



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Томислав С. Николић

**Ефекти акутног оштећења бубрега  
нефротоксичним агенсима на функцију  
миокарда пацова**

докторска дисертација

Крагујевац, 2022.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Tomislav S. Nikolić

**Efekti akutnog oštećenja bubrega  
nefrotoksičnim agensima na funkciju miokarda  
pacova**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Tomislav S. Nikolic

**The effects of acute kidney injury induced by  
nephrotoxic agents on myocardial function in  
rats**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022.

<b>I Аутор</b>
Име и презиме: Томислав Николић
Датум и место рођења: 03.04.1980. године, Крагујевац
Садашње запошљење: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b>II Докторска дисертација</b>
Наслов: Ефекти акутног оштећења бубрега нефротоксичним агенсима на функцију миокарда пацова
Број страница: 99
Број слика: 4 слике, 21 графикон, 6 табела
Број библиографских података: 120
Установа и место где је рад израђен: Институт за физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Србија.
Научна област (УДК): Медицина
<b>Ментор:</b> Проф. др Дејан Петровић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
<b>III Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве тезе: 26.10.2016. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-133/18, 08.02.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф. др Драган Јовановић, редовни професор факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, председник;</li> <li>2. Проф. др Зорица Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан;</li> <li>3. Доц. др Владимир Живковић, доцент факултета медицинских наука у Крагујевцу Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;</li> </ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране дисертације:

<b>I Autor</b>
Ime i prezime: Tomislav Nikolić
Datum i mesto rođena: 03.04.1980. godine, Kragujevac
Sadašnje zapošljenje: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
<b>II Doktorska disertacija</b>
Naslov: Efekti akutnog oštećenja bubrega nefrotoksičnim agensima na funkciju miokarda pacova
Broj stranica: 99
Broj slika: 4 slike, 21 grafikon, 6 tabela
Broj bibliografskih podataka: 120
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Institut za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Srbija.
Naučna oblast (UDK): Medicina
<b>Mentor:</b> prof. dr Dejan Petrović, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
<b>III Ocena i odbrana</b>
Datum prijave teze: 26.10.2016. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske /umetničke disertacije: IV-03-133/18, 08.02.2017. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
1. Prof. dr Dragan Jovanović, redovni profesor fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Interna medicina, predsednik;
2. Prof. dr Zorica Jovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Patološka fiziologija, član;
3. Doc. dr Vladimir Živković, docent fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član;
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:
Datum odbrane disertacije:

<b>I Autor</b>
Name and surname: Tomislav Nikolic
Date and place of birth: 03.04.1980. Kragujevac
Current employment: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>II Doctoral Dissertation</b>
Title: The effects of acute kidney injury induced by nephrotoxic agents on myocardial function in rats
No. of pages: 99
No. of images: 4 pictures, 21 figures, 6 tables
No. of bibliographic data: 120
Institution and place of work: Institute for Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
<b>Mentor:</b> Prof. Dejan Petrovic, Full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>III Grade and Dissertation Defense</b>
Topic Application Date: 26.10.2016.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: : IV-03-133/18, 08.02.2017.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prof. dr Dragan Jovanovic, Full professor of Faculty of Medicine of Military Medical academy, University of Belgrade, president</li> <li>2. Prof. dr Zorica Jovanovic, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Pathological physiology, member</li> <li>3. Prof. dr Vladimir Zivkovic, Docent of Faculty of Medical Science, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Physiology, member</li> </ol>
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:
Date of Dissertation Defense:

## САЖЕТАК

Циљ овог истраживања је да испита утицај акутног оштећења бубрега изазваног нефротоксичним агесима: гентамицином, диклофеном и фолном киселином на функцију миокарда и инфламацијско-оксидациони статус пацова. Истраживање је обухватило 100 пацова Wistar albino соја мушког пола старости 6 недеља, просечне телесне масе око 200 грама. Пацови су подељени у три експерименталне групе од којих је свака третирана различитим нефротоксичним агенсом: диклофеном, гентамицином и фолном киселином и контролну која је третирана физиолошким раствором. Након експерименталног третмана и жртвовања спроведена су испитивања на изолованом срцу методом по *Langendorff*-у праћењем параметара срчане функције:  $dp/dt$  max,  $dp/dt$  min, SLVP, DLVP, HR и CF, док су спектрофотометријским методама у ефлуенту и плазми одређени параметри оксидационог стреса (TBARS,  $NO_2^-$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) и у лизату еритроцита параметри антиоксидационе заштите (CAT, SOD, GSH). *ELISA* методом у плазми одређени су биомаркери инфламације (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6). Резултати ове студије показују да акутно оштећење бубрега утиче на кардијалну хемодинамику, системска и кардијална оксидацијска својства као и на системску инфламацију и помаже у расветљавању ефеката акутног оштећења бубрега на функцију и редокс потенцијал кардиоваскуларног система.

**Кључне речи:** акутно оштећење бубрега, изоловано срце пацова, кардиоваскуларни систем, оксидациони стрес, инфламација

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to examine the effect of acute kidney injury caused by nephrotoxic agents: gentamicin, diclofenac and folic acid on myocardial function and the inflammatory-oxidative status of rats. The study included 100 six week old male Wistar albino rats, with an average body weight about 200 grams. Rats were divided into three experimental groups, each of them were treated with a different nephrotoxic agent: diclofenac, gentamicin and folic acid, and a control group treated with saline. After experimental treatment and sacrifice, studies on the isolated heart were performed by the Langendorff method by monitoring the parameters of cardiac function:  $dp / dt$  max,  $dp / dt$  min, SLVP, DLVP, HR and CF. The parameters of oxidative stress (TBARS, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in effluent and plasma were determined by spectrophotometric methods as well as parameters of antioxidant protection (CAT, SOD, GSH) in erythrocyte lysate. Biomarkers of inflammation in plasma (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) were determined by ELISA method. The results of this study show that acute renal impairment affects cardiac hemodynamics, systemic and cardiac oxidative properties as well as systemic inflammation and helps to elucidate the effects of acute renal impairment on the function and redox potential of cardiovascular system.

**Key words:** acute kidney injury, isolated rat heart, cardiovascular system, oxidative stress, inflammation



## Садржај

1. УВОД .....	1
1.1. Акутно оштећење бубрега .....	2
1.2. Етиопатогенеза акутног оштећења бубрега .....	2
1.3. Акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима – лековима .....	4
1.3.1. Акутно оштећење бубрега изазвано гентамицином .....	5
1.3.2. Акутно оштећење бубрега изазвано диклофеном .....	5
1.3.3. Акутно оштећење бубрега изазвано фолном киселином .....	6
1.4. Утицај акутног оштећења бубрега на срце и његову функцију – Кардио-ренални синдром тип 3 .....	6
1.4.1. Патофизиолошки механизми кардио-реналног синдрома тип 3 .....	6
1.5. Оксидациони стрес .....	8
1.5.1. Дефиниција .....	8
1.5.2. Реактивне врсте кисеоника (ROS) .....	9
1.5.3. Механизми антиоксидационе заштите .....	9
1.5.4. Улога оксидационог стреса у акутном и хроничном оштећењу бубрега .....	10
1.5.5. Акутно оштећење бубрега и инфламација .....	11
1.6. Експериментални модели акутног оштећења бубрега .....	13
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА .....	15
2.1. Општи циљ: .....	16
2.2. Специфични циљеви: .....	16
2.3. Хипотезе .....	16
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	17
3.1. Испитивана популација .....	18
3.2. Експериментални протокол .....	18
3.2.1. Изоловање и припрема срца .....	18
3.2.2. Модел изоловане ретроградне перфузије по Langendorff-у .....	19
3.3. Биохемијске анализе .....	20
3.3.1. Одређивање јонограма ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ) и биохемијских показатеља функције бубрега пацова у серуму .....	20
3.3.2. Одређивање биохемијских маркера оксидационог стреса у узорцима крви .....	20
3.3.3. Одређивање ензима антиоксидационе заштите у прикупљеним узорцима крви .....	21
3.3.4. Одређивање ензима антиоксидационе заштите у узорцима коронарног ефлуента .....	21
3.4. Хистопатолошка анализа срца и бубрега пацова .....	22
3.4.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E) .....	22
3.5. Статистичка обрада података .....	23
4. РЕЗУЛТАТИ .....	24
4.0. Утицај примене фолне кисеине, диклофена и гентамицина на параметре бубрежне функције .....	25
4.1. Кардиодинамски параметри и коронарни проток .....	25

4.1.1. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова .....	25
4.1.2. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова .....	27
4.1.3. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова .....	29
4.1.4. Контролна група .....	31
4.1.5. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на максималну стопу промене притиска леве коморе (dp/dt max) изолованог срца пацова .....	33
4.1.6. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на минималну стопу промене притиска леве коморе (dp/dt min).....	35
4.1.7. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на систолни притисак леве коморе (SLVP) .....	36
4.1.8. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на дијастолни притисак леве коморе (DLVP) .....	38
4.1.9. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на срчану фреквенцу (HR) .....	39
4.1.10. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на коронарни проток (CF).....	41
4.2. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, фолном киселином, гентамицином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту .....	43
4.2.1. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту .....	43
4.2.2. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на параметре оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова.....	45
4.2.3. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на параметре оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова .....	47
4.2.4. Контролна група .....	49
4.2.5. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова.....	51
4.2.5.1. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на супероксид анион радикала ( $O_2^-$ ) изолованог срца пацова у ефлуенту.....	51
4.2.5.2. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на индекс липидне пероксидације (TBARS) у ефлуенту изолованог срца пацова.....	52
4.2.5.3. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) у ефлуенту изолованог срца пацова .....	54
4.2.5.4. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на ниво нитрита ( $NO_2^-$ ) у ефлуенту изолованог срца пацова.....	56
4.2.6. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре оксидационог стреса у плазми .....	57

4.2.7. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита .....	59
4.3. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре системске инфламације у плазми .....	62
4.3.1 Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре системске инфламације у плазми .....	62
4.4. Ефекти акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на грађу органа пацова.....	64
4.4.1. Ефекти акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на грађу срца и бубрега пацова .....	64
5. ДИСКУСИЈА.....	67
5.1. Акутно оштећење бубрега и морфолошке промене изолованог срца и бубрега.....	68
5.2. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на хемодинамске параметре изолованог срца пацова .....	69
5.3. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на оксидационистатус пацова .....	71
5.4. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре системске инфламације у плазми .....	73
6. ЗАКЉУЧЦИ .....	74
7. ЛИТЕРАТУРА.....	76

# **1. УВОД**

## 1.1. Акутно оштећење бубрега

Акутно оштећење бубрега (АОБ) је широк клинички ентитет који обухвата разноврсне и често преклапајуће патофизиолошке механизме са хетерогеним функционалним и морфолошким карактеристикама. Акутно оштећење бубрега представља нагло, унутар 48 сати потенцијално реверзибилно смањење бубрежне функције које се манифестује или апсолутним повећањем серумске концентрације креатинина за  $\geq 26.4 \mu\text{mol/l}$  или процентуалним повећањем серумске концентрације креатинина на  $\geq 150\%$  или смањењем излучивања урина - олигурија са диурезом  $\leq 0.5 \text{ ml/kg/h}$  за најмање 6 h. Наведена дефиниција акутног оштећења бубрега предложена је о стране KDIGO удружења (*Kidney Diseases: Improving Global Outcomes*) и садржи RIFLE (енгл. *Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage kidney disease*) и AKIN (енгл. *Acute Kidney Injury Network*) стадијумске критеријуме (1).

Дијагностички критеријуми за акутно оштећење бубрега ослањају се на функционалне маркере бубрежне активности, као што је јачина гломерулске филтрације (ЈФ) и диуреза (2). У свакодневној клиничкој пракси користи се повећање концентрације серумског креатинина као показатељ смањења ЈФ. Повезаност серумског креатинина и ЈФ није линеарна тако да вредности серумског креатинина расту при знатном смањењу ЈФ (3).

Епидемиолошки подаци указују на пораст инциденце акутног оштећења бубрега у периоду од 1998. до 2005. године (4). Према подацима из здравствених база података преваленца акутног оштећења бубрега у болницама Америке износи 2%. Ипак треба напоменути да је забележен пад инциденце акутног оштећења бубрега у пацијената са акутним инфарктом миокарда у периоду од 2000. до 2008. године упркос порасту фактора ризика. Разлог за овај податак лежи у повећаној свести о самој болести и ефикаснијој превенцији. Разлике у инциденци су последица различитих клиничких услова: болнички и ванболнички услови, јединице интензивног лечења, што уједно и ограничава многобројне студије и показује да је права инциденца акутног оштећења бубрега још увек непозната (5).

За разлику од развијених, епидемиологија акутног оштећења бубрега у неразвијеним земљама није најбоље дефинисана због касног пријема пацијената у терцијарне установе, непријављивања и смањеног капацитета јединица интензивног лечења за тешко болесне пацијенте (6). Акутно оштећење бубрега чини око 3 % пријема у општим здравственим установама у неразвијеним земљама (7). Према проспективним студијама спроведеним у Индији, 2008. и 2010. године инциденца акутног оштећења бубрега у болничким одељењима износи 5-9% и 25-36% у педијатријским јединицама интензивног лечења (8, 9).

## 1.2. Етиопатогенеза акутног оштећења бубрега

Узроци акутног оштећења бубрега се традиционално групишу у три категорије: преренални, ренални и постренални. Стога се и акутно оштећење бубрега може поделити на преренално, ренално и постренално (10). Преренално настаје као последица смањеног ефективног циркулишућег волумена и реналне перфузије, постренално обухвата опструктивну уропатију док ренално подразумева интритичне, унутрашње, реналне поремећаје. Ренално акутно оштећење бубрега може настати као последица гломерулских болести, као што је имунски посредован гломерулонефритис, у најмањем броју случајева, затим тубуларних или тубуло-интерстицијских поремећаја као што је акутни интерстицијални нефритис и акутна тубулска некроза (АТН) - најчешћи узрочник акутног оштећења бубрега. Такође може настати и као последица примарно измењене реналне хемодинамике, као што је случај у сепси или завршној

фази инсуфицијенције јетре - хепаторенални синдром. Оштећење бубрега изазвано токсичним агенсима, укључујући и лековима, сврстава се превасходно у тубуло-интерстицијске поремећаје бубрега тј. у ренално оштећење бубрега. Табела 1 (11).

Табела 1. Етиологија и подела акутног оштећења бубрега

Категорија	Абнормалност	Могући узроци
<b>Преренално</b>	Хиповолемија	Хеморагија Деплеција волумена Губитак течности путем бубрега (прекомерна диуреза) Губитак течности у трећи простор (опекотине, перитонитис)
	Оштећена срчана функција	Конгестивна срчана инсуфицијенција Акутни инфаркт миокарда Масивна плућна емболија
	Системска вазодилатација	Антихипертензивни лекови Грам негативна бактеријемиија Цироза јетре Анафилакса
	Повећана васкуларна резистенција	Анестезија Хирургија Хепаторенални синдром НСАИ лекови лекови који изазивају реналну вазоконстрикцију ( <i>нпр. Циклоспорин</i> )
<b>Ренално</b>	Тубуларна	Ренална исхемија ( <i>шок, трауме, хеморагије, панкреатитис, трудноћа</i> ) Нефротоксични лекови ( <i>антибиотици, антинеопластични лекови, органски растварачи, јодна контрастна средства, тешки метали</i> ) Ендогени токсини ( <i>миоглобин, хемоглобин, урична киселина</i> )
	Гломеруларна	Акутни постинфективни гломерулонефритис Лупус нефритис IgA нефропатија Инфективни ендокардитис Goodpasture синдром Wegener-ова болест
	Интерстицијумска	Инфекције ( <i>бактеријске, вирусне</i> ) Лекови ( <i>антибиотици, диуретици, НСАИЛ...</i> )

	Васкуларна	Велики крвни судови ( <i>билатерална стеноза реналних артерија, билатерална тромбоза реналних вена</i> ) Мали крвни судови ( <i>васкулитиси, малигна хипертензија, хемолитно-уремички синдром, атеросклероза, ТТП</i> )
<b>Постренално</b>	Екстраренална опструкција	Хиперплазија простате Неправилно пласиран катетер Тумори бешике, простате, цервикса Ретроперитонеална фиброза
	Интраренална опструкција	Нефролитијаза Крвни угрушци Папиларна некроза

*НСАИЛ- нестероидни антиинфламаторни лекови, ТТП- тромботична тромбоцитопенијска пурпура*

Патохистолошки налаз у акутном оштећењу бубрега креће се од нормалног преко сублеталног оштећења и апоптозе све до акутне тубулске некрозе. Акутна тубулска некроза се једноставно може дефинисати као појава некрозе тубула. Дуго се мислило да су акутно оштећење бубрега и акутна тубулска некроза синоними, међутим доказано је да АОБ може постојати и без акутне тубулске некрозе (12). Заправо је показано да се екстензивна акутна тубулска некроза изузетно ретко среће при биопсијама бубрега (13). Данас се акутна тубулска некроза дефинише као нагло настало смањење ЛГФ за 50% и повећање креатинина у серуму за > 44  $\mu\text{mol/l}$  праћено накупљањем азотних материја, поремећајем равнотеже воде и електролита. Три су главна фактора која доводе до смањења јачине гломерулске филтрације а то су: оштећење ћелија каналића, смањен проток крви кроз бубреге и запаљење интерстицијума. Према узоку настанка разликујемо три типа акутне тубулске некрозе: исхемијску, токсичну и мешовиту (14). Морфолошке промене које се налазе у акутној тубулској некрози обухватају оштећење четкастог епитела, некрозу и одвајање ћелија тубула, стварање цилиндара у лумену тубула састављених од Tamm-Horsfall-ових гликопротеина и некротичних епителних ћелија, застој крви у перитубулским капиларима, посебно у спољашњој медули и кортикомедуларном региону.

Акутно оштећење бубрега је динамички процес, који прогредира од почетних ка екстензивним променама све до фазе опоравка. У многим случајевима акутно оштећење бубрега је врло тешко дијагностиковати у почетној фази, осим у случајевима када можемо предвидети његов развој као након кадиохируршке интервенције или употребе цисплатине. Откривени су нови биомаркери који откривају акутно оштећење бубрега у раној фази као што су NGAL (енгл. *Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin*), цистатин С, интелеукин 18 (IL-18), KIM-1 (енгл. *Kidney Injury Molecule 1*) (15). Њихова употреба још увек није ушла у редовну клиничку праксу.

