complement 3a in the synthetic phenotype and angiotensin II-production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 25:284-289.

-
79. Hayoz D, Rutschmann B, Genton CY, Niederberger M, Brunner HR, et al. (1993) Elastic behaviour of the carotid artery in intact spontaneously hypertensive rats. *European Heart Journal*, 14:10-13.
80. Hickson LJ, Gera M, Amer H, Iqbal CW, Moore TB, et al. (2009) Kidney transplantation for primary focal segmental glomerulosclerosis: outcomes and response to therapy for recurrence. *Transplantation*, 87:1232-1239.
81. Hoffmann S, Podlich D, Hahnel B, Wilhelm K, Norbert G (2004) Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. *J Am Soc Nephrol*, 15:1475-1487.
82. Inoue N, Takeshita S, Gao D, Ishida T, Kawashima S, et al. (2001) Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 155:45–52.
83. Jani NV, Ziogas J, Angus JA, Schiesser CH, MacDougall PE, et al. (2012) Dual action molecules: Bioassays of combined novel antioxidants and angiotensin II receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.*, 695:96–103.
84. Javaid B, Olson JL, Meyer TW (2001) Glomerular injury and tubular loss in adriamycin nephrosis. *J Am Soc Nephrol.*, 12:1391-1400.
85. Jeansson M, Bjorck K, Tenstad O, Haraldsson B (2009) Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol*, 20:114-122.
86. Jefferson JA, Alpers CE, Shankland SJ (2011) Podocyte biology for the bedside. *Am J Kidney Dis.*, 58:835–845.
87. Jefferson JA, Shankland SJ (2014) The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Adv Chronic Kidney Dis.*, 21:408–416.
88. Ji Z, Huang C, Liang C, Chen B, Chen S, et al. (2005) Protective effects of blocking renin-angiotensin system on the progression of renal injury in glomerulosclerosis. *Cell. Mol. Immunol.*, 2:150-154.
89. Jiang F (2009) NADPH oxidase in the kidney: A Janus in determining cell fate. *Kidney International*, 75:135 – 137.
90. Jovanovic D, Dimitrijevic J, Varagic J, Jovovic D, Starcevic A, et al. (1998) Effects of captopril on morphologic changes in kidney of spontaneously hypertensive rats with adriamycin nephropathy. *Ren Fail.*, 20:451-8.

91. Jovanovic D, Jovovic Đ, Mihailovic-Stanojevic N, Miloradovic Z, Naumovic R, et al. (2009) Effect of carvedilol on pulse pressure and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats with adriamycin nephropathy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63:571-576.
92. Jovanovic DB, Jovovic D, Varagic J, Dimitrijevic J, Dragojlovic Z, et al. (2002) Slowing the progression of chronic renal insufficiency with captopril in rats with spontaneous arterial hypertension and adriamycin nephropathy. *Srp Arh Celok Lek.*, 130:73–80.
93. Jovanović D, Djukanović Lj, Susić D, Funduk G, Jovanović Z, et al. (1996) The effect of captopril on the development of adriamycin nephropathy in rats with spontaneous arterial hypertension. *Srp Arh Celok Lek.*, 124:47-9.
94. Kashiwagi M, Shinozaki M, Hirakata H, Tamaki K, Hirano T, et al. (2000) Locally activated renin-angiotensin system associated with TGF- β 1 as a major factor for renal injury induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Am Soc Nephrol.*, 11:616–624.
95. Khodo SN, Dizin E, Sossauer G, Szanto I, Martin PY, et al. (2012) NADPH-oxidase 4 protects against kidney fibrosis during chronic renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 23:1967–1976.
96. Kitiyakara C, Kopp JB, Eggers P (2003) Trends in the epidemiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol*, 23:172-82.
97. Korbet SM (2012) Treatment of primary FSGS in adults. *Am Soc Nephrol*, 23:1769–1776.
98. Krishna MC, Grahame DA, Samuni A, Mitchell JB, Russo A (1992) Oxoammonium cation intermediate in the nitroxidecatalyzed dismutation of superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:5537–5541.
99. Kriz W (2003) The pathogenesis of „classic“ focal segmental glomerulosis – lessons from rat models. *Nephrol Dial Transplant*, 18:vi39-vi44.
100. Kuo KL, Tarng DC (2010) Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Adaptive Medicine*, 2:87-94.
101. Lan HY (2003) Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubules. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12:25–29.