### **1.3. Акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима – лековима**

Акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима или тзв. нефротоксично оштећење бубрега чини 10 % реналног акутног оштећења бубрега. Међу агенсима који испољавају нефротоксично дејство су и многобројни лекови који се користе у свакодневној клиничкој пракси као на пример гентамицин, цисплатина, нестероидни антиинфламаторни лекови (НСАИЛ), радиоконтрастна средства, фолна киселина и многи други. Лекови узрокују око 20% болничког и ванболничког акутног

оштећења бубрега (16). Поменути лекови као и њихових метаболити остварују нефротоксично дејство на ћелије гломерула, бубрежних каналића и интерстицијума доводећи тако до промена у бубрежној функцији и структури. Ћелије бубрежних каналића су нарочито осетљиве на токсичне ефекте лекова због своје улоге у концентровању и реапсорпцији гломерулског филтрата што их излаже високим концентрацијама циркулишућих токсина (17). Нефротоксичност може настати као последица хемодинамских промена, директног оштећења ћелија и ткива, инфламацијског оштећења ткива и опструкције реналне екскреције. Најчешће коришћени лекови могу изазвати суптилна оштећења бубрега и минималне промене у седименту урина који често остају непрепознати све док се не испољи очигледно оштећење бубрежне функције, обично као повећање серумског креатинина (18). Пацијенти са високим ризиком за настанак АОБ изазваног лековима су старости преко 60 година, са преегзистентним хроничним оштећењем бубрега, деплецијом волумена, вишеструком изложеношћу нефротоксинима, са шећерном болешћу, срчаном инсуфицијенцијом и сепсом.

### **1.3.1. Акутно оштећење бубрега изазвано гентамицином**

Гентамицин је аминокликозидни антибиотик који се користи у лечењу инфекција изазваних грам негативним бактеријама. Пролонгирана употреба гентамицина у клиничкој пракси је удружена са тешком нефротоксичношћу. Нефротоксичност гентамицина се огледа у тубулској некрози која је углавном стационарирана у проксималним тубулима. Целуларна токсичност настаје као последица акумулације лека у тубуларним ћелијама, углавном у ендозомалном простору, Голџи комплексу и ендоплазматском ретикулуму, доводећи на тај начин до дестабилизације интрацелуларних мембрана и редистрибуције гентамицина у цитосол ћелије (19). Иако гентамицин не изазива морфолошке промене у гломерулу, показано је да високе дозе изазивају благо увећање гломерула, промене у циркуларном облику и густини са неутрофилном инфилтрацијом (20). Остали ефекти гентамицина односе се на оксидациони стрес који подразумева настанак супероксидних анјона и хидроксилних радикала, смањење редукованог глутатиона, инхибиција  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-азе}$ , отварање митохондријалних пора за пропустљивост и активацију ренин ангиотензин алдостерон система (РААС).

### **1.3.2. Акутно оштећење бубрега изазвано диклофеном**

Нестереоидни антиинфламаторни лекови – НСАИЛ изазивају две различите форме акутног оштећења бубрега. Прва је хемодинамска исхемијска нефропатија док је друга у виду акутног интерстицијалног нефритиса. Инхибиција синтезе простагландина доводи до реналне исхемије и пада притиска у гломерулима а самим тим и до акутног оштећења бубрега нарочито у стањима екстремне дехидратације, смањене реналне перфузије и преегзистентног оштећења бубрега (21). Инхибиција синтезе простагландина огледа се у инхибицији ензима циклооксигеназе 1 (*COX-1*) и циклооксигеназе 2 (*COX-2*) који представљају важну карику у синтези простагноида. Њихова инхибиција не само да смањује количину простагноида већ утиче и на РААС и реноваскуларни тонус као и на бројне патофизиолошке процесе. Експериментална истраживања су показала значајан пораст дијаметра проксималних тубула код пацова који су третирани диклофенак натријумом као последица дегенерације ћелија проксималних тубула (22). Такође је уочена појава ћелија каналића бубрега у урину код пацова који су третирани препаратима салицилатне киселине, чиме је показано да НСАИЛ изазивају пролазно пропуштање ћелија тубула у урину (23).



### **1.3.3. Акутно оштећење бубрега изазвано фолном киселином**

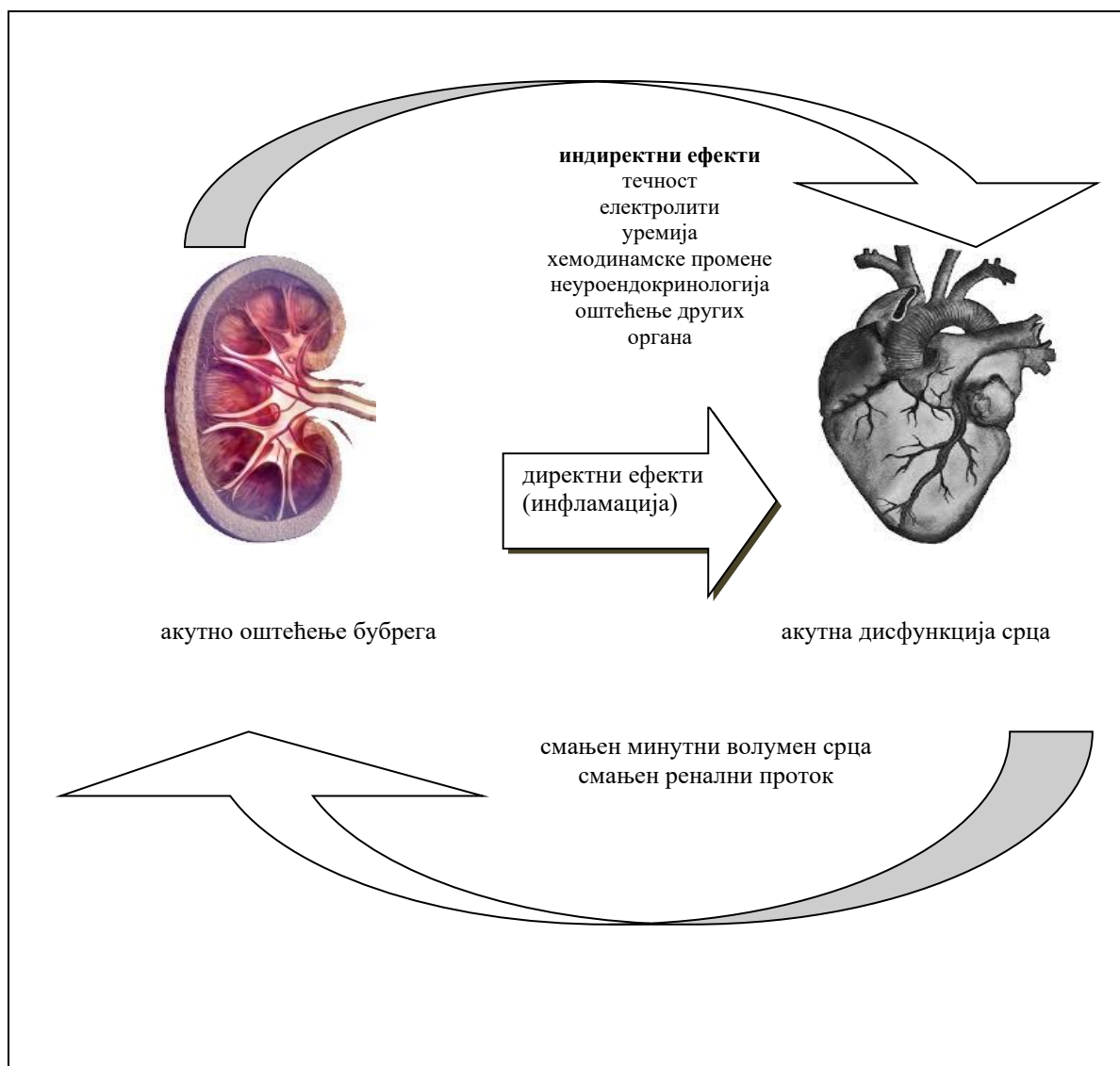
Фолна киселина, (витамин В9), је неопходан кофактор за ћелијску репликацију и раст као и за формирање молекула ДНК и РНК. Високе концентрације фолне киселине су токсичне за различите органе а нарочито бубреге (24). Акутно бубрежно оштећење настало применом фолне киселине је удружено са рапидном појавом кристала фолне киселине унутар тубула са каснијом појавом тубулске некрозе а затим и епителијалне регенерације и ожиљавања реналног кортекса. Функционалне промене се карактеришу у смањењу клиренса ендогеног креатинина и пораста урее, поремећају метаболизма натријума, воде, калијума и хлора које су последица смањеног тубуларног ресорптивног капацитета услед тубуларне некрозе (25). Студија коју су спровели *Kumar* и сарадници је показала да фолна киселина, која је и сама антиоксидант, у високим концентрацијама може довести до прооксидационог стања у ткиву бубрега и смањења протекције против оксидационог стреса деплецијом активности антиоксидантних ензима (26).

## **1.4. Утицај акутног оштећења бубрега на срце и његову функцију – Кардио-ренални синдром тип 3**

Акутно оштећење бубрега доводи до стимулације метаболичких и хуморалних механизма који за последицу имају оштећење удаљених органа. Болести срца и бубрега често коегзистирају; рад и функција срца зависе од бубрежне регулације електролита и воде док бубрежна функција директно зависи од протока крви и притиска које генерише срце (27). Кардио-ренални синдром тип 3 представља нагло настало и примарно погоршање функције бубрега дефинисано према RIFLE критеријумима које је преложила AKIN које доводи до акутне кардијалне дисфункције. Спектар акутне кардијалне дисфункције обухвата акутну декомпензацију срчане слабости, акутни инфаркт миокарда и срчане аритмије. Акутно оштећење бубрега може утицати на срце путем неколико механизма чији редослед још увек није установљен (28). Инциденца и преваленца кардио-реналног синдрома тип 3 још увек није утврђена. Недавно спроведене студије показале су удруженост акутног оштећења бубрега и мултиорганског оштећења (29). Стопа морталитета код пацијената са акутним оштећењем бубрега у јединицама интензивног лечења корелира са бројем оштећених органских система, 53% са оштећењем 2 органа, 80 % са 3 органа, 91 % са 4 органа и 100 % са 5 или 6 органа у односу на 30% код пацијената само са изолованим акутним оштећењем бубрега. Најчешћи органи оштећени у акутном оштећењу бубрега су респираторни (82%), кардиоваскуларни (60%), хепатични (28%). Неколико студија је показало да значајан број пацијената са акутним оштећењем бубрега развије неки облик срчане дисфункције. Према једној мултицентричној студији болест срца је била узрок смрти код 15% пацијената са акутним оштећењем бубрега (30). Срчана слабост је најчешћи узрок смрти код пацијената са уремијом (31).

### **1.4.1. Патофизиолошки механизми кардио-реналног синдрома тип 3**

Патофизиолошки механизми који повезују акутно оштећење бубрега и срчану дисфункцију нису још увек у потпуности разјашњени. Оно што се зна је да АОБ утиче на срчану функцију на директан и индиректан начин (*слика 1*).



Слика 1. Патопфизиолошки механизми кардио-реналног синдрома тип 3

Последице директног дејства акутног оштећења бубрега на срчани мишић су инфилтрација неутрофила, инфламаторних медијатора, апоптоза кардиомиоцита (32). Последица АОБ доводи до активације имунореактивног интерлеукина -1 (IL-1), интерлеукина – 6 (IL-6), фактора некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ ) и пораста нивоа месенџер РНК (мРНК) и интрацелуларног адхезионог молекула 1 (ICAM-1) (33). Акутно оштећење бубрега доводи до бројних физиолошких поремећаја који воде до значајног погоршања срчане функције. Повећање волумена течности односно предоптерећења (енгл. *preload*), активација симпатикуса, ренин ангиотензин алдостерон система и електролитни дисбаланс на индиректан начин утичу на погоршање срчане функције (34). Повећање волумена течности настаје као последица смањења минутног волумена са последичном активацијом ренин ангиотензин система и сипматикуса. Истовремена дисфункција бубрега и срца доводи до ретенције натријума и воде што доводи до повећања реналног венског притиска и смањења артеријског притиска. Активација ренин ангиотензин алдостерон система у акутном оштећењу бубрега доводи до настанка ангиотензина 2 који има негативан ефекат на срчану функцију повећавајући предоптерећење и постоптерећење (енгл. *preload u afterload*) што повећава потребу срчаног мишића за кисеоником. Ангиотензин 2 такође

може довести до апоптозе и активације ензима никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) оксидазе у ендотелијалним ћелијама, глатким мишићним ћелијама крвних судова, тубулотцитима и кардиомиоцитима и довести до формирања реактивних кисеоничних радикала (35). Губитак коронарне резерве као последица акутног оштећења бубрега може објаснити висок морталитет и морбидитет код пацијената у терминалном стадијуму бубрежне слабости (36).

Досадашња експериментална истраживања су углавном била базирана на директним ефектима акутног оштећења бубрега на миокард. Показано је да након исхемије бубрега мишева у експерименталним условима долази до повећања системске и миокардне активности TNF- $\alpha$  и IL-1(37). Такође је откривен повећан ниво кардијалне ICAM-1 мРНК-а 6 сати након исхемије бубрега као и повећана активност кардијалне мијелопероксидазе. Истраживање које су спровели *Mitaka* и сарадници је показало повећане вредности TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и нуклеарног фактора капа Б (NF- $\kappa$ B) у изолованом срцу пацова након унилатералне исхемије бубрега. IL-6 је локализован у васкуларним ендотелним ћелијама миокарда (38). Све поменуте студије су показале несумњиву улогу инфламације на функцију миокарда у акутном оштећењу бубрега.

Индукција оксидационог стреса и поремећај системских одговора могу допринети настанку органске дисфункције код индуковане акутне бубрежне инсуфицијенције у експерименталним условима. Хем оксигеназа 1 је ензим који катализује разградњу хема чија експресија утиче на смањење оксидационог стреса, генерише антиинфламаторне и антиоксидационе метаболите као што је билирубин и врши усходну регулацију инхибитора ћелијског циклуса као што је p21. У издвојеној студији унилатерална исхемија/реперфузија бубрега доводи до смањења нивоа хепатичне супероксид дисмутазе, каталазе и глутатиона, сугеришући да исхемија/реперфузија бубрега може компромитовати способност удаљених органа да се носе са оксидационим стресом и оштећењем (39).

## 1.5. Оксидациони стрес

### 1.5.1. Дефиниција

Оксидациони стрес се дефинише као дисбаланс између оксиданаса - слободних радикала или реактивних кисеоничних врста – ROS (енгл. *Reactive Oxygen Species*) и антиоксиданаса у корист оксиданаса што за последицу може имати оштећење које називамо „оксидационим стресом“ (40). Оксиданси настају као нормални продукти аеробног метаболизма али при одређеним патофизиолошким стањима њихово стварање може бити појачано. Антиоксидациона заштита укључује два механизма, ензимски и неензимски. За разумевање оксидационог стреса централну улогу има концепт прооксидационо-антиоксидационе равнотеже (41). Овим концептом се наглашава да поремећај може настати променама на обема странама равнотеже (нпр. појачано стварање ROS или недостатак антиоксидационих механизма). Такође се истиче хомеостатска концентрација оксиданаса (ROS или слободних радикала). Реактивне кисеоничне врсте (ROS) су први пут окупирале пажњу биолога као потенцијално штетни нуспродукти аеробног метаболизма. Сада се зна да они играју важну улогу и као секундарни гласници у многим ћелијским сигналним путевима (42). Стога, мањи поремећаји равнотеже ће довести до хомеостатске адаптације као одговор на промене у непосредном окружењу, док далеко већи поремећаји могу довести до непоправљивих оштећења и смрти ћелије. Граница између нормалних физиолошких промена и патолошких остаје неминовно нејасна.

### 1.5.2. Реактивне врсте кисеоника (ROS)

Молекул кисеоника се може редуковати до воде. Интермедијарни кораци у процесу редукције кисеоника јесу: формирање супероксидног анијонског радикала ( $O_2^-$ ), водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) и хидрокси радикала ( $OH^*$ ) који одговарају степенима редукције за један, два или три електрона. Термин реактивне врсте кисеоника (ROS) се односи како на слободне радикале тако и на њихове нерадикалске интермедијаре. Слободни радикали могу настати из многих елемената, а најзначајнији су они биолошки системи који садрже кисеоник и азот.

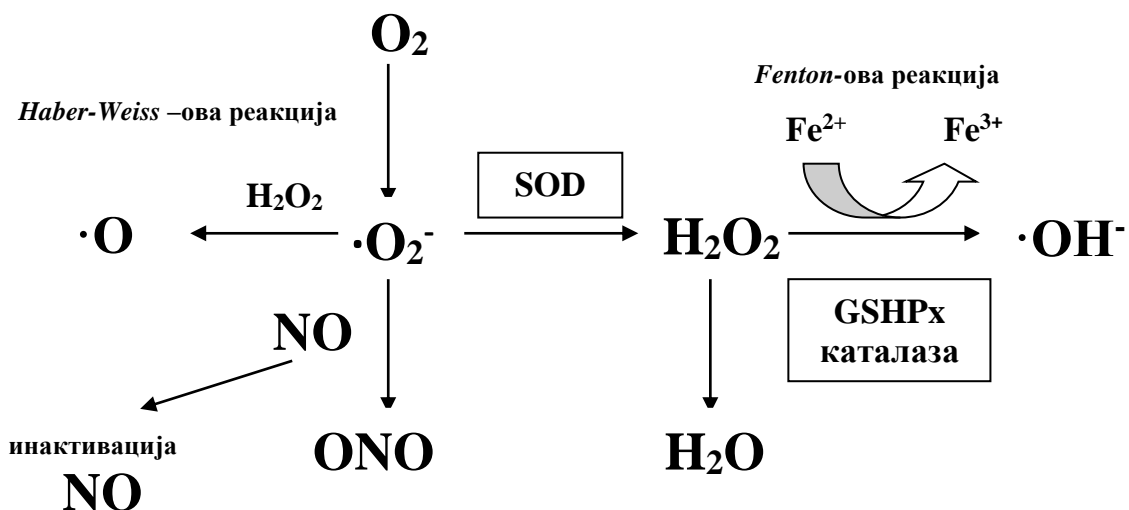
У физиолошким условима најчешћи слободни кисеонични радикал је супероксидни анијон ( $O_2^-$ ) који настаје у митохондријама. Трансфер електрона преко ензима у респираторном ланцу није у потпуности ефикасан. Недостатак електрона у молекуларном кисеонику, нарочито у комплексу I и III, доводи до формирања супероксидног анијона (43). Стопа формирања  $O_2^-$  је одређена бројем електрона присутних у ланцу, тако да је повишена у условима хипоксије и хипергликемије код шећерне болести. У нормалним условима, 2 % унетог кисеоника претвара се у  $O_2^-$  у митохондријама уместо да се редукује до воде. Због свог наелектрисања мембрана је непропустљива за  $O_2^-$ , тако да он остаје унутар митохондријалног матрикса. Други битан извор супероксидног анијона у физиолошким условима је ензим NADPH који ствара знатне количине 5 цитохром P450 и других оксидо-редуктаза. Стога, различити фактори раста, лекови и токсини узрокују повећање стварања слободних радикала. Супероксидни анијон разлаже ензим супероксид дисмутаза (SOD) која га конвертује у водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) који није слободни радикал и мање је реактиван од  $O_2^-$ . Међутим, водоник пероксид се убраја у реактивне врсте кисеоника због своје уске повезаности са стварањем и разлагањем слободних радикала (44). С обзиром на то да је неполаран, може да дифундује кроз мембране ћелија и ћелијских органела и стога делује као секундарни гласник у путевима сигналне трансдукције. Водоник пероксид се зауврат редукује до воде уз помоћ ензима каталазе и глутатион пероксидазе. У Фентовој реакцији разлаже се на хидроксилни анијон ( $OH^-$ ) и хидроксил радикал ( $OH^*$ ). Катализатори ове реакције су јони  $Fe^{2+}$ . Процењени животни век хидроксил радикала износи  $10^{-9}$  s реагујући са било којим биолошким молекулом у својој непосредној близини путем ограничене дифузије. Хидроксил радикал је најреактивнији интермедијарни продукт делимичне редукције кисеоника. Он изазива многобројне реакције које су одговорне за иреверзибилно оштећење ћелија: оштећење ћелијске мембране, оштећење молекула ДНК, оштећење мембране митохондрија и поремећај липидне пероксидације.

Појачано стварање супероксид анијона може довести до интеракције са азот моноксидом (NO) са којим формира снажни оксидант пероксинитритни радикал ( $ONOO^*$ ). Створени пероксинитрит реагује са бројним биомолекулима, делујући као селективни оксидант и нитритни агенс (45). Токсичност азот-монооксида потиче из могућности продукције хидроксилног радикала ( $OH^*$ ), чији је директни прекурсор пероксинитрит. Поједина истраживања показују да пероксинитрит преко оксидационог стреса доводи до фрагментације протеина и инактивације значајних регулаторних протеина.

### 1.5.3. Механизми антиоксидационе заштите

Слободни радикали и врсте које настају из радикала постоје у биолошким ћелијама и ткивима у малим али мерљивим концентрацијама. Њихове концентрације се одређују помоћу равнотеже између њихове стопе стварања и стопе клиренса од стране различитих антиоксидационих састава и ензима. *Halliwell* и *Gutteridge* су

дефинисали антиоксиданте као супстанце које могу у релативно малим концентрацијама да се супротставе другим оксидационим супстратима и тако значајно одложе или инхибирају њихову оксидацију (46). Најактивнији у борби против слободних радикала су антиоксидациони ензими: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GSH-Px). Такође постоје и неензимски системи антиоксидационе заштите, као што су алфа токоферол (витамин Е), бета каротен, аскорбинска киселина (витамин С) и глутатион. Каталаза и пероксидаза су два типа ензима која метаболишу  $H_2O_2$  који је настао у процесима дисмутације ( $O_2^-$ ) или у реакцијама које катализују ензими оксидазе укључујући и ксантин оксидазу. Каталаза директно разграђује  $H_2O_2$  до воде и молекулског кисеоника, док пероксидаза елиминише  $H_2O_2$  тако што га користи за оксидацију другог супстрата. Супероксид дисмутаза је металоењим који је присутан у свим еукариотским ћелијама као и у екстрацелуларној течности. Она катализује дисмутацију супероксидних анјона до водоник пероксида и молекуларног кисеоника. Комплетан утицај ензима антиоксидационе заштите је приказан на слици 2.



Слика 2. Реакције стварања и разградње реактивних врста кисеоника. Мала количина супероксидног анјона ( $\cdot O_2^-$ ) се нормално ствара као биопродукт оксидационе фосфорилације.  $\cdot O_2^-$  се инактивира под дејством азот монооксида (NO) или супероксид дисмутазе (SOD). Фамилије SOD конвертују  $\cdot O_2^-$  до водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) који се разлаже под дејством глутатион пероксидазе (GSH-Px) на воду. У патолошким условима, једноелектронска редукција  $H_2O_2$  може довести до формирања високо реактивног хидрокси радикала ( $\cdot OH$ ) путем Фентонове реакције уз присуство гвожђа или путем Haber-Weiss-ове реакције реагујући са  $\cdot O_2^-$ . Даље, реакција  $\cdot O_2^-$  са NO резултује инактивацијом цитопротективног NO и формирањем пероксинитрита ( $ONOO^-$ ).

#### 1.5.4. Улога оксидационог стреса у акутном и хроничном оштећењу бубрега

Генерације реактивних врста кисеоника и азот монооксида играју важну улогу у стварању цитотоксичног метаболита, пероксинитрита који може изазвати пероксидацију и оштећење ДНК молекула у акутном оштећењу бубрега изазваног хипоксијско/реперфузијским оштећењем. У експерименталним студијама је показано да примена инхибитора азот монооксида и одређених ензима антиоксидационе

заштите (као SOD) у акутном исхемијском оштећењу бурега, доводе до побољшања функције бубрега првенствено због супресије продукције пероксинитрита (47). Акутно оштећење бубрега је мултифакторијални клинички ентитет који представља велики здравствени проблем. Оксидациони стрес је део патогенезе акутног оштећења бубрега и карактерише се комплексним, међусобно зависним механизмима који прогредирају ка органским одговорима и оштећењима (48). У клиничким студијама на пацијентима са хроничним оштећењем бубрега на хемодијализи показана је ниска активност ензима супероксид дисмутазе (SOD) у односу на здраву контролу (49). У другој студији која је спроведена на пацијентима са акутним оштећењем бубрега у јединици интензивног лечења, такође је регистрована ниска активност ензима SOD тип 1 као и повећана активност малондиалдехида (MDA), нарочито код пацијената у септичном шоку (50). Са друге стране, примена рекомбинантног SOD молекула и трансфера гена у циљу повећања активности супероксид дисмутазе довело је до смањења инфламације и оксидационог стреса у експерименталним моделима акутног оштећења бубрега изазваног исхемијом/реперфузијом и јодним контрастним средствима (51). Такође је показано да је примена SOD миметика делимично ефикасна у смањењу инфламације удружене са реналном исхемијом/реперфузијом и да реактивне врсте кисеоника играју битну улогу у модулацији и про- и антиинфламаторних путева у акутном оштећењу бубрега. Све поменуто студије показују незаобилазну улогу оксидационог стреса у патогенези акутног и хроничног оштећења бубрега.

#### 1.5.5. Акутно оштећење бубрега и инфламација

Инфламација представља сложен биолошки одговор који је од суштинске важности за уклањање микробиолошких патогена и репарацију ткива након различитих форми оштећења. Тешка обољења различите етиологије праћена су генерализованим инфламаторним одговором домаћина. Централни догађај у овом системском инфламаторном одговору је ослобађање каскаде медијатора инфламације у системску циркулацију као што су: интерлеукин 1 (IL-1), интерлеукин 6 (IL-6), фактор некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ ) (52). Такође је познато да се истовремено активира компензаторни антиинфламаторни одговор, током којег се у циркулацију ослобађају антиинфламаторни цитокини, међу њима и IL-10 (53). Цитокини су протеини са плеiotропним биолошким дејством чије су концентрације у серуму заступљене у пикомолима. Проинфламаторни цитокини, укључујући TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, и IL-8 неопходни су за иницијацију ефикасног инфламаторног одговора на инфекцију или оштећење ткива. Проинфламаторни цитокини су способни да индукују једни друге у виду низа каскадних реакција што резултује синергистичким појачавањем њиховог патобиолошког ефекта. Високе концентрације проинфламаторних цитокина корелирају са развојем мултиорганске дисфункције (MODS). Показано је да у стањима као што је сепса и уремија, дисрегулација инфламаторног процеса доводи до истовременог ослобађања и проинфламаторних и антиинфламаторних медијатора.

Познато је да је акутно оштећење бубрега удружено са интратеналном и системском инфламацијом. Разумевање инфламаторног одговора на ћелијском и молекуларном нивоу је битно ради одређивања ефективне терапије у циљу превенције или побољшања лечења акутног оштећења бубрега. Инфламација која настаје током исхемије/реперфузије бубрега има много сличности у свом имунолошком механизму са оном која настаје као одговор на микробиолошки патоген. Унутар бубрега, ћелије епитела тубула изузетно су подложне унутрашњем

оксидационом стресу, нарочито током фазе реперфузије. Некротичне ћелије епитела тубула ослобађају различите молекуле који активирају урођени имуни одговор, тз. DUMPs молекуле, (енгл. *damage – associated molecular patterns*), хистоне, фибронектин, бигликани, протеине топлотног шока (тз. *heat-shock* протеине) (54). Активирани паренхимске ћелије бубрега заједно са дендритским ћелијама секретују хемокине, укључујући CXCL1, CXCL8, CCL2, and CCL5 који промовишу акутни неутрофилни-моноцитно-макрофагни имунски одговор (55). Временски зависне промене у експресији проинфламаторних (TNF- $\alpha$ , интерферон гама - IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1b, IL-23, IL-17, C3, C5a и C5b компонентне комплемента) и антиинфламаторних (IL-4, трансформишући фактор раста бета TGF- $\beta$ , IL-10, хем оксигеназа 1, ресолвини и протектин D1) медијатора створених од стране сталних и регрутованих ћелија су важне одреднице оштећења као и фазе опоравка (56).

Поред исхемије/реперфузије и сепсе, токсично дејство појединих лекова такође може изазвати акутно оштећење бубрега. С обзиром да бубрези филтрирају 25% минутног волумена срца, употреба појединих лекова може погоршати функцију бубрега својим нефротоксичним дејством. Инфламација игра важну улогу у настанку акутног оштећења бубрега, може настати као последица нефротоксичности изазваном лековима као што је цисплатина (57). Цисплатина је значајан хемотерапеутик који се користи за лечење великог броја солидних тумора али је њена примена ограничена услед нефротоксичности. Трећина пацијената након примене цисплатине развије нефротоксичност која захтева обустављање терапије (58).

Након примене цисплатине имуне ћелије се акумулирају у бубрезима уз секрецију проинфламаторних цитокина који погоршавају функцију бубрега. Ове интраареналне имуне ћелије реагују на стимулус продукујући проинфламаторне цитокине као што су IL-1, IL-6 и хемокине као што је моноцитни хемоатрактантни протеин-1, који остварује своје дејство близу крвних судова регрутујући леукоците из циркулације на место оштећења у циљу уклањања потенцијалног патогена, репарације ткива и успостављање ткивне хомеостазе (59). Неутрофили су обично прве ћелије које долазе на место оштећења, с обзиром да су неспецифичне и способне да ослобађају токсичан садржај из својих гранула у циљу уништења патогена. У другој фази долази до регрутовања моноцита из циркулације. Ове ћелије су нешто специфичније и могу се поделити у две подгрупе, M1 и M2 моноцити. M1 ослобађају цитокине у циљу уништења патогена који није уништен од стране неутрофила. M2 моноцити се диферентују у макрофаге и врше фагоцитозу оштећеног ткива и апоптотичних неутрофила (60). Проинфламаторни цитокини који имају значајну улогу у патофизиологији нефротоксичног оштећења су TNF- $\alpha$ , IL-1 и IL-6.

Изоформе IL-1, IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$  иницирају активацију проинфламаторних интраћелијских сигналних путева путем лигације ћелијског рецептора за интерлеукин 1 (IL-1R1). IL-1R1 је члан толичних интерлеукин 1 (Toll/IL-1) фамилија рецептора. Поменути рецептор преноси сигнал путем протеина My88 (протеин примарног одговора мијелоидне диференцијације) да би активирао сигналне путеве: NF- $\kappa$ B и митогеном активирана протеин киназа (МАРК каскада). Активација наведених сигналних путева доводи до продукције цитокина као што је TNF- $\alpha$  и хемокина који заједно активирају ћелије на место оштећења (61).

У физиолошким условима фини баланс између инфламаторних и антиинфламаторних медијатора омогућава репарацију ткива и повраћај у хомеостазно стање. Међутим акутно оштећење бубрега често доводи до лоше репарације ткива као резултат пролонгиране хипоксије и континуираног лучења профибротичких цитокина (на пр. IL-13 и TGF- $\beta$ 1) доводећи тако до фиброзе и хроничне реналне слабости насталих као последица акутног оштећења бубрега.

## 1.6. Експериментални модели акутног оштећења бубрега

Главна обележје и крајњи циљ широко коришћених експерименталних модела акутног оштећења бубрега је развој смрти ћелија бубрежних каналића – акутне тубулске некрозе. Важан концепт који је доста помогао разумевању патофизиологије исхемијског акутног оштећења бубрега је да сублетално и реверзибилно оштећење ћелија бубрежних каналића доприноси настанку бубрежне тубуларне дисфункције. Не постоји идеалан експериментални модел акутног оштећења бубрега. Најједноставнији експериментални метод развоја АОБ је токсично оштећење тубула или акутна тубулска некроза настала нефротоксичним агенсима. Комплексност патогенезе акутног оштећења бубрега огледа се у интеракцији хемодинамских, хуморалних и токсичних фактора. У циљу потребе за откривањем комплексности механизма развоја АОБ развијени су различити експериментални модели засновани на различитим механизмима као што су: исхемија, дејство лекова и токсина, радиоконтрастни агенси и рабдомиолиза. Ови модели веродостојно репродукују морфолошке карактеристике акутне тубулске некрозе код људи.

Акутно оштећење бубрега се историјски гледано дели на две основне форме, хипоксичну и нехипоксичну (токсичну). Ћелијска токсичност може довести до повећања потрошње кисеоника у бубрезима или смањити регионални проток бубрега, са последичном интратрениалном хипоксијом. Стога, чини се да је хипоксија уобичајена појава у акутном оштећењу бубрега, без обзира на њену генезу (62). Класични исхемијски модели АОБ као и токсични модели изазивају обимну тубулску некрозу. Експериментални модели АОБ у чијој основи је исхемија бубрежног ткива заснивају се на дуготрајној топлој исхемији коју следи реперфузија настала услед клемовања бубрежне артерије. Токсични експериментални модели подразумевају примену високих доза нефротоксичних агенаса или лекова. У оба случаја углавном настаје значајна тубулска некроза.

Акутна тубулска некроза може постојати и без очигледних морфолошких промена што је показано и на хуманим биопсијама бубрега, где је акутна тубулска некроза веома ретка. Насупрот томе минимално ограничене парнхималне промене које су компатибилне са акутном тубулском некрозом су уобичајена патохистолошка слика у многим случајевима акутног оштећења бубрега. Сублетално оштећење ћелија паренхима бубрега није описано у досадашњој патофизиолошкој дефиницији акутног оштећења бубрега. Обично се користи као објашњење за оштећење које не резултира ћелијској смрти а при том постоје морфолошке и функционалне промене на ћелијама тубула. Морфолошке промене типичне за сублетално тубуларно оштећење су губитак четкастог покрива, едем ћелије и митохондрија, вакуолизација цитоплазме и кариопикноза. Временом како морфолошке промене напредују може доћи до развоја апоптозе, очигледне некрозе или њихове резолуције. У бубрегу може истовремено постојати више различитих врста ћелијског оштећења. На пример, у моделу хипоксичног акутног оштећења бубрега изазваним једним контрастним средством и другим агенсима, фокална до екстензивна тубуларна некроза може коегзистирати са апоптозом и сублеталним оштећењем. (63)

Детектовање акутног оштећења бубрега у експерименталним моделима може бити спроведено различитим методама. Неинвазивне методе подразумевају одређивање различитих биомаркера у серуму и урину чији развој брзо напредује. Поред основних биомаркера попут урее и креатинина, последњих година развијена је плејада нових биомаркера који могу указати на суптилна оштећења тубулоцита или тзв. сублетална оштећења. У те биомаркере убрајамо: различите групе цитокина (IL-6, IL-8, IL-18), липокалин удружен са неутрофилном желатиназом (*NGAL - neutrophil*



*gelatinase-associated lipocalin*), KIM - 1 (*kidney injury molecule 1*) или молекул оштећења бубрега 1 који представља оштећење проксималних тубула. Значајност нових биомаркера расте са постојањем морфолошких промена које детектујемо светлосним микроскопом. Последњих година развијају се нове методе које подразумевају комбинацију биомаркера са неким од “*imaging*” дијагностика као што је: магнетна резонанца зависна од нивоа серумског кисеоника тзв. BOLD-MRI (енгл. *Blood Oxygenation Level Dependent*) којом се региструју повишене вредности деоксихемоглобина унутар хипоксичог ткива (64). Поред наведене методе, последњих година користи се и метода натријум магнетна резонанца (Na MRI) којом се детектују ране функционалне промене у акутном оштећењу бубрега које подразумевају губитак физиолошког кортико-медуларног градијента за натријум. Овом методом се могу детектовати сублетална и потенцијално реверзибилна тубуларна оштећења. Маркери акутног оштећења бубрега су област која се брзо развија и чија ће корист зависити од њихове способности откривања сублеталних и потенцијално реверзибилних тубуларних оштећења.

## **2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА**

## 2.1. Општи циљ:

Испитати утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином, диклофеном и фолном киселином на функцију миокарда и инфламацијско-оксидациони статус пацова.

## 2.2. Специфични циљеви:

1. Процена ефеката акутног оштећења бубрега изазваног нефротоксичним агенсима на функцију миокарда и коронарну циркулацију изолованог срца пацова праћењем параметара: а)  $+dP/dt_{max}$  - максимална стопа промене притиска у левој комори, б)  $-dP/dt_{min}$  - минимална стопа промене притиска у левој комори, в) SLVP - систолни притисак леве коморе, г) DLVP - дијастолни притисак леве коморе, д) HR - срчана фреквенца, њ) CF – коронарни проток;
2. Испитивање утицаја акутног оштећења бубрега изазваног нефротоксичним агенсима на различите параметре оксидационог стреса (индекс липидне пероксидације (TBARS), азот моноксид (NO), супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ), водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) и антиоксидационих ензима заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH));
3. Испитивање утицаја акутног оштећења бубрега изазваног нефротоксичним агенсима на инфламацијски статус пацова: фактор некрозе тумора алфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлеукини 1 и 6 (IL-1 и IL-6).