102. Lassegue B, Griendling KK (2004) Reactive oxygen species in hypertension: An update. *Am J Hypertens.*, 17:852–860.
103. Lee SK, Arunkumar S, Sirajudeen KNS, Singh HJ (2010) Glutathione system in young spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Biochem*, 66:321–327.
104. Lee VWS, Harris DCH (2011) Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*, 16:30–38.
105. Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG (2000) Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *Am Soc Nephrol*, 11:574–581.
106. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-75.
107. Luan J, Li W, Han J, Zhang W, Gong H, et al. (2012) Renal protection of *in vivo* administration of tempol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Sci.*, 119:167–176.
108. Luo Z, Chen S, Welch WJ, Andersen BT, Jose PA et al. (2009) Comparison of inhibitors of superoxide generation in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 157:935-943.
109. Lynch TL, Sivaguru M, Velayutham M, Cardounel AJ, Michels M, et al. (2015) Oxidative Stress in Dilated Cardiomyopathy Caused by MYBPC3 Mutation. *Oxid Med Cell Longev.*, 2015:1–14.
110. Majzunova M, Dovinova I, Barancik M, Chan JYH (2013) Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *Journal of Biomedical Science*, 20:69, 10 pages.
111. Malarkodi KP, Balachandar AV, Varalakshmi P (2003) The influence of lipoic acid on adriamycin-induced hyperlipidemic nephrotoxicity in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 247:139-145.
112. Manabe M, Kinoshita A, Yamaguchi M, Furuya Y, Nagano N, et al. (2000) Changes in quantitative profile of extracellular matrix components in the kidneys of rats with adriamycin-induced nephropathy. *J. Vet. Med. Sci.*, 63:125-133.
113. Manning Jr RD, Tian N, Meng S (2005) Oxidative Stress and Antioxidant Treatment in Hypertension and the Associated Renal Damage. *Am J Nephrol*, 25:311–317.
114. Mazroa SA, Asker SA, El-Shafey S (2009) Immunohistochemical Distribution of Inducible Nitric Oxide Synthase Enzyme (iNOS) in the Renal Cortex of Control and

- Diabetic Adult Male Albino Rats and the Effect of iNOS Inhibition by Aminoguanidine. *Egypt. J. Histol.*, 32:235–45.
115. McBride AG, Borutaité V, Brown GC (1999) Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. *Biochim Biophys Acta—Mol Basis Dis.*, 1454:275–288.
116. McCord JM, Fridovich I (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*, 244:6056-6063.
117. Meenakshi SR, Agarwal R (2013) Nitric oxide levels in patients with chronic renal disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.*, 7:1288-1290.
118. Meenakshi Sundaram SP, Nagarajan S, Manjula Devi AJ (2014) Chronic Kidney Disease—Effect of Oxidative Stress. *Chinese Journal of Biology*, 2014:ID 216210, 6 pages.
119. Mendoza MGA, Castillo-Henkel C, Medina-Santillan R, Jarillo Luna RA, Robles HV, et al. (2008) Kidney damage after renal ablation is worsened in endothelial nitric oxide synthase (-/-) mice and improved by combined administration of L-arginine and antioxidants. *Nephrology*, 13:218–27.
120. Mihailović-Stanojević N (2002) Posledice blokade receptora endotelina i sistema renin-angiotenzin u progresivnoj bubrežnoj insuficijenciji kod starih spontano hipertenzivnih pacova. Magistarski rad, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
121. Mihailović-Stanojević N (2005) Uloga sistema renin-angiotenzin u patogenezi fokalno-segmentne glomeruloskleroze kod spontano hipertenzivnih pacova. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
122. Mihailović-Stanojević N, Jovović D, Miloradović Z, Grujić-Milanović J, Jerkić M, et al. (2009) Reduced progression of adriamycin nephropathy in spontaneously hypertensive rats treated by losartan. *Nephrol Dial Transplant*. 24:1142–1150.
123. Milic VD, Stankov K, Injac R, Djordjevic A, Srdjenovic B, et al. (2009) Activity of antioxidative enzymes in erythrocytes after a single dose administration of doxorubicin in rats pretreated with fullereneol C(60)(OH)(24). *Toxicol Mech Methods*, 19:24–8.