## 2.3. Хипотезе

1. Акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима може имати штетно дејство на кардиодинамске параметре и коронарну циркулацију изолованог срца пацова;
2. Акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима значајно утиче на вредности параметара оксидационог стреса и инфламациони статус пацова;
3. Вредности параметара инфламацијско-оксидационог статуса пацова варирају у зависности од нефротоксичног агенса (гентамицин, диклофенак натријум и фолна киселина) који је изазвао акутно оштећење бубрега;

## **3.МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3.1. Испитивана популација

Истраживање је обухватило 100 пацова, Wistar albino соја, мушког пола, старости 4 недеље, просечне телесне масе око 200 грама. Експерименталне животиње су чуване у строго контролисаним условима (температура 25°C, циклус светлост : тама 12:12 часова), вода и храна су били доступни у довољној количини да би могле да их узимају према потреби (ad libitum).

У зависности од фармаколошког третмана животиње су груписане у три експерименталне и једну контролну групу, по 25 животиња у свакој групи:

- прва експериментална група свакодневно је третирана гентамицином (растворен у 0.9% NaCl) у дози од 100 mg/kg/дневно (2.5 ml/kg) интраперитонеално, током осам дана (65)
- друга експериментална група је свакодневно третирана диклофеном у дози 15 mg/kg интраперитонеално растворен у 0.1 ml раствора 0.9% NaCl-а, три дана, два пута дневно (од 4. до 6. дана депривације воде) уз предходну депривацију воде у трајању од 6 дана (66)
- трећа експериментална група је примала раствор фолне киселине (25%, w/v) у 150 mmol/L раствору натријум бикарбоната у дози од 250 mg/kg телесне тежине интраперитонеално једнократно (1 ml/kg ТТ) (67)
- четврта контролна група је примала 0.1 ml физиолошког раствора интраперитонеално

Жртвовање животиња је спроведено након фармаколошког третмана и то: 48 h након третмана фолном киселином и 24 h након третмана гентамицином и диклофенак натријумом. Животиње су жртвоване у циљу спровођења експеримента на изолованом срцу ради испитивања срчане функције и коронарне ауторегулације и узимања узорака крви за одређивање биохемијских анализа.

Све процедуре изведене у овој студији су у складу са етичким стандардима Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, одобрење број 01-10243.

### 3.2. Експериментални протокол

#### 3.2.1. Изоловање и припрема срца

На крају сваког спроведеног протокола изазивања акутног оштећења бубрега чије је време спровођења утврђеног за сваку експерименталну групу посебно, животиње су анестезиране комбинацијом кетамина и ксилазина. Након спровођења анестезије животиње су жртвоване цервикалном дислокацијом. Отварањем абдомена и пресецањем дијафрагме врши се отварање грудног коша да би се пресецањем перикарда изоловало срце. Након тога се врши изолација срца хладним физиолошким раствором температуре од - 4°C како би се његове метаболичке потребе свеле на минимум. Наведени процес се симболично назива „физиолошка клешта“. Тупом препарацијом врши се одстрањивање сувишних делова и издваја асцедентна аорта која се припаја за канилу *Langerdoff*- овог апарата. Након успостављања стабилног срчаног рада, уклањањем леве преткоморе и прокидањем митралне валвуле убацује се сензор, *transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd, Budapest, Hungary* у леву комору ради директног и континуираног праћења параметара функције леве коморе.

### 3.2.2. Модел изоловане ретроградне перфузије по Langendorff-у

*Langendorff* – ов модел ретроградне перфузије срца је први пут описан крајем 19. века од стране аустријског научника Оскара Лангердорфа и до данас је уз мале модификације углавном остао непромењен и изводи се помоћу *Langendorff* – овог апарата (*Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary*). Постоје две технике рада на *Langendorff* апарату од којих се једна базира на перфузији срца при константном протоку, док се друга односи на перфузију срца при константном притиску кроз коронарно васкуларно корито. У овом истраживању примењена је метода перфузије срца при константном коронарном перфузионом притиску од 70 cmH<sub>2</sub>O. Изоловано срце се помоћу асцедентне аорте постави на канилу која се налази на завршном делу цеви мањег калибра и омогућава се несметан проток *Krebs-Henseleit* раствора кроз срце.

Раствор за перфузију или ефлуент (*Krebs-Henseleit* раствор) пролази ретроградно кроз аорту, супротно нормалном протоку при чему је аорта затворена под притиском. Компоненте које улазе у његов састав су: натријум хлорид (NaCl - 118 mmol/L), калијум хлорид (KCl – 4,7 mmol/L), магнезијум сулфат (MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 1,66 mmol/L), калијум дихидроген фосфат (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O – 1,18 mmol/L), натријум бикарбонат (NaHCO<sub>3</sub>–24,88 mmol/L), глукоза (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>×H<sub>2</sub>O –5,5 mmol/L) и калцијум хлорид (CaCl<sub>2</sub>–2,52 mmol/L). рН вредност раствора износи 7,4. Улога раствора је исхрана миокарда, по саставу садржи све компоненте екстрацелуларне течности. Позиционирањем сензора у леву комору омогућено је праћење параметара функције леве коморе:

- а) dp/dt max - максимална стопа раста притиска у левој комори,
- б) dp/dt min - минимална стопа раста притиска у левој комори,
- в) SLVP - систолни притисак леве коморе,
- г) DLVP - дијастолни притисак леве коморе,
- д) HR - срчана фреквенца.

Након стабилизације коронарног протока, када три поновљена мерења показују приближно исте вредности, при свакој вредности перфузионог притиска прикупљани су узорци коронарног ефлуента ради одређивања брзине коронарног протока и биохемијских анализа – параметара оксидационог стреса. Након стабилизације срчане перфузије, препарати су стабилизовани 30 минута при базалним коронарним перфузионом притиском (CPP) од 70 cmH<sub>2</sub>O, затим је CPP смањен на 60 cmH<sub>2</sub>O и након тога постепено повећаван на 80, 100, 120 да би на крају био смањен на 40 cmH<sub>2</sub>O уз још једно постепено повећање коронарног перфузионог притиска за по 20 cmH<sub>2</sub>O до максималних 120 cmH<sub>2</sub>O ради успостављања коронарне ауторегулације. За сваку вредност перфузионог притиска регистровани су параметри функције леве коморе и вредности коронарног протока. Вредност коронарног протока (CF) мерена је флоуметријски и изражава се у ml коронарног венског ефлента у минути (68).

У прикупљеним узорцима коронарног венског ефлуента, за сваку вредност перфузионог притиска, спектрофотометријским методама, на апарату *Specord S-600 Analytik Jena*, одређивани су следећи биомаркери оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), азот моноксид у форми нитрита (NO<sub>2</sub>), супероксид анјон радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 3.3. Биохемијске анализе

У тренутку жртвовања животиње, употребом гиљотине, животињама је узоркована крв искрвављењем. Из узете крви су издвојени плазма и еритроцити. У серуму је помоћу стандардног анализатора одређена концентрација серумског креатинина и урее и електролитног статуса у циљу детектовања акутног оштећења бубрега. Поред тога, приликом жртвовања животиња прикупљени су узорци крви за процену системског редокс статуса путем мерења концентрације про-оксидационих параметара спектофотометријском методом: индекс липидне пероксидације - мерен као TBARS, азот моноксид у форми нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), супероксид анион радикал ( $\text{O}_2^-$ ), водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и антиоксидационих ензима заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH). ELISA методом одређивани су параметри инфламације: фактор некрозе тумора алфа ( $\text{TNF-}\alpha$ ) и интерлеукини 1 и 6 (IL-1 и IL-6).

#### 3.3.1. Одређивање јонограма ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ) и биохемијских показатеља функције бубрега пацова у серуму

Параметри бубрежне функције уреа и креатинин одређивани су из серума предходно добијених узорака крви на биохемијском анализатору *Roche Cobas 6000 modul C501* спектофотометријском методом. Натријум и калијум су такође одређивани из серума на биохемијском анализатору *Roche Cobas 6000 modul C501*, ISE (*Ionic selective Electrode*) методом.

#### 3.3.2. Одређивање биохемијских маркера оксидационог стреса у узорцима крви

Из прикупљених узорака крви центрифугирањем се издваја плазма у супернатанту. У узорцима плазме су одређивани нивои параметара оксидационог стреса (TBARS-а,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), спектрофотометријским методама (на апарату *Specord S-600 Analytik Jena*).

1. Индекс липидне пероксидације мерен као TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Степен липидне пероксидације у плазми одређен је индиректно мерењем тиобарбитуратних реактивних супстанци (TBARS). Нивои липидних пероксида, малониладехида (MDA) се одређују на основу њихове способности да интерагују са тиобарбитурном киселином (ТВА) (69). Екстракт је добијен мешањем 0.8 ml плазме и 0.4 ml 28% трихлорсирћетне киселине (ТСА), након чега су узорци стављени на лед 10 мин и центрифугирани 15 минута на 6000 rpm (или 4 минута на 15 000 обртаја). 800  $\mu\text{l}$  екстрата плазме и 200  $\mu\text{l}$  1% ТВА су инкубирани у воденом купатилу на 100 °C 15 минута. Дестилована вода је коришћена као слепа проба. Мерење је спроведено на таласној дужини 530 nm.
2. Нитрити -  $\text{NO}_2^-$ . Метод одређивања нивоа нитрита у плазми укључује спектофотометријско одређивање његовог стабилног продукта разградње ( $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NO}_2^-$ ). Овај метод захтева редукцију  $\text{NO}_3^-$  у  $\text{NO}_2^-$  након чега се  $\text{NO}_2^-$  одређује *Griess* – овом реакцијом. Ниво нитрита у плазми је одређиван као стварања азот оксида са *Griess* – овим реагенсом (70). 0.1 ml 3 N перхлорне киселине (PCA) + 0.4 ml 20 mM етилендиаминтетрасирћетне киселине (EDTA) и 0.2 ml плазме стављени су на лед 15 минута, након тога центрифугирани 15 минута на 6000 обртаја. Након издвајања супернатанта додато је 220  $\mu\text{l}$   $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Мерење нитрита спроведено је на таласној дужини од 550 nm. Дестилована вода је коришћена као слепа проба.

3. Супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ). Одређивање нивоа супероксид анјон радикала у плазми заснива се на реакцији  $O_2^-$  са нитро плавим тетразолијум хлоридом (енгл. *Nitro Blue Tetrazolium - NBT*) при чему настаје нитроформаза плав. Експериментална смеша садржи 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT (71). У епрувету се пипетира 50  $\mu$ l узорка плазме и 950  $\mu$ l експерименталне смеше, чиме реакција отпочиње. Мерење је спроведено на таласној дужини од 530 nm.
4. Водоник пероксид -  $H_2O_2$ . Протокол одређивања концентрације  $H_2O_2$  базиран је на оксидацији фенол црвеног водоник пероксидом, у реакцији која је катализована пероксидазом из коњске ротвице (енгл. *Horseradish Peroxidase - HRPO*) (72). 200  $\mu$ l узорка плазме се помеша са 800  $\mu$ l свеже припремљеног фенол црвеног раствора и 10  $\mu$ l (1:20) HRPO (направљеног *ex-tempore*). Ниво  $H_2O_2$  је мерен на таласној дужини 610 nm.

### 3.3.3. Одређивање ензима антиоксидационе заштите у прикупљеним узорцима крви

Центрифугирањем прикупљених узорака крви из талога су се издвојени еритроцити. Изоловани еритроцити су опрани три пута са три заремине 0.9% физиолошког раствора.

1. Каталаза (CAT). Хемолизат припремљен према *McCord-* у и *Fridovic-* у који садржи око 50 g/l хемоглобина је коришћен за одређивање активности каталазе у еритроцитима (73). Активност каталазе је одређивана методом по *Beutler-*у (74). Лизат еритроцита је растворен у дестилованој води (1: 7 v / v) а након тога третиран хлороформ етанолом (0.6: 1 v / v) у циљу уклањања хемоглобина (75). Након тога 50  $\mu$ l CAT пуфера је додато у 100  $\mu$ l узорка лизата еритроцита, реакција започиње додатком 1 ml 10 mM  $H_2O_2$ . Мерење је спроведено на таласној дужини од 230 nm при чему је дестилована вода коришћена као слепа проба.
2. Супероксид дисмутаза (SOD). Активност SOD је одређена адреналинском методом према *Misti i Fridovic-*у (76). У мешавину од 100  $\mu$ l лизата и 1 ml бикарбонатног пуфера додато је 100  $\mu$ l адреналина. Мерење је спроведено на таласној дужини од 470 nm.
3. Редуковани глутатион – (GSH). Ниво редукованог глутатиона је одређен на основу оксидације глутатиона помоћу 5.5 духидро-бис-6.2-нитробензоеве киселине користећи *Beutler-*ов метод; концентрација је изражена у наномолима по милилитру еритроцита (77).

### 3.3.4. Одређивање ензима антиоксидационе заштите у узорцима коронарног ефлуента

1. Индекс липидне пероксидације мерен као TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) је одређен помоћу 1% раствора тиобарбитуратне киселине у 0.05 M раствору NaOH, инкубираним са коронарним ефлуентом на температури од 100 ° C у трајању од 15 минута. Мерење је спроведено на таласној дужини од 530 nm. Као слепа проба коришћен је *Krebs Henseleit-* ов раствор (46).
2. Нитрити –  $NO_2^-$ . Азот оксид се брзо разграђује на стабилније компоненте нитрате и нитрите. Користећи *Griess* – ов реагенс ниво нитрита ( $NO_2^-$ ) је коришћен за одређивање азот оксида (NO). 0.5 ml коронарног ефлуента је



исталожено са 200  $\mu\text{l}$  30% раствора сулфосалицилне киселине и промешано током 30 минута, након тога центрифугирано на 3000 обртаја. Једнаке запремине супернатанта и *Griess* – овог реагенса (који садржи 1% раствор сулфонамида у 5% фосфорној киселини и 0.1% нафтален етилендиамид – хлорида) су додате и инкубиране 10 минута у мраку. Мерење је спроведено на таласној дужини од 543 nm. Концентрација нитрата је израчуната помоћу натријум нитрата као стандард (47).

3. Супероксид анион радикал ( $\text{O}_2^-$ ). Концентрација супероксид анион радикала ( $\text{O}_2^-$ ) је мерена реакцијом нитро-тетразолијум плаво хлорида у TRIS-HCl пуферу са коронарним венским ефлуентом на таласној дужини од 530 nm. Као слепа проба коришћен је *Krebs-Henseleit*-ов раствор (48).
4. Водоник пероксид -  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Мерење концентрације водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) се заснива на реакцији коју катализује пероксидаза из коњске ротвице (енгл. *Horseradish Peroxidase - HRPO*). 200 ml коронарног ефлуента се исталожи са 800 ml свеже примпремљеног раствора фенол црвеног са 10  $\mu\text{l}$  (1:20) HRPO (направљеног *ex-tempore*). За слепу пробу, уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна запремина *Krebs-Henseleit*-овог раствора. Ниво  $\text{H}_2\text{O}$  је мерен на таласној дужини од 610 nm (49).

### 3.4. Хистопатолошка анализа срца и бубрега пацова

Након жртвовања житовотиња, срце и бубрези су узети ради утврђивања патохистолошких и морфолошких промена. Предходно изолована срца и бубрези су фиксирани у 4% раствору формалина 48h а затим укалупљени у парафинске калупе. Парафински калупи дебљине 5  $\mu\text{m}$  су изрезани на огољене исечке који су затим осушени, депарафинисани, рехидрирани алкохолем, испрани и затим обојени хематоксилин-еозином ради патохистолошког испитивања. Хистолошке и морфолошке промене су опсервиране светлосним микроскопом.

#### 3.4.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на + 56°C у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и у циљу рехидратације испирани опадајућим концентрацијама етил алкохола: два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води.

Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута, а потом су испирани дестилованом након тога и текућом водом у трајању од 5 минута а затим су два минута бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*). Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају два пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. После бојења и дехидратације, препарати су просветљени потапањем током једног минута у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом два пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*). Хистопатолошка анализа извршена је на основу ткива миокарда и бубрега из сваке групе и описа патолога који није знао којој групи

припадају који узорци. Резултати су представљени помоћу слика. Репрезентативне области су фотографисане помоћу фотоапарата “*Canon*”, модел *PC 1089* помоћу микроскопског увељичања (x400).

### **3.5. Статистичка обрада података**

За статистичку обраду резултата коришћен је статистички програм *SPSS 18.0 for Windows*. Подаци од значаја приказани су табеларно и графички и представљени су као средња вредност уз стандардну девијацију. За поређење резултата унутар групе употребљен је *Mann Whitney U* тест, а за поређење разлика између група за исти параметар коришћен је *Kruskal Wallis* тест, уз употребу одговарајућег *post hoc* теста, *Tukey B*. Статистичка значајност разлике постављена је на нивоу мањим од 0.05 ( $p < 0.05$ )

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

#### 4.0. Утицај примене фолне киселине, диклофена и гентамицина на параметре бубрежне функције

Ефекти примене фолне киселине, диклофена и гентамицина на биохемијске параметре бубрежне функције и јонограма приказани су у Табели 4.0. Резултати су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ). У контролној групи која је третирана физиолошким раствором регистроване су референтне вредности азотних материја (уреа и креатинина) док су у осталим експерименталним групама (диклофен, гентамицин, фолна киселина) регистроване знатно више вредности изнад референтног опсега чиме је потврђен настанак акутне бубрежне слабости. Највише вредности креатинина забележене су у групи која је третирана диклофеном затим фолном киселином и на крају гентамицином. Највише вредности уреа забележене су у групи третираној фолном киселином а најмање у гентамицин групи. Вредности натријума изнад физиолошких забележене су у групи третираној диклофеном и фолном киселином док су вредности калијума изнад референтних забележене у групи која је третирана фолном киселином.

Табела 4.0.