124. Misiti F, Giardina B, Mordente A, Clementi ME (2003) The secondary alcohol and aglycone metabolites of doxorubicin alter metabolism of human erythrocytes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36:1643–1651.
125. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW Jr. (1999) Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol*, 277:F437-F446.
126. Molina C, Kissner R, Koppenol WH (2013) Decomposition kinetics of peroxynitrite: influence of pH and buffer. *Dalton Trans*, 42:9898-9905.
127. Mount PF, Power DA (2006) Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol*, 187:433–446.
128. Muller V, Tain YL, Croker B, Baylis C (2010) Chronic nitric oxide deficiency and progression of kidney disease after renal mass reduction in the C57Bl6 mouse. *Am J Nephrol.*, 32:575–80.
129. Mundel P, Shankland S (2002) Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol*, 13:3005-3015.
130. Munoz M, Rincon J, Pedreanez A, Viera N, Hernandez-Fonseca JP, et al. (2011) Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by adriamycin. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 12:404-412.
131. Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, Heinig M, Clarke T, et al. (2007) Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.*, 18:539–550.
132. Nakayama T, Sato W, Kosugi T, Zhang L, Campbell-Thompson M, et al. (2009) Endothelial injury due to eNOS deficiency accelerates the progression of chronic renal disease in the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296:F317–F327.
133. Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM (2013) Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxid. Redox Signal.* 19:1110–1120.
134. Nistala R, Whaley-Connell A, Sowers JR (2008) Redox control of renal function and hypertension. *Antioxid Redox Signal.*, 10: 2047–2089.
135. Nlandu-Khodo S, Dissard R, Hasler U, Schafer M, Pircher H et al. (2016) NADPH oxidase 4 deficiency increases tubular cell death during acute ischemic reperfusion injury. *Sci. Rep.* 6, 38598.

136. Offer T, Russo A, Samuni A (2000) The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD. *The FASEB Journal*, 14:1215-1223.
137. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95:351-358.
138. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, et al. (2001) Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:29596–29602.
139. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S, et al. (1986) Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney International*, 29:502-510.
140. Okuda S, Tsuruda H, Onoyama K, Oh Y, Motomura K, et al. (1986a) Effect of hypertension on the progress and prognosis of experimental focal glomerular sclerosis. *Clin Sci.*, 71:23-29.
141. Ozen S, Usta Y, Sahin-Erdemli I, Orhan D, Gumusel B, et al. (2001) Association of nitric oxide production and apoptosis in a model of experimental nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 16:32-38.
142. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.*, 87:315–424.
143. Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70:158-169.
144. Paravicini TM, Touyz RM (2006) Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.*, 71:247-58.
145. Pardon A, Audard V, Caillard S, Moulin B, Desvaux D, et al. (2006) Risk factors and outcome of focal and segmental glomerulosclerosis recurrence in adult renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*, 21:1053-1059.
146. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, Durvasula RV, Hauser PV, et al. (2008) Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296:F213-F229.
147. Qin XJ, He W, Hai CX, Liang X, Liu R (2008) Protection of multiple antioxidants Chinese herbal medicine on the oxidative stress induced by adriamycin chemotherapy. *J. Appl. Toxicol.*, 28:271–282.

148. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramirez-Tortosa MC (2002) Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*, 180:79–95.
149. Rabkin SW, Ohmae M (1982) Effects of doxorubicin (adriamycin) on systemic hemodynamics and myocardial blood flow. *Pharmacology*, 25:272-277.
150. Raij L, Baylis C (1995) Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int.*, 48:20-32.
151. Rangan GK, Wang Y, Harris DCH (2001) Pharmacologic modulators of nitric oxide exacerbate tubulointerstitial inflammation in proteinuric rats. *J Am Soc Nephrol.*, 12:1696–1705.
152. Rashikh A, Pillai KK, Ahmad SJ, Akhtar M, Najmi AK (2012) Aliskiren alleviates doxorubicin-induced nephrotoxicity by inhibiting oxidative stress and podocyte injury. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 14:14-22.
153. Ray R, Murdoch CE, Wang M, Santos CX, Zhang M, et al. (2011) Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 31:1368-1376.
154. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.*, 26:1231–1237.
155. Reidy K, Kaskel FJ (2007) Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*, 22:350-354.
156. Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P (2005) The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int*, 68:57-65.
157. Remuzzi G, Zoja C, Remuzzi A, Rossini M, Battaglia C, et al. (1985) Low-protein diet prevents glomerular damage in adriamycin-treated rats. *Kidney International*, 28:21-27.
158. Rennke HG (1994) How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? *Kidney Int. Suppl*, 45:S58-S63.
159. Robinson KM, Beckman JS (2005) Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide. *Methods in Enzymology*, 396:207-214.
160. Rocznik A, Fryer JN, Levine DZ, Burns KD (1999) Downregulation of neuronal nitric oxide synthase in the rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol.*, 10:704–713.

161. Romero JC, Reckelhoff JF (1999) Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension*, 34:943-949.
162. Roson MI, Della Penna SL, Cao G, Gorzalczany S, Pandolfo M, et al. (2010) Different protective actions of losartan and tempol on the renal inflammatory response to acute sodium overload. *J. Cell. Physiol.*, 224:41–48.
163. Ruan XY, Varghese Y, Moorhead JF (2009) An update on the lipid nephrotoxicity hypothesis. *Nat. Rev. Nephrol.*, 5:713-721.
164. Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, Vaziri ND (2013) Targeting the transcription factor Nrf-2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney International*, 83:1029–1041.
165. Sachse A, Wolf G (2007) Angiotensin II–Induced Reactive Oxygen Species and the Kidney. *J Am Soc Nephrol*, 18:2439–2446.
166. Sainz J, Wangenstein R, Gómez IR, Moreno JM, Chamorro V, et al. (2005) Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am J Hypertens.*, 18:871–877.
167. Saito K, Takeshita K, Ueda J, Ozawa T (2003) Two reaction sites of a spin label, TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl), with hydroxyl radical. *J Pharm Sci*, 92:275-280.
168. Sakairi T, Hiromura K, Yamashita S, Takeuchi S, Tomioka M et al. (2007) Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney International*, 72:307–318.
169. Satoh M, Fujimoto S, Arakawa S, Yada T, Namikoshi T et al. (2008) Angiotensin II type 1 receptor blocker ameliorates uncoupled endothelial nitric oxide synthase in rats with experimental diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 23:3806-3813.
170. Schmidt HH, Warner TD, Nakane M, Forstermann U, Murad F (1992): Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthases in RAW264.7 macrophages. *Mol Pharmacol* 41:615-624.
171. Schmidt RJ, Baylis C (2000) Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int.*, 58:1261–1266.
172. Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS (1998) Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*, 32:59–64.

-
173. Schnaper HW (2003) Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Sem Nephrol*, 23:183–193.
174. Schroder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquet R, et al. (2012) Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res.*, 110:1217-1225.
175. Schwartz MM (2000) The role of podocyte injury in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Ren Fail.*, 22:663-684.
176. Schwimmer JA, Markowitz GS, Valeri A, Appel GB (2003) Collapsing glomerulopathy. *Semin Nephrol*, 23:209-218.
177. Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hébert RL (2013) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *J Am Soc Nephrol.*, 24:1512–8.
178. Shankland S (2006) The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney International*, 69:2131-2147.
179. Shu Y, Hoshi S, Tomari S, Watanabe T, Nagata M (2002) Phenotypic changes and cell activation in early tubulointerstitial injury of rat adriamycin nephrosis. *Pathol Int*, 52:214–223.
180. Singel KL, Segal BH (2016) Nox2-dependent regulation of inflammation. *Clin Sci (Lond).*, 130:479–490.
181. Siragy HM, de Gasparo M, Carey RM (2000) Angiotensin type 2 receptor mediates valsartan-induced hypotension in conscious rats. *Hypertension*, 35:1074-1077.
182. Smith C, Merchant M, Fekete A, Nyugen HL, Oh P, et al. (2009) Splice variants of neuronal nitric oxide synthase are present in the rat kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 24:1422–1428.
183. Sozeri B, Mir S, Mutlubas F, Sen S (2010) The long-term results of pediatric patients with primary focal and segmental glomerulosclerosis. *Saudi J Kidney Dis Transpl.*, 21:87-92.
184. Sun YBY, Qu X, Zhang X, Caruana G, Bertram JF, et al. (2013) Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy. *PLoS One*, 8:1-12.