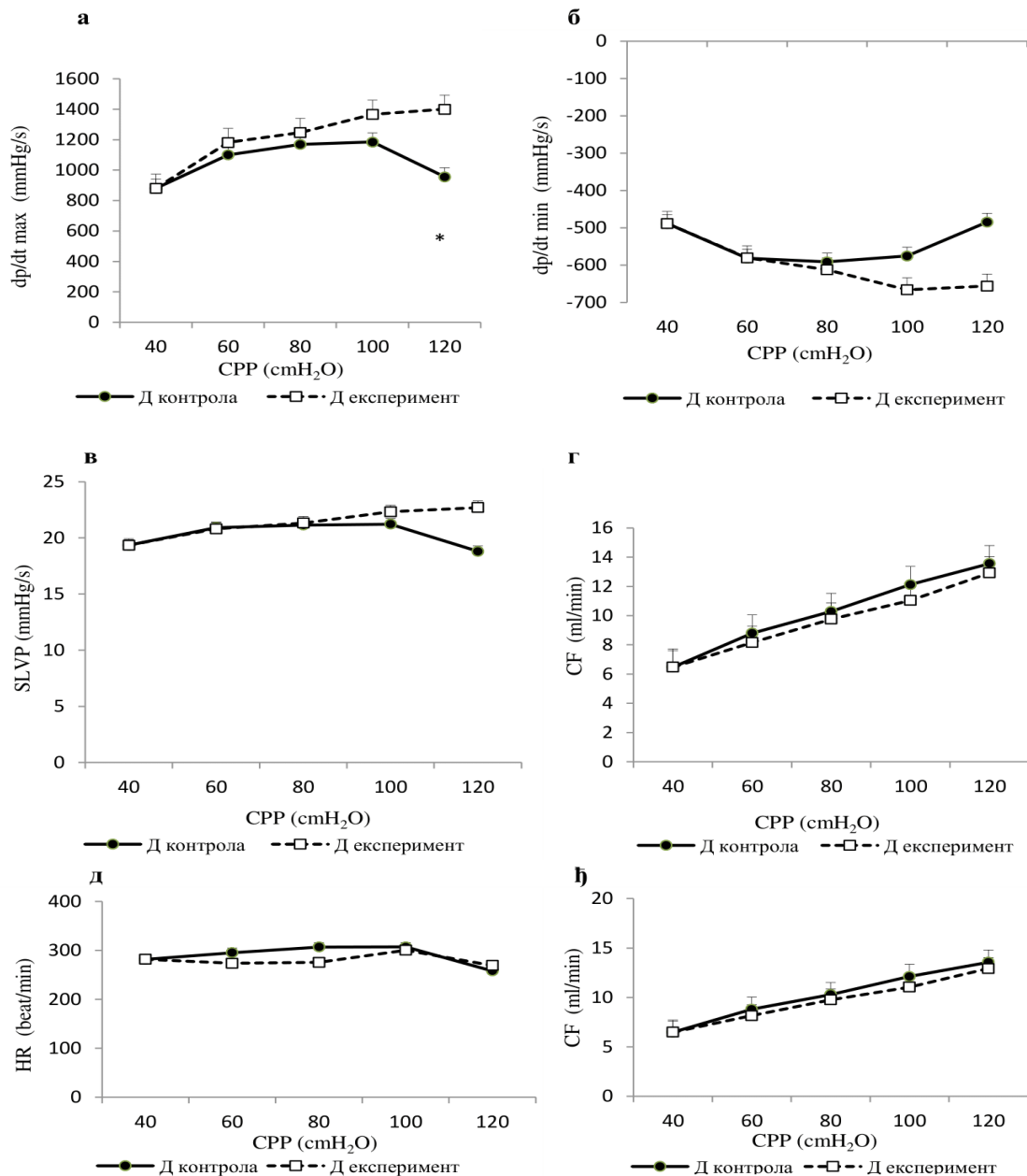
	Уреа (mmol/L)	Креатинин ( $\mu$ mol/L)	Натријум (mmol/l)	Калијум (mmol/l)
Диклофен	19,50 $\pm$ 8,11	64,00 $\pm$ 8,00	155,40 $\pm$ 17,11	4,62 $\pm$ 0,69
Фолна киселина	20,90 $\pm$ 3,79	55,50 $\pm$ 4,36	146,50 $\pm$ 1,53	5,43 $\pm$ 0,61
Гентамицин	11,30 $\pm$ 1,64	50,67 $\pm$ 10,42	143,67 $\pm$ 5,01	5,00 $\pm$ 0,63
Контрола	5,5 $\pm$ 1,32	30,2 $\pm$ 8,04	141,80 $\pm$ 4,44	4,42 $\pm$ 0,61

У табели су приказане вредности биохемијских параметара бубрежне функције и јонограма као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ) у контролној која је третирана физиолошким раствором и експерименталним групама пацова третирану диклофеном, фолном киселином, гентамицином.

#### 4.1. Кардиодинамски параметри и коронарни проток

##### 4.1.1. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном на кардиодинамске параметре и коронарни проток на приказан је на Графикону 1 и у Табели 4.1. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$ .



**Графикон 1.** Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном на кардиодинамске параметре и коронарни проток на различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

а)  $dp/dt \max$  – максимална стопа раста притиска, б)  $dp/dt \min$  – минимална стопа раста притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, д) HR – фреквенца рада срца, ж) CF – коронарни проток. Статистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Mann-Whitney-ovim тестом и приказане једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$

Табела 4.1. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном (Д група) на кардиодинамске параметре и коронарни проток у експерименталним и контролним условима

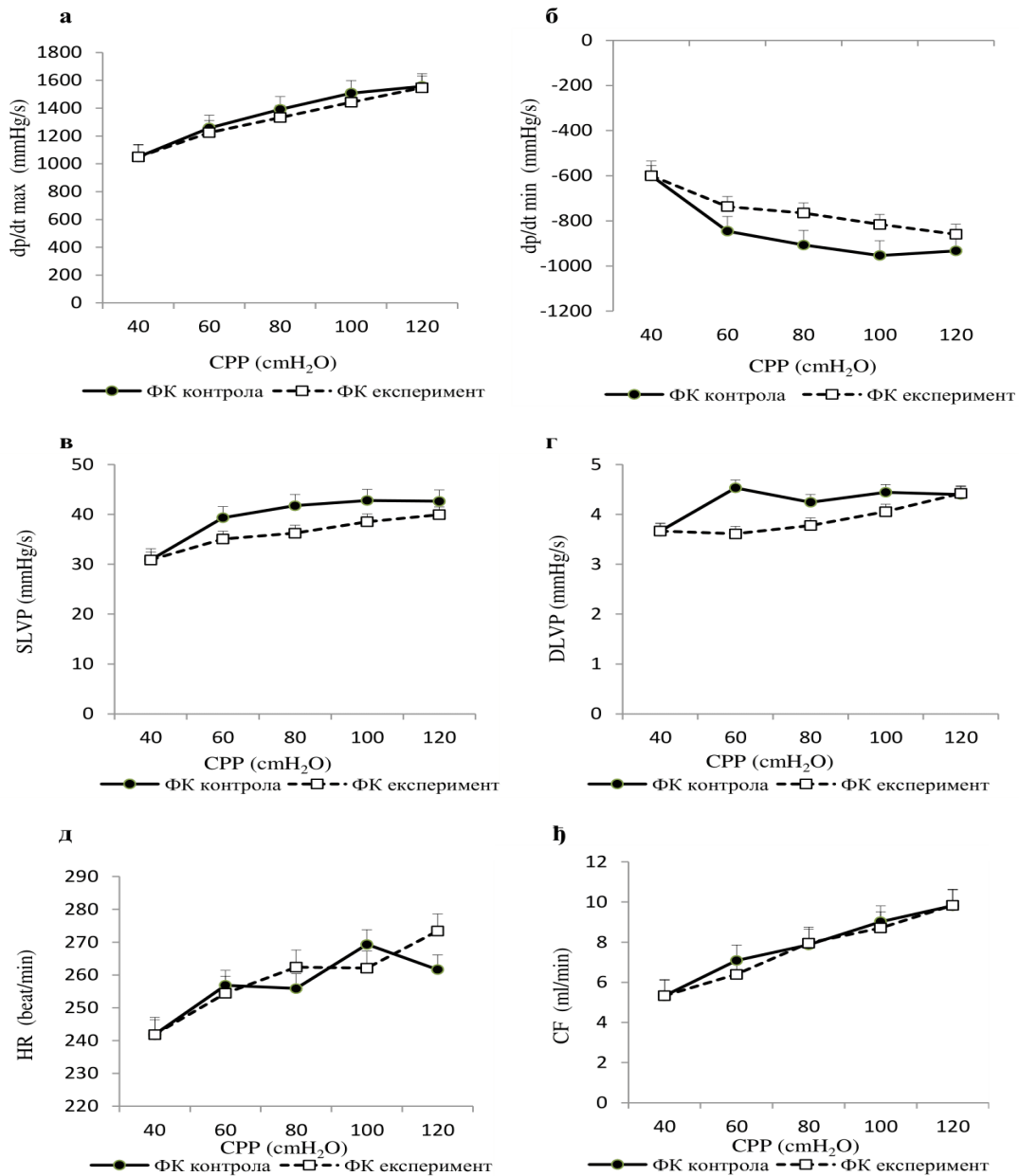
CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	К	Е	К	Е	К	Е
<b>40</b>	880,36 ± 197,1	880,36 ± 197,1	-488,5 ± 155,0	-488,5 ± 155,0	19,3 ± 6,3	19,3 ± 6,3
<b>60</b>	1100,42 ± 217,0	1181,8 ± 196,7	-581,3 ± 151,7	-580,5 ± 106,1	20,9 ± 6,0	20,8 ± 5,4
<b>80</b>	1169,3 ± 206,3	1247,0 ± 96,4	-591,6 ± 155,0	-612,7 ± 82,7	21,1 ± 6,0	21,3 ± 4,9
<b>100</b>	1184,64 ± 257,8	1366,9 ± 152,5	-575,6 ± 191,9	-666,3 ± 125,6	21,2 ± 5,8	22,3 ± 5,2
<b>120</b>	956,06 ± 109,8	1399,9 ± 219,5	-484,8 ± 57,2	-656,2 ± 187,3	18,8 ± 4,8	22,7 ± 5,8
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	К	Е	К	Е	К	Е
<b>40</b>	1,9 ± 0,9	1,9 ± 0,9	281,9 ± 30,3	281,9 ± 30,3	6,5 ± 2,5	6,5 ± 2,5
<b>60</b>	1,4 ± 1,1	1,1 ± 0,9	295,4 ± 41,2	273,7 ± 102,4	8,8 ± 3,1	8,2 ± 3,0
<b>80</b>	1,2 ± 1,0	1,1 ± 0,8	307,0 ± 48,6	275,5 ± 89,8	10,3 ± 4,4	9,8 ± 5,4
<b>100</b>	1,1 ± 0,8	1,0 ± 0,8	307,2 ± 21,3	300,4 ± 111,3	12,1 ± 7,1	11,0 ± 7,4
<b>120</b>	1,1 ± 1,1	1,0 ± 1,2	258,2 ± 84,0	269,2 ± 79,0	13,6 ± 8,5	12,9 ± 10,5

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. dp/dt max – максимална стопа раста притиска, dp/dt min – минимална стопа раста притиска, SLVP – систолни притисак, DLVP – дијастолни притисак, HR – фреквенца рада срца, CF – коронарни проток

Статистички значајне разлике након примене диклофена у контролним и експерименталним условима регистроване су само у максималној стопи промене притиска у левој комори (dp/dt max) при коронарном притиску од 120 cmH<sub>2</sub>O.

#### 4.1.2. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова

Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказан је на *Графикону 2* и у *Табели 4.2*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ .



**Графикон 2.** Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на кардиодинамске параметре и коронарни проток на различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

а)  $dp/dt \max$  – максимална стопа раста притиска, б)  $dp/dt \min$  – минимална стопа раста притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, д) HR – фреквенца рада срца, њ) CF – коронарни проток. Стастички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Mann-Whitney-ovim тестом и приказане једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$

**Табела 4.2.** Ефекти акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на кардиодинамске параметре и коронарни проток при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) у експерименталним и контролним условима.

CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	К	Е	К	Е	К	Е
<b>40</b>	1049,1 ± 405,7	1049,1 ± 405,7	-599,4 ± 252,1	-599,4 ± 252,1	30,9 ± 12,4	30,9 ± 12,4
<b>60</b>	1257,9 ± 601,8	1224,2 ± 482,1	-845,6 ± 381,8	-736,8 ± 276,8	39,3 ± 16,1	35,1 ± 13,3
<b>80</b>	1391,4 ± 677,2	1332,8 ± 528,6	-907,1 ± 426,1	-765,1 ± 286,9	41,7 ± 18,1	36,2 ± 13,8
<b>100</b>	1507,8 ± 633,7	1442,7 ± 518,2	-953,4 ± 370,4	-815,5 ± 283,5	42,8 ± 16,8	38,5 ± 14,2
<b>120</b>	1557,1 ± 690,0	1546,7 ± 621,2	-932,8 ± 408,2	-859,2 ± 321,3	42,6 ± 18,3	40,0 ± 14,8
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	К	Е	К	Е	К	Е
<b>40</b>	3,7±1,5	3,7±1,5	241,8±32,8	241,8 ± 32,8	5,3 ± 0,7	5,3 ± 0,7
<b>60</b>	4,5±2,2	3,6±1,8	256,9±26,6	254,4 ± 26,3	7,1 ± 0,9	6,4 ± 0,8
<b>80</b>	4,2±2,2	3,8±1,8	255,9±25,2	262,4 ± 32,5	7,9 ± 1,0	8,0 ± 1,2
<b>100</b>	4,4±2,0	4,1±2,0	269,3±30,3	262,1 ± 33,1	9,0 ± 1,3	8,7 ± 1,5
<b>120</b>	4,4±2,6	4,4±2,1	261,7±32,3	273,4 ± 34,1	9,8 ± 1,8	9,8 ± 2,3

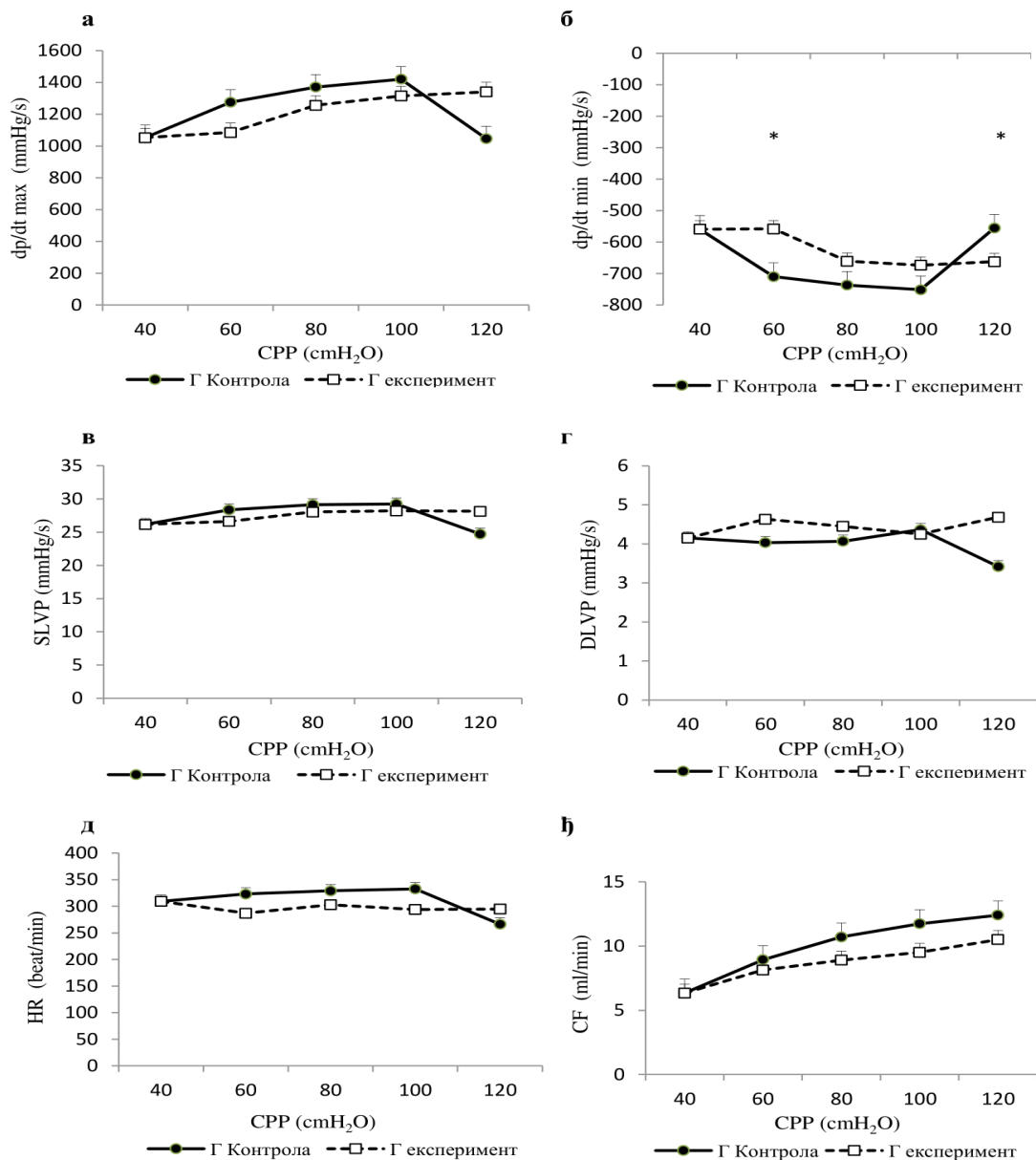
Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. dp/dt max – максимална стопа раста притиска, dp/dt min – минимална стопа раста притиска, SLVP – систолни притисак, DLVP – дијастолни притисак, HR – фреквенција рада срца, CF – коронарни проток

Нису забележене статистички значајне разлике између кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима након примене фолне киселине.

#### **4.1.3. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова**

Утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на кардиодинамске параметре и коронарни проток приказан је на *Графикону 3* и у *Табели 4.3*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$ .