-
185. Sung CC, Hsu YC, Chen CC, Lin YF, Wu CC (2013) Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: ID 301982, 15 pages.
186. Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW (1995) In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats: hydroethidine microfluorography. *Hypertension*, 25:1083–1089.
187. Szabo AJ, Wagner L, Erdely A, Lau K, Baylis C (2003) Renal neuronal nitric oxide synthase protein expression as a marker of renal injury. *Kidney Int.*, 64:1765–1771.
188. Tain ZL, Freshour G, Dikalova A, Griendling K, Baylis C (2007) Vitamin E reduces glomerulosclerosis, restores renal neuronal NOS, and suppresses oxidative stress in the 5/6 nephrectomized rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 292:F1404–F1410.
189. Takahashi T, Harris RC (2014) Role of endothelial nitric oxide synthase in diabetic nephropathy: lessons from diabetic eNOS knockout mice. *J. Diabetes Res.*, 2014:ID 590541, 17 pages.
190. Tan RJ, Zhou D, Xiao L, Zhou L, Li Y, et al. (2015) Extracellular Superoxide Dismutase Protects against Proteinuric Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.*, 26:2447–2459.
191. Touyz RM, Montezano AC (2012) Vascular Nox4: A Multifarious NADPH. *Oxidase. Circ Res.*, 110:1159–1161.
192. Trejo EMAG, Buendia ASA, Reyes OS, Arroyo FEG, Garsia RA, et al. (2017) The beneficial effects of allicin in chronic kidney disease are comparable to losartan. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1980, 19 pages.
193. Tvete S, Hope A, Elsayed EA, Clausen G (1982) Effect of adriamycin on blood flow in renal tumour and normal renal tissue. *Eur J Cancer Clin Oncol.*, 18:565–571.
194. Van Beneden K, Van Grunsven LA, Geers C, Pauwels M, Desmouliere A, et al. (2008) CRBP-I in the renal tubulointerstitial compartment of healthy rats and rats with renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*, 23:3464–71.
195. Van den Branden C, Ceyskens B, De Craemer D, Pauwels M, Vanden Houte Ket al. (2000) Renal antioxidant enzymes and fibrosis-related markers in the rat adriamycin model. *Nephron*, 86:167–175.

-
196. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK (2003) Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney International*, 63:179-185.
197. Vaziri ND, Liang K, Ding Y (1999) Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney International*, 56:1492-1498.
198. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R (2002) Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension*, 39:135-141.
199. Vaziri ND, Ni Z, Wang XQ, Oveisi F, Zhou XJ (1998) Down regulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH. *Am J Physiol*, 274:F642-F649.
200. Viswanatha Swamy AHM, Wangikar U, Koti BC, Thippeswamy AHM, Ronad PM, et al. (2011) Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 43:507-511.
201. Wang N, Wei R, Li P, Li Q, Yang X, et al. (2016) Treatment with irbesatan may improve slit diaphragm alterations in rats with adriamycin-induced nephropathy. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 17:1-10.
202. Wanless RB, Anand IS, Poole-Wilson PA, Harris P (1987) An experimental model of chronic cardiac failure using adriamycin in the rabbit: central haemodynamics and regional blood flow. *Cardiovasc Res.*, 21:7-13.
203. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L (1990) Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin. Chem.*, 36:15-19.
204. Whaley-Connell A, Habibi J, Nistala R, Cooper SA, Karuparthi PR, et al. (2008) Attenuation of NADPH oxidase activation and glomerular filtration barrier remodeling with statin treatment. *Hypertension*, 51:474-480.
205. Whaley-Connell A, Nistala R, Habibi J, Hayden MR, Schneider RI, et al. (2010) Comparative effect of direct renin inhibition and AT1R blockade on glomerular filtration barrier injury in the transgenic Ren2 rat. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 298:F655-F661.
206. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, et al. (2005) Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte

- depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol*, 16:2941-52.
207. Wiggins RC (2007) The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular disease. *Kidney Int*, 71:1205-14.
208. Wilcox CS (2010) Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther. Elsevier Inc.*, 126:119–145.
209. Wilcox CS, Pearlman A (2008) Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol rev*, 60:418-469.
210. Yagmurca M, Erdogan H, Iraz M, Songur A, Ucar M, et al. (2004) Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clin Chim Acta.*, 348:27–34.
211. Yan C, Kim D, Aizawa T, Berk BC (2003) Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 23:26-36.
212. Yanes L, Romero D, Iliescu R, Cucchiarelli VE, Fortepiani LA, et al. (2004) Systemic arterial pressure response to two weeks of tempol therapy in SHR: involvement of NO, the RAS, and oxidative stress. *Am J Physiol Regul Inter Comp Physiol*, 288:R903-R908.
213. Yang W, Wang J, Shi L, Yu L, Qian Y, et al. (2012) Podocyte injury and overexpression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta 1 in adriamycin-induced nephropathy in rats. *Cytokine*, 59:370-376.
214. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Alpers CE, Giachelli CM, et al. (1995) Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*, 48:439–448.
215. Zhang J, Clark JR Jr., Herman EH, Ferrans VJ (1996) Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J Mol Cell Cardiol.*, 28:1931-1943.
216. Zhang WJ, Wei H, Frei B (2009) Genetic deficiency of NADPH oxidase does not diminish, but rather enhances, LPS-induced acute inflammatory responses in vivo. *Free Radic Biol Med. Elsevier Inc.*, 46:791–798.
217. Zima T, Tesar V, Crkovska J, Stejskalova A, Platenik J, et al. (1998) ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrol Dial Transplant*, 13:1975-1979.