**Графикон 3.** Утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на кардионамику и коронарни проток при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

а)  $dp/dt \max$  – максимална стопа раста притиска, б)  $dp/dt \min$  – минимална стопа раста притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, д) HR – фреквенца рада срца, ж) CF – коронарни проток. Стастички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Mann Whitney - ovit тестом и приказане једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$

**Табела 4.3.** Ефекти акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на кардиодинамику и коронарни проток при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

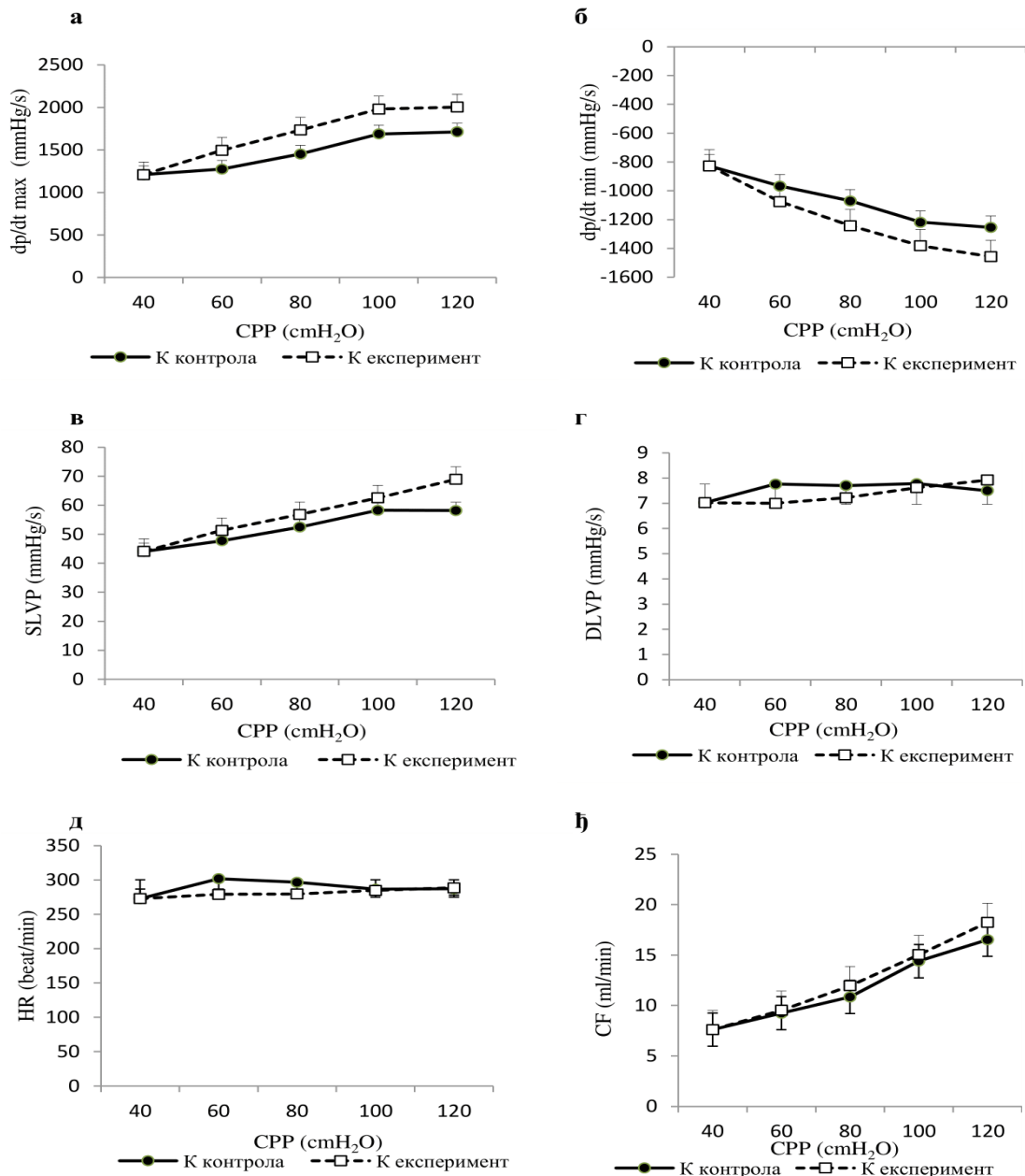
CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	К	Е	К	Е	К	Е
<b>40</b>	1052,7 ± 274,6	1052,7 ± 274,6	-558,9 ± 87,4	-558,9 ± 87,4	26,2 ± 3,7	26,2 ± 3,7
<b>60</b>	1275,0 ± 203,8	1085,0 ± 181,0	-709,6 ± 60,2	-557,8 ± 162,0	28,4 ± 3,0	26,6 ± 2,2
<b>80</b>	1370,3 ± 250,1	1256,1 ± 283,8	-736,6 ± 84,5	-660,8 ± 217,4	29,2 ± 2,8	28,0 ± 3,1
<b>100</b>	1420,7 ± 319,0	1315,1 ± 387,6	-751,3 ± 142,6	-673,5 ± 237,0	29,3 ± 4,2	28,2 ± 4,3
<b>120</b>	1046,0 ± 276,4	1340,9 ± 454,4	-555,6 ± 99,5	-662,2 ± 256,9	24,7 ± 4,2	28,1 ± 5,6
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	К	Е	К	Е	К	Е
<b>40</b>	4,2 ± 2,0	4,2 ± 2,0	309,3 ± 66,0	309,3 ± 66,0	6,3 ± 2,1	6,3 ± 2,1
<b>60</b>	4,0 ± 1,9	4,6 ± 2,8	323,0 ± 59,5	287,0 ± 70,2	8,9 ± 2,6	8,1 ± 3,4
<b>80</b>	4,1 ± 1,9	4,5 ± 2,8	329,0 ± 60,0	302,8 ± 78,2	10,7 ± 3,7	8,9 ± 3,9
<b>100</b>	4,4 ± 2,5	4,3 ± 2,3	332,6 ± 58,3	294,0 ± 57,3	11,7 ± 3,7	9,5 ± 3,9
<b>120</b>	3,4 ± 1,9	4,7 ± 3,0	266,4 ± 47,2	294,8 ± 57,6	12,4 ± 3,5	10,5 ± 3,9

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ( $X \pm SD$ ) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. dp/dt max – максимална стопа раста притиска, dp/dt min – минимална стопа раста притиска, SLVP – систолни притисак, DLVP – дијастолни притисак, HR – фреквенца рада срца, CF – коронарни проток

Статистички значајне разлике након примене гентамицина између контролних и експерименталних услова су регистроване у минималној стопи промене притиска (dt/dt min) при коронарним притисцима од 60 и 120 cmH<sub>2</sub>O.

#### 4.1.4. Контролна група

Кардионамски параметри и коронарни проток при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) у контролној групи приказан је на *Графикону 4* и у *Табели 4.4*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$ . Није регистрована статистички значајна разлика у испитиваним кардиодинамским параметрима у контролним и експерименталним условима у контролној групи пацова, тј групи која третирана физиолошким раствором.



**Графикон 4.** Кардионамски параметри и коронарни проток при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) у контролној групи

а)  $dp/dt \max$  – максимална стопа раста притиска, б)  $dp/dt \min$  – минимална стопа раста притиска, в) SLVP – систолни притисак, г) DLVP – дијастолни притисак, д) HR – фреквенца рада срца, е) CF – коронарни проток. Статистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Mann Whitney - ovit тестом и приказане једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$

**Табела 4.4** Кардионамски параметри и коронарни проток при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) у контролној групи

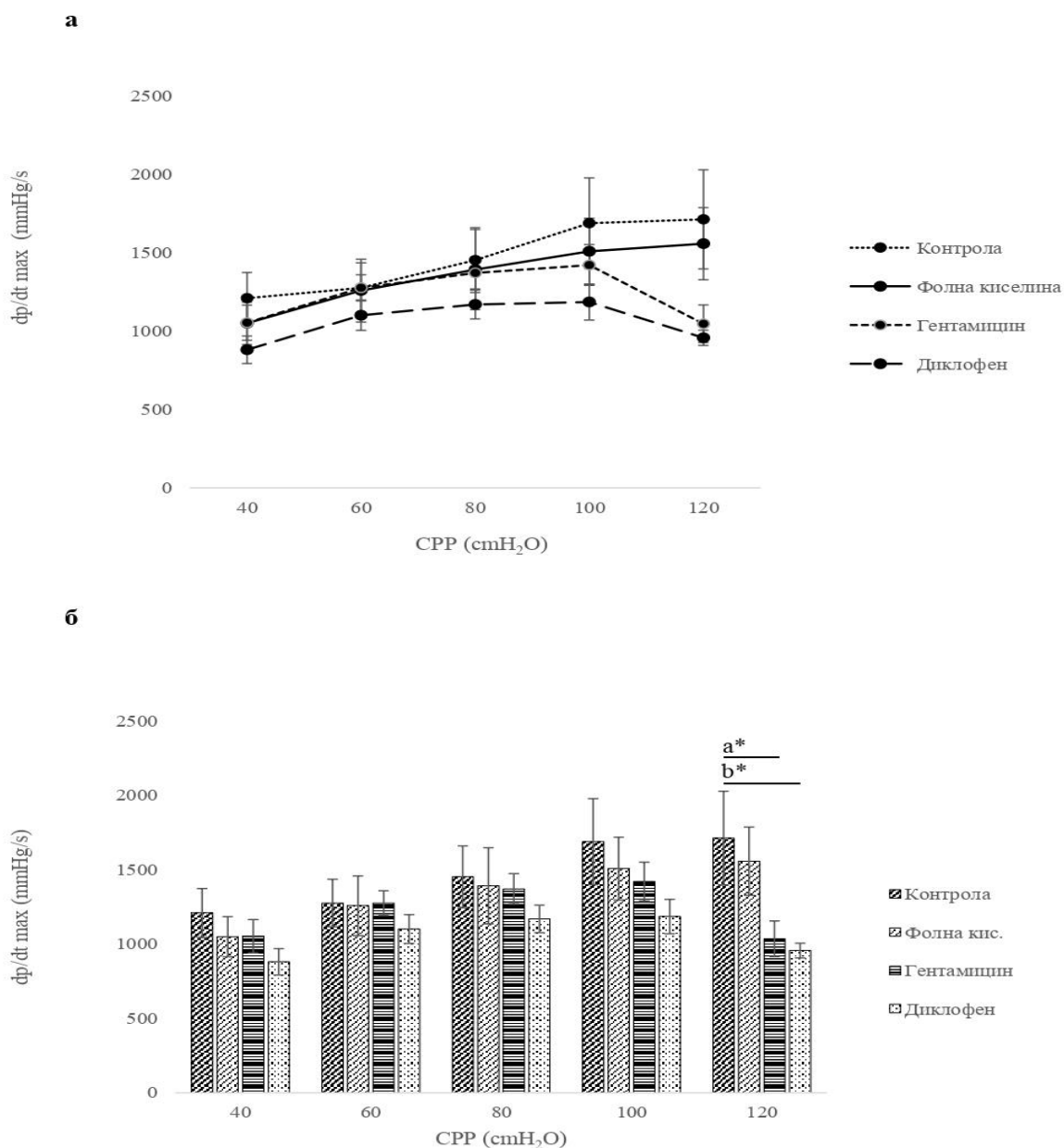
CPP	dp/dt max (mmHg/s)		dp/dt min (mmHg/s)		SLVP (mmHg)	
	К	Е	К	Е	К	Е
<b>40</b>	1209,0 ± 366,8	1209,0 ± 366,8	-828,1 ± 328,7	-828,1 ± 328,7	44,1 ± 8,8	44,1 ± 8,8
<b>60</b>	1275,2 ± 357,6	1496,3 ± 384,6	-966,5 ± 335,0	1496,3 ± 384,6	47,8 ± 9,1	51,3 ± 9,0
<b>80</b>	1452,0 ± 463,7	1734,2 ± 373,2	-1070,0 ± 391,0	-1242,3 ± 335,1	52,5 ± 11,8	56,8 ± 10,6
<b>100</b>	1688,3 ± 645,6	1981,5 ± 508,9	-1218,1 ± 470,8	-1381,4 ± 415,7	58,3 ± 15,7	62,6 ± 14,0
<b>120</b>	1711,8 ± 707,1	2003,4 ± 548,4	-1254,1 ± 610,1	-1457,0 ± 422,4	58,2 ± 16,1	69,0 ± 16,4
CPP	DLVP (mmHg)		HR (bpm)		CF (ml/min)	
	К	Е	К	Е	К	Е
<b>40</b>	7,0 ± 1,7	7,0 ± 1,7	272,9 ± 31,3	272,9 ± 31,3	7,6 ± 2,2	7,6 ± 2,2
<b>60</b>	7,8 ± 1,6	7,0 ± 1,7	301,9 ± 21,4	279,1 ± 45,8	9,2 ± 1,2	9,5 ± 2,5
<b>80</b>	7,7 ± 1,6	7,2 ± 1,7	296,7 ± 33,5	279,6 ± 39,7	10,8 ± 1,8	12,0 ± 2,9
<b>100</b>	7,8 ± 1,5	7,6 ± 1,4	286,6 ± 37,6	284,8 ± 43,1	14,4 ± 4,9	15,0 ± 5,5
<b>120</b>	7,5 ± 1,8	7,9 ± 1,5	287,2 ± 33,2	288,5 ± 38,9	16,5 ± 6,1	18,2 ± 7,7

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну девијацију ( $X \pm SD$ ) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. dp/dt max –максимална стопа развоја притиска, dp/dt min –минимална стопа промене притиска, SLVP –сistolни притисак, DLVP –дијастолни притисак, HR –фреквенца рада срца, CF–коронарни проток

Нису забележене статистички значајне разлике између кардиодинамских параметара у контролним и експерименталним условима у контролној групи.

#### **4.1.5. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на максималну стопу промене притиска леве коморе (dp/dt max) изолованог срца пацова**

Разлике у ефектима акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на максималну стопу промене притиска (dp/dt max) изолованог срца пацова приказани су на *Графикону 5*. Највеће вредности овог параметра забележене су у контролној групи док су најниже забележене у диклофен групи. Статистички значајно ниже вредности максималне стопе промене притиска (dp/dt max) забележене су у диклофен и гентамицин групи у односу на контролну групу при вредностима коронарног притиска од 120 cmH<sub>2</sub>O.

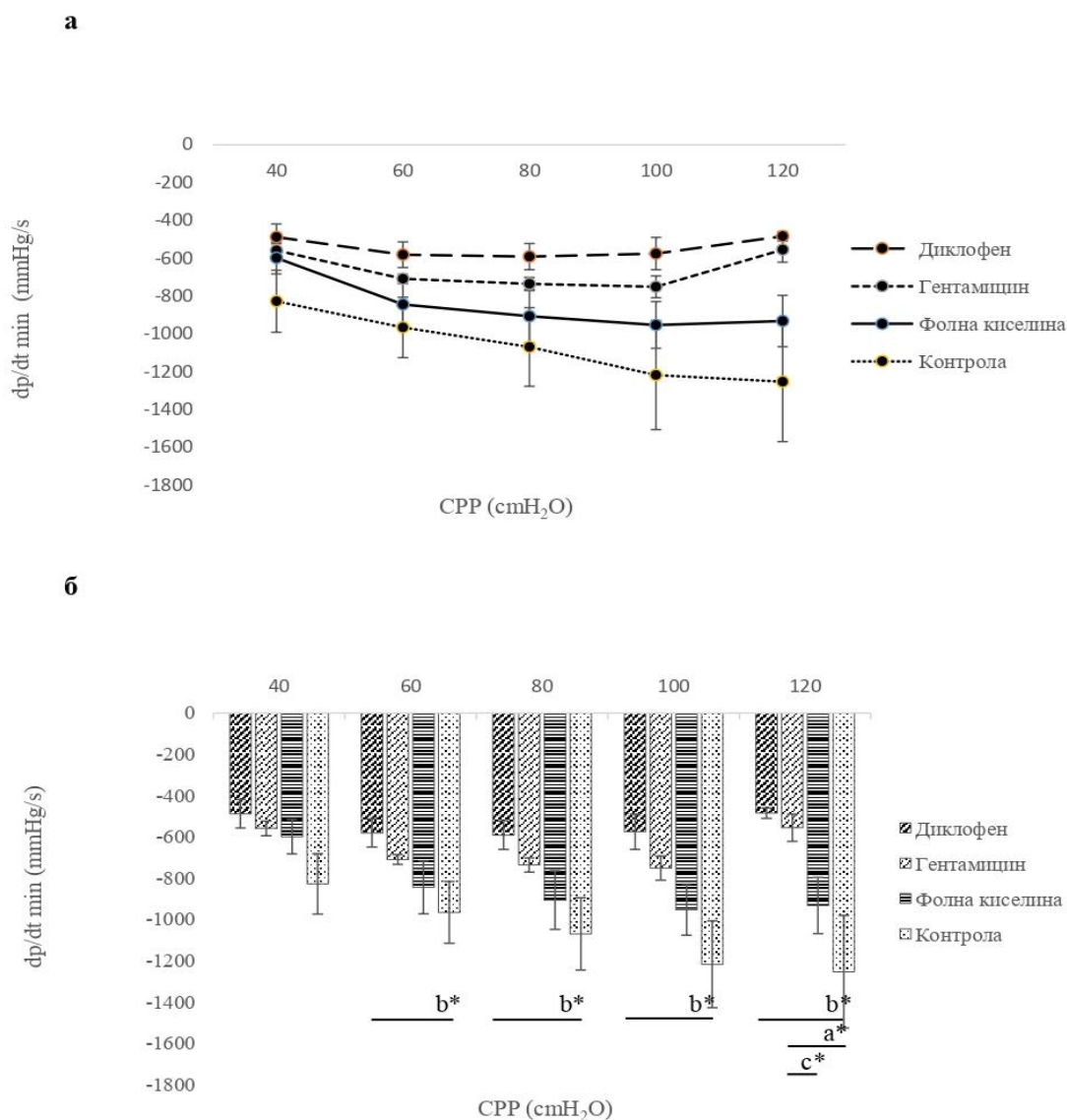


**Графикон 5.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на максималну стопу промене притиска леве коморе ( $dp/dt \max$ ) при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ).

а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ  $dp/dt \max$  – максимална стопа раста притиска, статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездicom (\*) уколико је  $p < 0,05$ , а – гентамицин vs контролна група, б – диклофен vs контролна група

#### **4.1.6. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на минималну стопу промене притиска леве коморе ( $dp/dt \text{ min}$ )**

Разлике у ефектима акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на минималну стопу промене притиска ( $dp/dt \text{ min}$ ) изолованог срца пацова приказани су на Графикону 6. Вредности минималне стопе промене притиска ( $dp/dt \text{ min}$ ) су биле значајно статистички повишене у диклофен групи у односу на контролну групу при вредностима коронарног притиска од 60 до 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ . Док су вредности поменутог параметра биле статистички значајно повишене у групи третираној гентамицином у односу на контролну и групу третираном фолном киселином при коронарном перфузионом притиску од 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ .



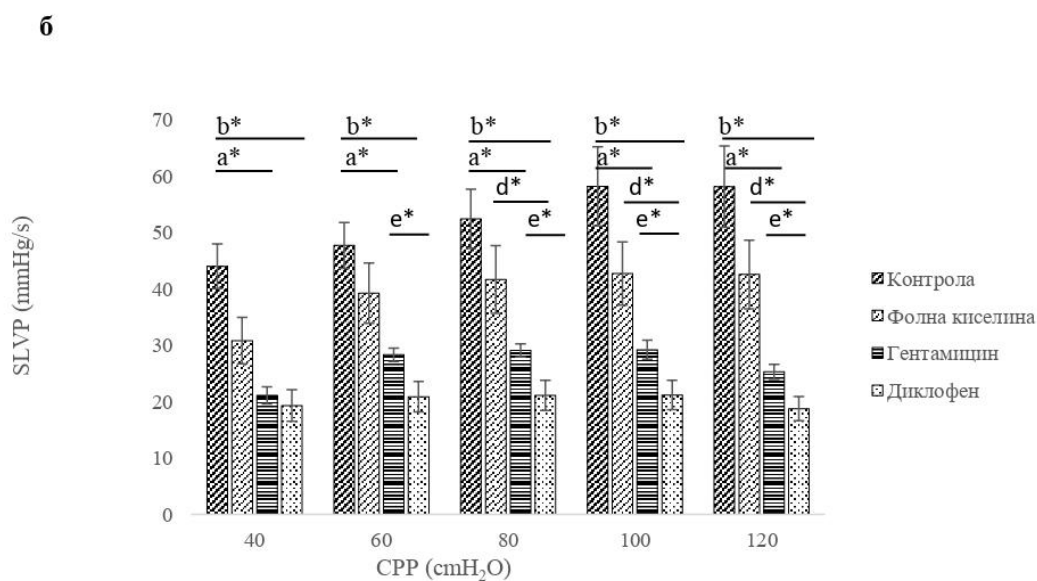
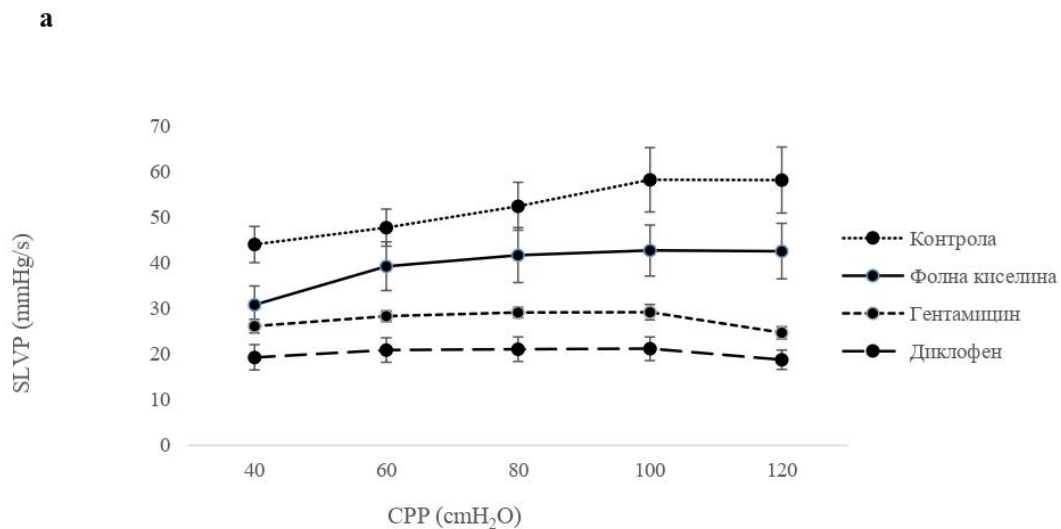
**Графикон 6.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на минималну стопу промене притиска леве коморе ( $dp/dt \text{ min}$ ) при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ ).

а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ  $dp/dt \text{ min}$  – минимална стопа промене притиска, статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ , а – гентамицин vs контролна група, б – диклофен vs контролна група, с – фолна к. vs гентамицин група

#### 4.1.7. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на систолни притисак леве коморе (SLVP)

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на систолни притисак леве коморе (SLVP) приказано је на *Графикону 7*. Статистички значајно снижене вредности систолног притиска леве коморе су забележене у диклофен и гентамицин групи у односу на контролну групу при свим вредностима коронарно перфузионог притиска,

док је група третирана фолном киселином показала статистички значајно повишене вредности при перфузионом притиску од 80-120 cmH<sub>2</sub>O у односу на диклофен групу. Гентамицин група је показала статистички значајно повишене вредности у односу на диклофен групу при перфузионом притиску од 60-120 cmH<sub>2</sub>O.



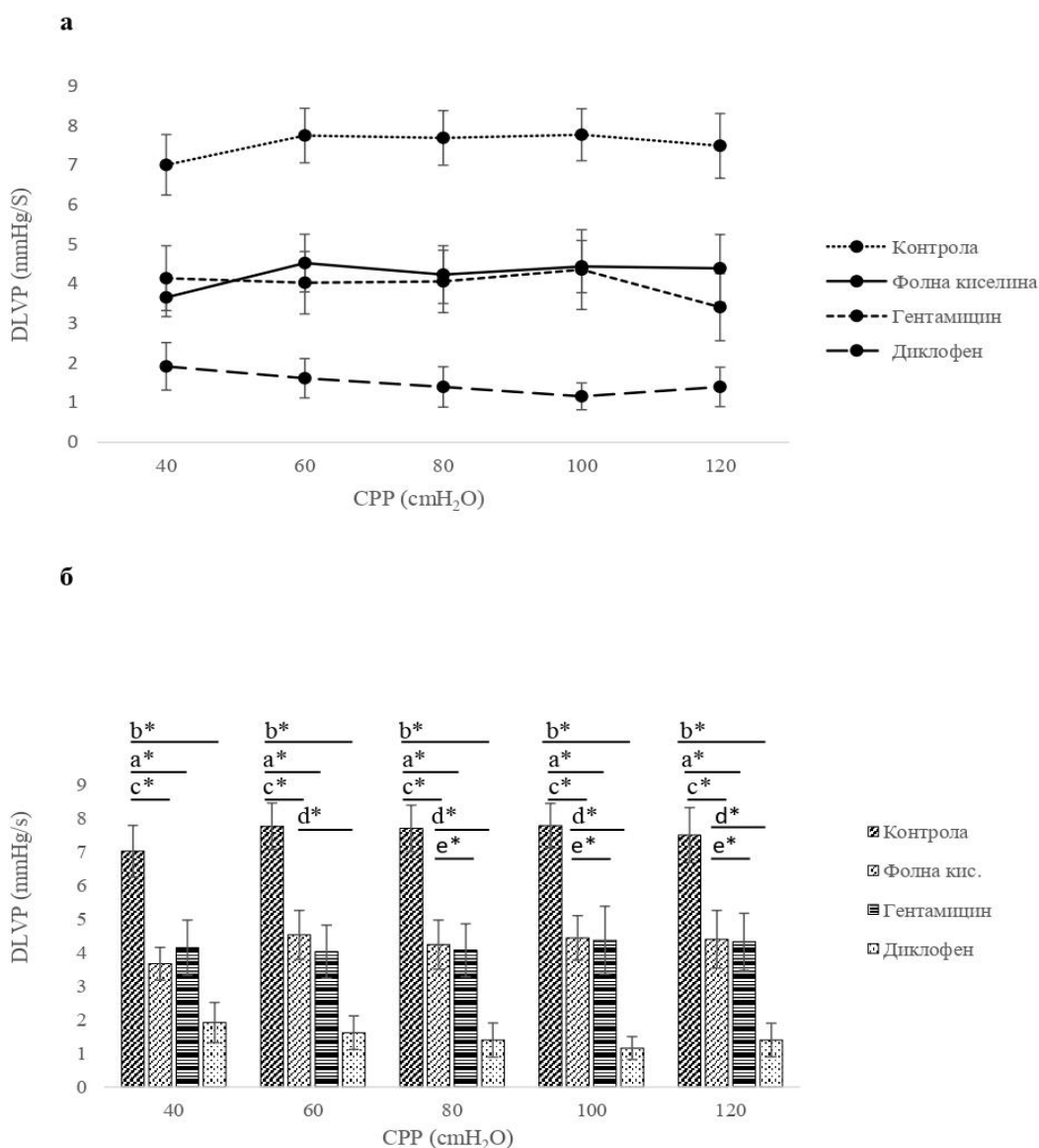
**Графикон 7.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на систолни притисак леве коморе (SLVP) при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ SLVP – систолни притисак леве коморе, статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ , а – гентамицин vs контролна група, b – диклофен vs контролна група, d – фолна к. vs диклофен група, e – диклофен vs гентамицин група



#### **4.1.8. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на дијастолни притисак леве коморе (DLVP)**

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на дијастолни притисак леве коморе (DLVP) приказано је на *Графикону 8*. Поређењем група регистроване су статистички значајно снижене вредности дијастолног притиска леве коморе код диклофен, гентамицин и групе третиране фолном киселином у односу на контролну групу третираном физиолошким раствором при свим вредностима коронарног перфузионог притиска 40-120 cmH<sub>2</sub>O. Такође су регистроване статистички значајно ниже вредности дијастолног притиска леве коморе у диклофен групи у односу на групу третирану гентамицином при коронарном перфузионом притиску од 80-120 cmH<sub>2</sub>O и у односу на групу третирану фолном киселином при коронарном перфузионом притиску од 60-80 cmH<sub>2</sub>O.



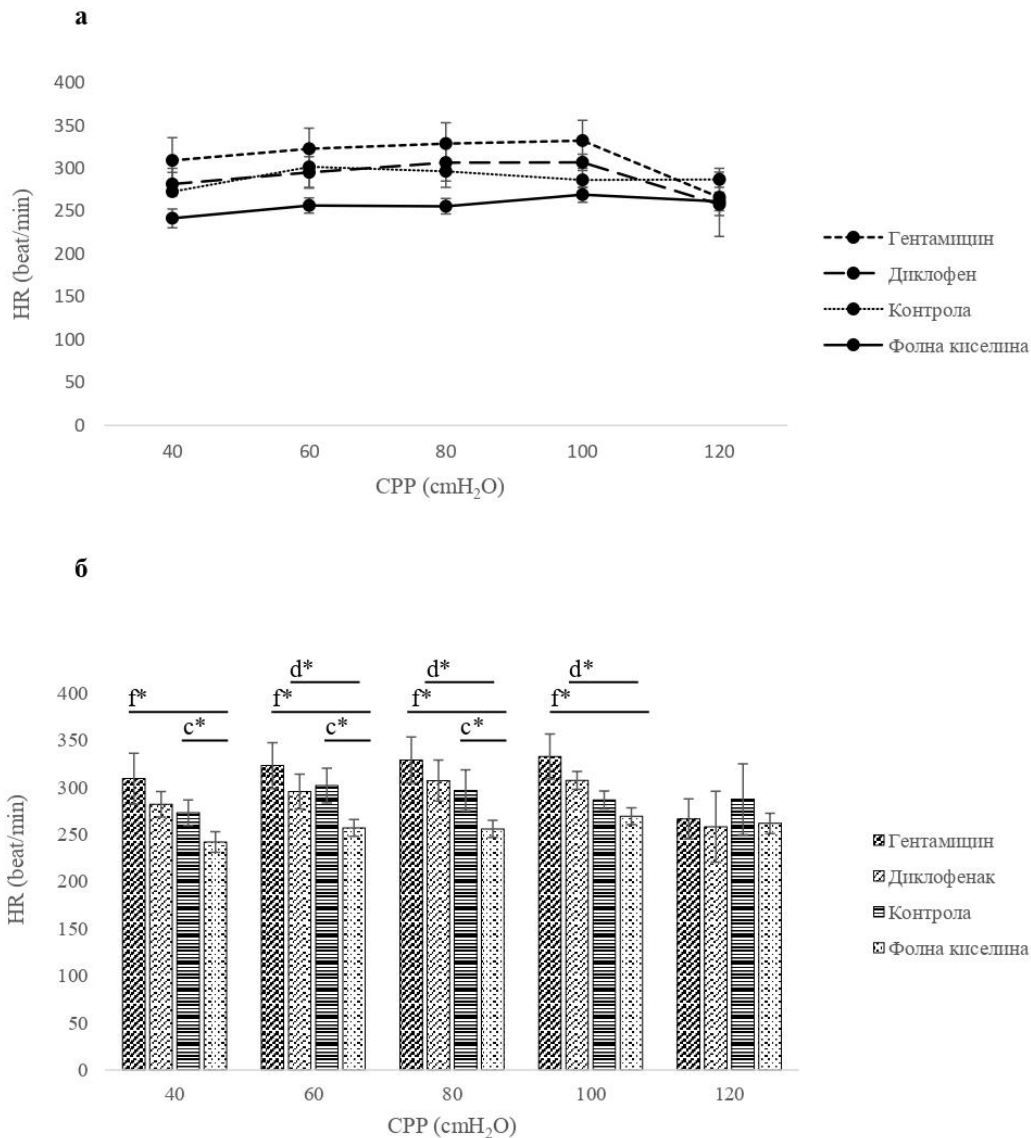
**Графикон 8.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на дијастолни притисак леве коморе (DLVP) при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ SLVP – систолни притисак леве коморе, статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ , а – гентамицин vs контролна група, б – диклофен vs контролна група, с- фолна к. vs контролна група, d – фолна к. vs диклофен група, е - диклофен vs гентамицин група

#### 4.1.9. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на срчану фреквенцу (HR)

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на срчану фреквенцу (HR) приказано је

на *Графикону 9*. Приликом поређења вредности срчане фреквенце код различитих група регистрована је статистичка значајност у групи третираној фолном киселином и то статистички значајно снижене вредности наведеног параметра у односу на све три групе, при коронарним притисцима од 60-100 cmH<sub>2</sub>O у односу на групу третираном диклофеном, 40-80 cmH<sub>2</sub>O у односу на контролну групу и при притиску од 40-100 cmH<sub>2</sub>O у односу на гентамицин групу.

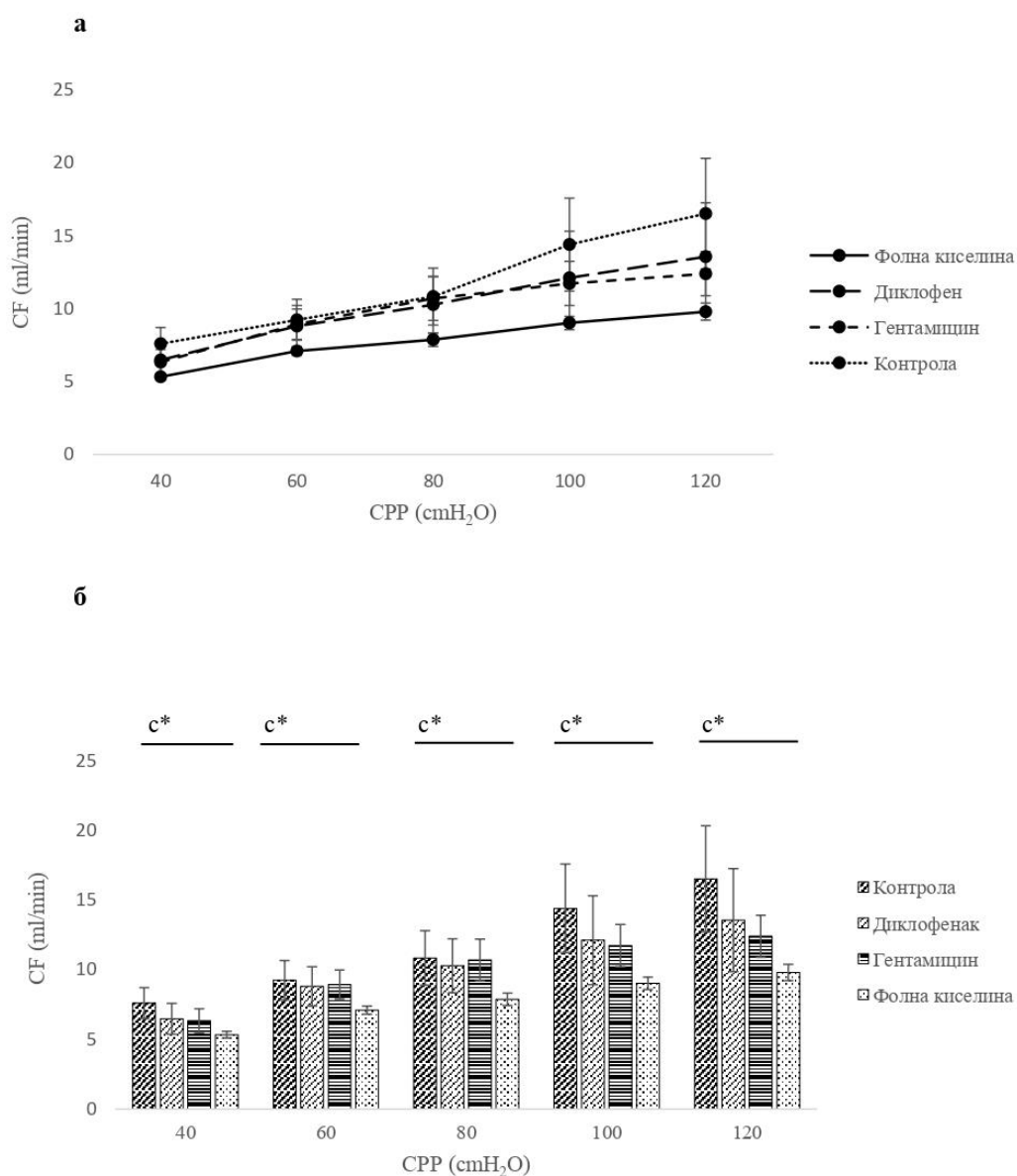


**Графикон 9.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на срчану фреквенцу (HR) при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ SLVP – систолни притисак леве коморе, статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$ , c - фолна к. vs контролна група, d – фолна к. vs диклофен група, f - фолна к. vs гентамицин група

#### **4.1.10. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на коронарни проток (CF)**

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на коронарни проток (CF) приказано је на *Графикону 10*. Приликом поређења коронарног протока код различитих група регистрована је статистички значајна разлика у виду смањења коронарног протока у групи животиња третираних фолном киселином у односу на контролну групу при свим вредностима коронарног притиска CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).