218. Zou J, Yaoita E, Watanabe Y, Yoshida Y, Nameta M, et al. (2006) Upregulation of nestin, vimentin, and desmin in rat podocytes in response to injury. *Virchows Arch.*, 448: 85–492.
219. Životić M, Bogdanović R, Peco-Antić A, Paripović D, Stajić N, et al. (2015) Glomerular nestin expression: possible predictor of outcome of focal segmental glomerulosclerosis in children. *Pediatr Nephrol*, 30:79-90.

PRILOZI

BIOGRAFIJA AUTORA

Danijela J. Karanović rođena je 05. novembra 1982. godine u Zadru, Republika Hrvatska. Nakon završave IX gimnazije „Mihailo Petrović Alas“ u Beogradu, školske 2001/02. godine upisala je studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, studijski program Opšta biologija. Diplomirala je maja 2010. godine sa prosečnom ocenom tokom studija 9,21. Doktorske studije upisala je 2010. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Animalna i humana fiziologija. Položila je sve programom predviđene ispite.

Danijela Karanović zaposlena je u Institutu za medicinska istraživanja u Grupi za kardiovaskularnu fiziologiju od 01.01.2011. godine kao istraživač pripravnik, a od 2013. godine kao istraživač saradnik. Uključena je u rad na projektu osnovnih istraživanja pod nazivom „Ispitivanje antihipertenzivnog i renoprotektivnog potencijala supstanci prirodnog i sintetskog porekla u eksperimentalnim modelima kardiovaskularnih i bubrežnih oboljenja“, OI 175096 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Angažovana je u periodu 2012.-2013. godine na projektu naučno-tehnološke saradnje sa privredom pod nazivom „Realizacija seta eksperimentalnih studija primene uređaja Vitafon-T na pacovima soja Wistar i pacovima sa urođenom hipertenzijom“, u okviru poslovno-tehničke saradnje sa Društvom za proizvodnju, promet i usluge FIP KOMERC d.o.o.

U svom dosadašnjem radu Danijela Karanović publikovala je ukupno 37 bibliografskih jedinica, od čega je 10 publikacija objavljeno u celini, a koautor je brojnih saopštenja sa međunarodnih i domaćih naučnih skupova. Dobitnik je nagrade za naučnoistraživački rad mladog istraživača “Dr Vera i Dušan Kentera“ i nagrade za naučnoistraživački rad „Dr Jovan Vučo“ dodeljenih od strane Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu za 2016. godinu. Evropsko društvo za hipertenziju (European Society of Hypertension, ESH) dodelilo je Danijeli Karanović grant za učešće na skupu *Joint Meeting ESH-ISH Hypertension*, održanom 13.-16. juna 2014. godine u Atini, Grčka i na *22th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection*, u periodu 26.-29. aprila 2012. godine u Londonu, Velika Britanija.

Član je Društva fiziologa Srbije (DFS), Internacionalnog društva za patofiziologiju (International Society for Pathophysiology, ISP), Federacije evropskih fizioloških

društava (Federation of European Physiological Societies, FEPS) i Društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju (SMDSRF).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Данијела Карановић

Број индекса В3044/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекти хроничне примене лосартана и темпола у експерименталном моделу
фокално сегментне гломерулосклерозе код спонтано хипертензивних пацова

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 7.6.2018.

Карановић Данијела

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Данијела Карановић

Број индекса В3044/2010

Студијски програм Биологија – Анимална и хумана физиологија

Наслов рада Ефекти хроничне примене лосартана и темпола у
експерименталном моделу фокално сегментне гломерулосклерозе код спонтано
хипертензивних пацова

Ментор др Јелица Грујић Милановић и Проф. др Јелена Ђорђевић

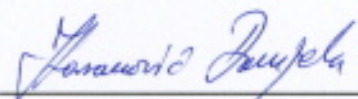
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 7.6.2018.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Ефекти хроничне примене лосартана и темпола у експерименталном
моделу фокално сегментне гломерулосклерозе код спонтано
хипертензивних пацова

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

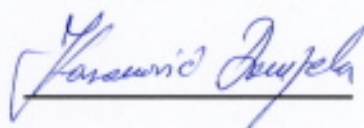
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 7.6.2018.



1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.