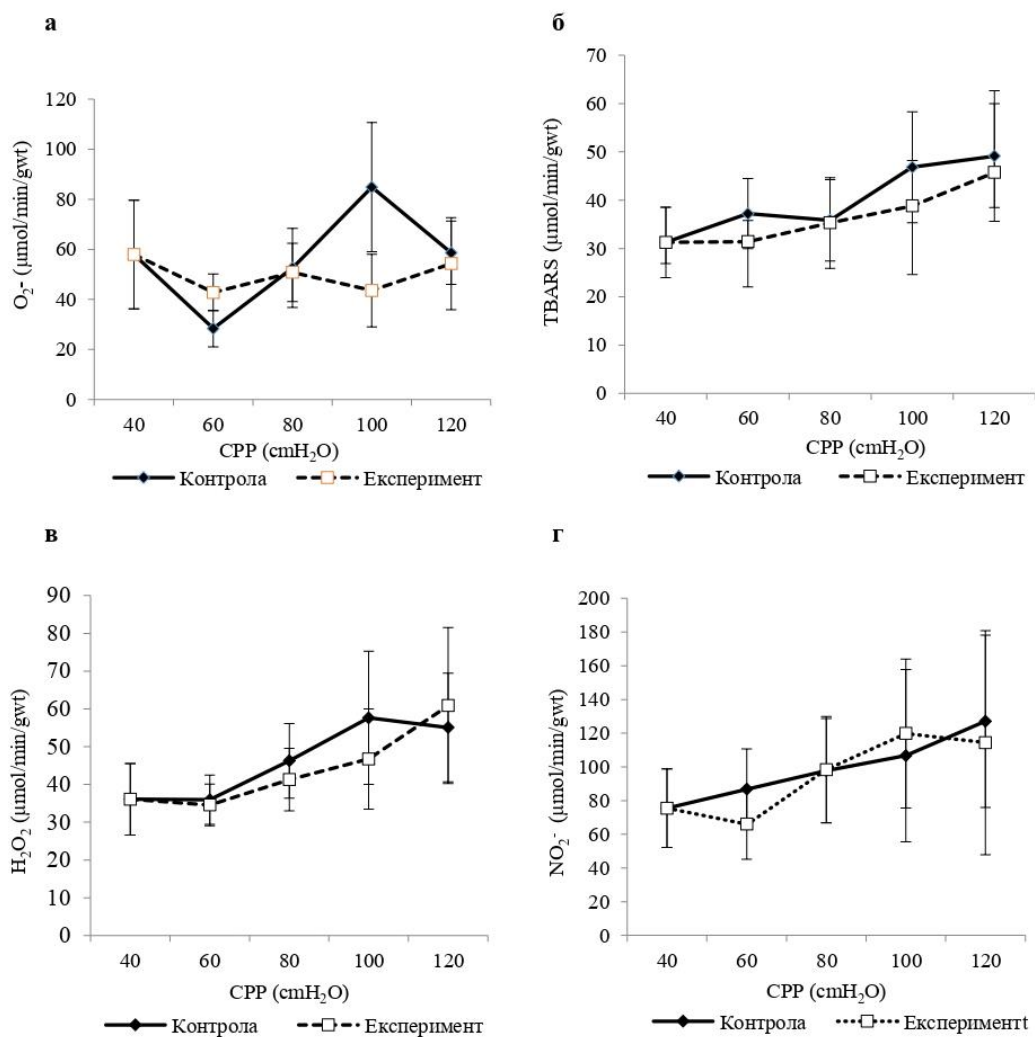
**Графикон 10.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на коронарни проток (CF) при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ SLVP – систолни притисак леве коморе, стаистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ , c - фолна к. vs контролна група

## **4.2. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, фолном киселином, гентамицином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту**

### **4.2.1. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту**

Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказан је у табели 4.5. на *Графикону 11*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ . Није регистрована статистички значајна разлика у испитиваним кардиодинамским параметрима у контролним и експерименталним условима у диклофенак групи.



**Графикон 11.** Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

а) O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анјон радикал, б) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксид, в) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - нитрити, г) TBARS – индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Манн-Уитнеу-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (\*) уколико је p < 0,05

Табела 4.5. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

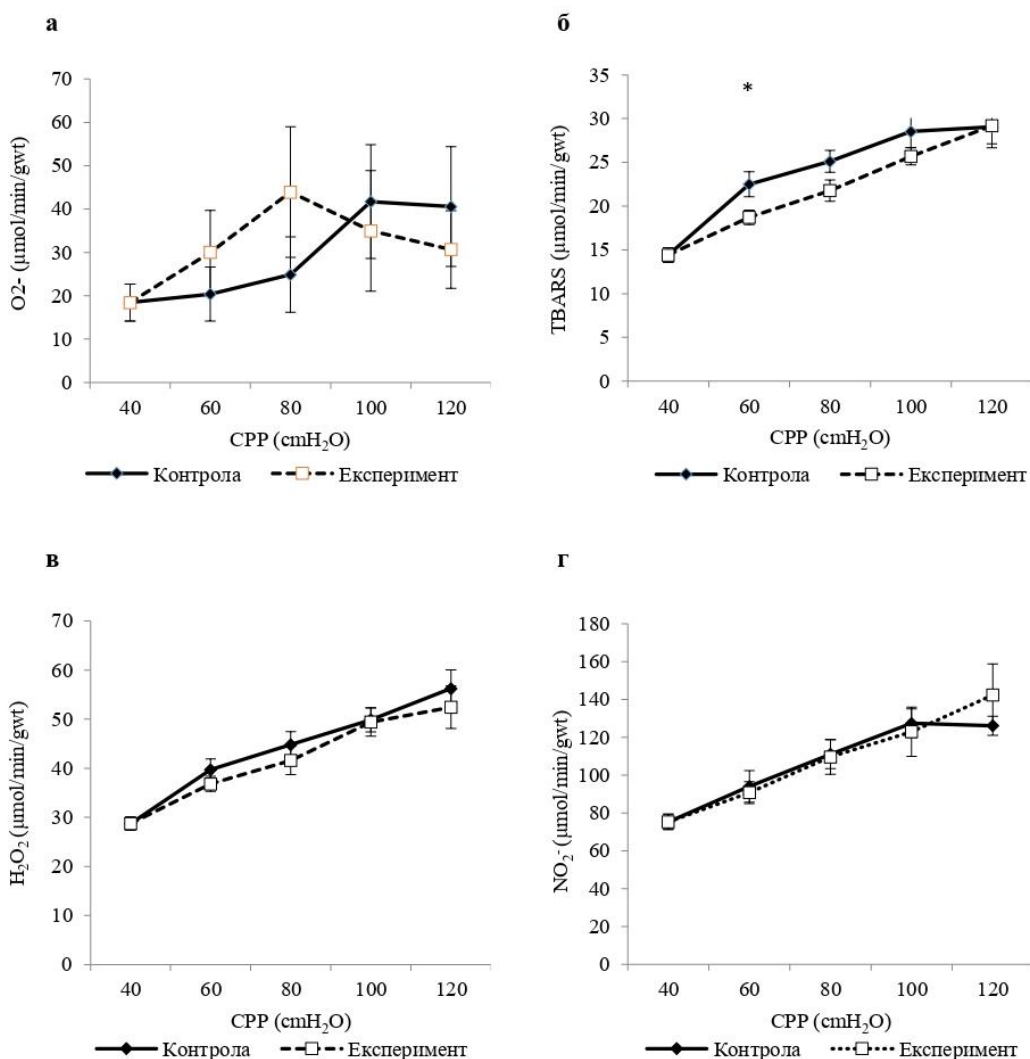
CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	57,94 ± 21,72	57,94 ± 21,72	36,10 ± 9,47	36,10 ± 9,47
60	28,32 ± 7,30	42,76 ± 7,38	35,93 ± 6,51	34,56 ± 5,52
80	52,56 ± 15,82	50,82 ± 11,65	46,26 ± 9,87	41,28 ± 8,26
100	84,87 ± 25,85	43,52 ± 14,53	57,64 ± 17,64	46,75 ± 13,27
120	58,62 ± 12,66	54,26 ± 18,35	55,06 ± 14,38	60,86 ± 20,64
CPP	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		TBARS (μmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	75,48 ± 23,27	75,48 ± 23,27	31,26 ± 7,27	31,26 ± 7,27
60	86,77 ± 23,83	66,05 ± 20,83	37,22 ± 7,26	31,42 ± 4,40
80	97,80 ± 31,02	98,36 ± 31,52	35,83 ± 8,41	35,32 ± 9,35
100	106,70 ± 51,11	119,80 ± 44,26	13,87 ± 11,49	38,81 ± 9,41
120	127,11 ± 51,11	114,39 ± 66,46	49,13 ± 13,50	45,76 ± 14,19

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анјон радикал, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксид, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - нитрити, TBARS - индекс липидне пероксидације.

#### 4.2.2. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на параметре оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова

Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказан је у табели 4.5. на *Графикону 12*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$ . Вредност TBARS-а је била статистички значајно снижена у ефлуенту у експерименталним условима при коронарном притиску од 60 mmH<sub>2</sub>O.





**Графикон 12.** Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O)

а) O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анјон радикал, б) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксид, в) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - нитрити, г) TBARS - индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Mann Whitney-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (\*) уколико је p<0,05

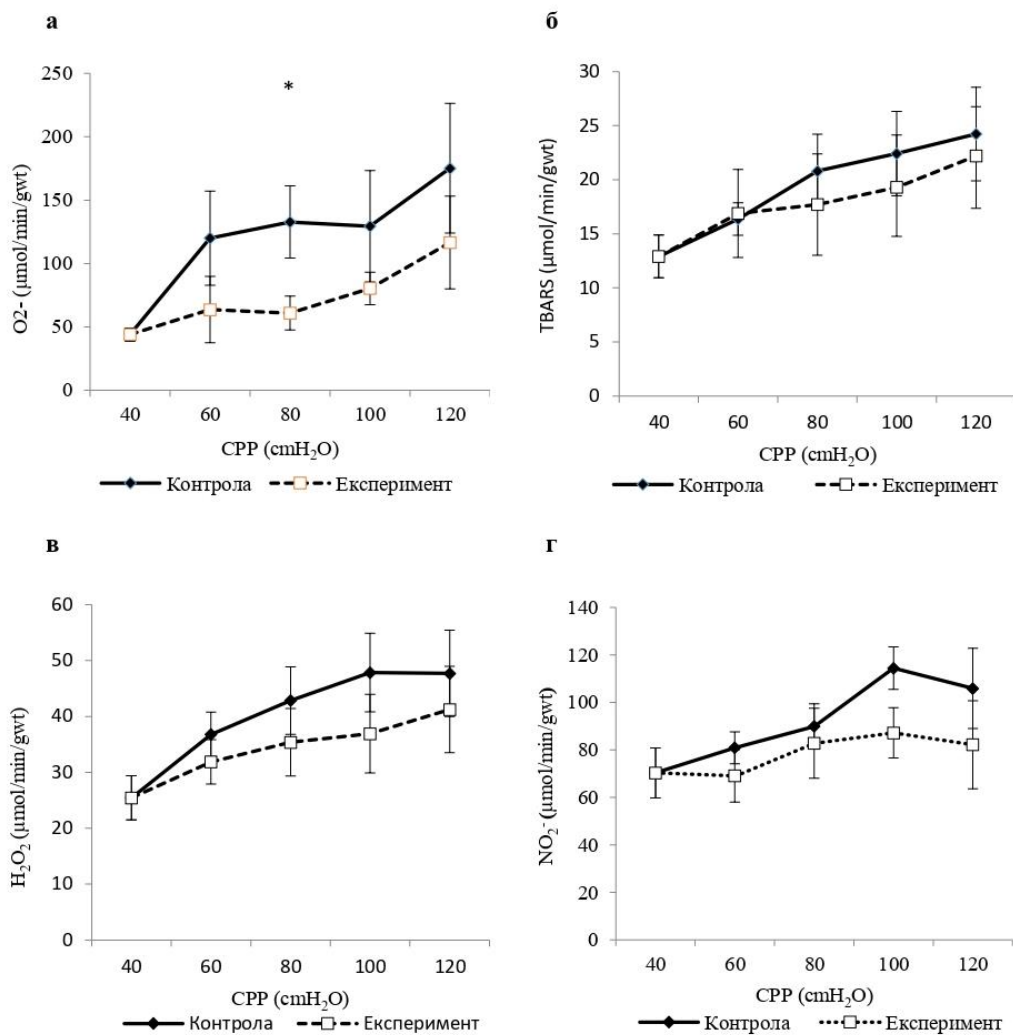
Табела 4.6. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O)

CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	18,44 ± 4,28	18,44 ± 4,28	28,72 ± 1,34	28,72 ± 1,34
60	20,38 ± 6,24	30,04 ± 9,64	39,71 ± 2,19	36,80 ± 1,55
80	24,87 ± 8,70	43,92 ± 15,08	44,81 ± 2,64	41,60 ± 2,93
100	41,72 ± 13,15	34,97 ± 13,95	49,86 ± 2,45	49,40 ± 2,87
120	40,57 ± 13,82	30,68 ± 8,95	56,23 ± 3,80	52,43 ± 4,37
CPP	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		TBARS (μmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	75,34 ± 4,03	75,34 ± 4,03	14,41 ± 0,84	14,41 ± 0,84
60	94,05 ± 8,32	90,78 ± 5,85	22,50 ± 1,43	18,72 ± 0,83
80	111,07 ± 7,56	109,67 ± 9,23	25,12 ± 1,24	21,78 ± 1,23
100	127,43 ± 7,55	123,01 ± 13,01	28,53 ± 1,82	25,69 ± 0,97
120	126,14 ± 5,00	142,37 ± 16,48	29,06 ± 2,41	29,20 ± 2,06

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анјон радикал, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксид, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - нитрити, TBARS - индекс липидне пероксидације

#### 4.2.3. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на параметре оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова

Утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту у контролним и експерименталним условима приказан је у табели 4.7. и на *Графикону 13*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$ . Вредност O<sub>2</sub><sup>-</sup> а је била статистички значајно снижена у ефлуенту у експерименталним условима при коронарном притиску од 80 mmH<sub>2</sub>O.



**Графикон 13.** Утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O)

а) O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анјон радикал, б) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксид, в) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - нитрити, г) TBARS - индекс липидне пероксидације. Стастички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Mann Whitney-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездicom (\*) уколико је p < 0,05

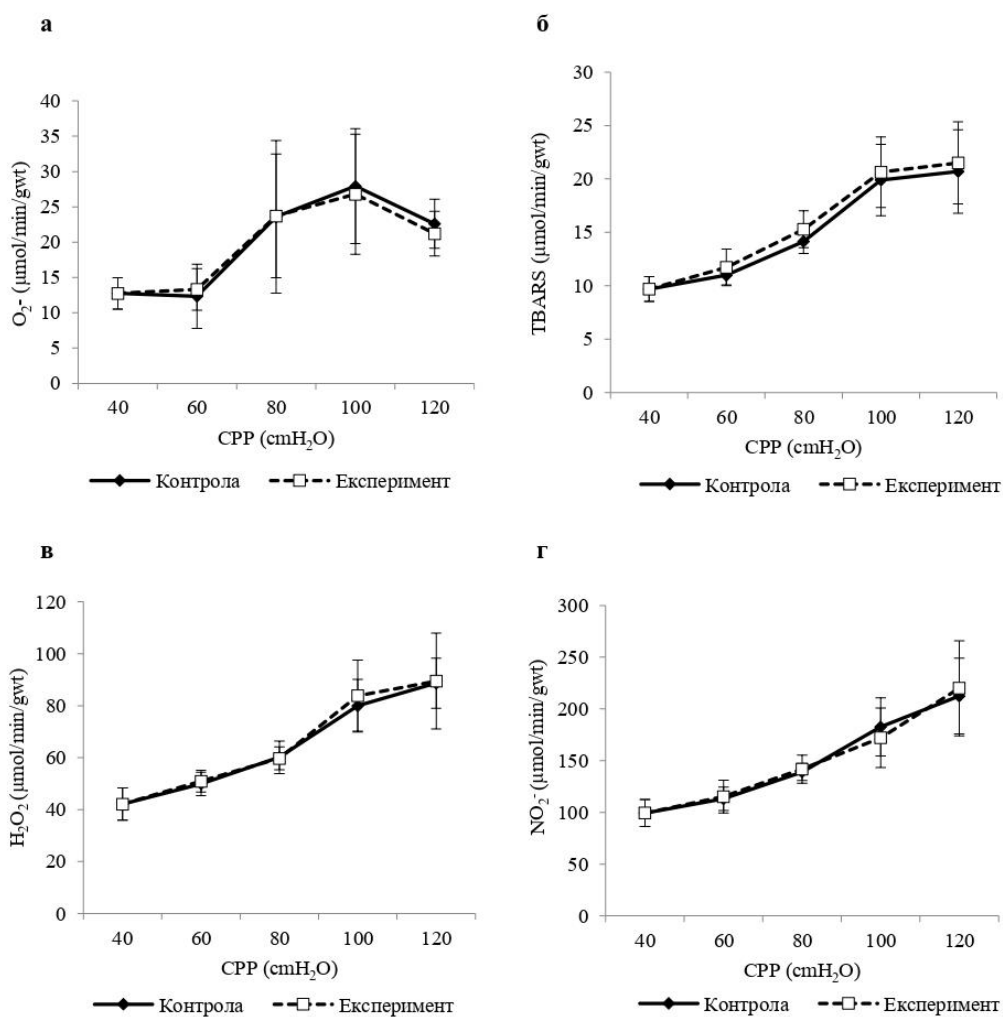
Табела 4.7. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином на параметре оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O).

CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	44,00 ± 5,23	44,00 ± 5,23	25,44 ± 3,97	25,44 ± 3,97
60	120,04 ± 37,18	63,62 ± 26,17	36,79 ± 3,99	31,88 ± 4,92
80	132,79 ± 28,41	60,87 ± 13,35	42,84 ± 6,04	35,37 ± 6,27
100	129,48 ± 43,90	80,38 ± 12,82	47,85 ± 7,03	36,90 ± 6,13
120	175,15 ± 51,17	116,59 ± 36,65	47,70 ± 7,73	41,24 ± 6,61
CPP	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		TBARS (μmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	70,31 ± 10,55	70,31 ± 10,55	12,91 ± 1,99	12,91 ± 1,99
60	80,90 ± 6,69	69,08 ± 11,04	16,37 ± 1,51	16,88 ± 4,08
80	89,91 ± 9,56	82,82 ± 14,77	20,81 ± 3,41	17,70 ± 4,70
100	114,45 ± 8,94	87,20 ± 10,57	22,42 ± 3,91	19,30 ± 4,54
120	105,92 ± 16,92	82,20 ± 18,53	24,23 ± 4,33	22,21 ± 4,84

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анјон радикал, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксид, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - нитрити, TBARS - индекс липидне пероксидације.

#### 4.2.4. Контролна група

Кардиодинамски параметри и коронарни проток при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) у контролној групи приказан је на *Графикону 14* и у *Табели 4.8*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездicom (\*) уколико је  $p < 0,05$ . Није регистрована статистички значајна разлика у испитиваним параметрима оксидационог стреса у контролним и експерименталним условима у контролној групи пацова, тј групи која је третирана физиолошким раствором.



**Графикон 14.** Параметри оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) у контролној групи

а) O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анјон радикал, б) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксид, в) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - нитрити, г) TBARS - индекс липидне пероксидације. Стаистички значајне разлике између контролних и експерименталних услова при различитим перфузионим притисцима су одређене Mann Whitney-овим тестом за везане узорке, а приказане једном звездицом (\*) уколико је p<0,05

Табела 4.8. Параметри оксидационог стреса изолованог срца пацова у ефлуенту при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) у контролној групи

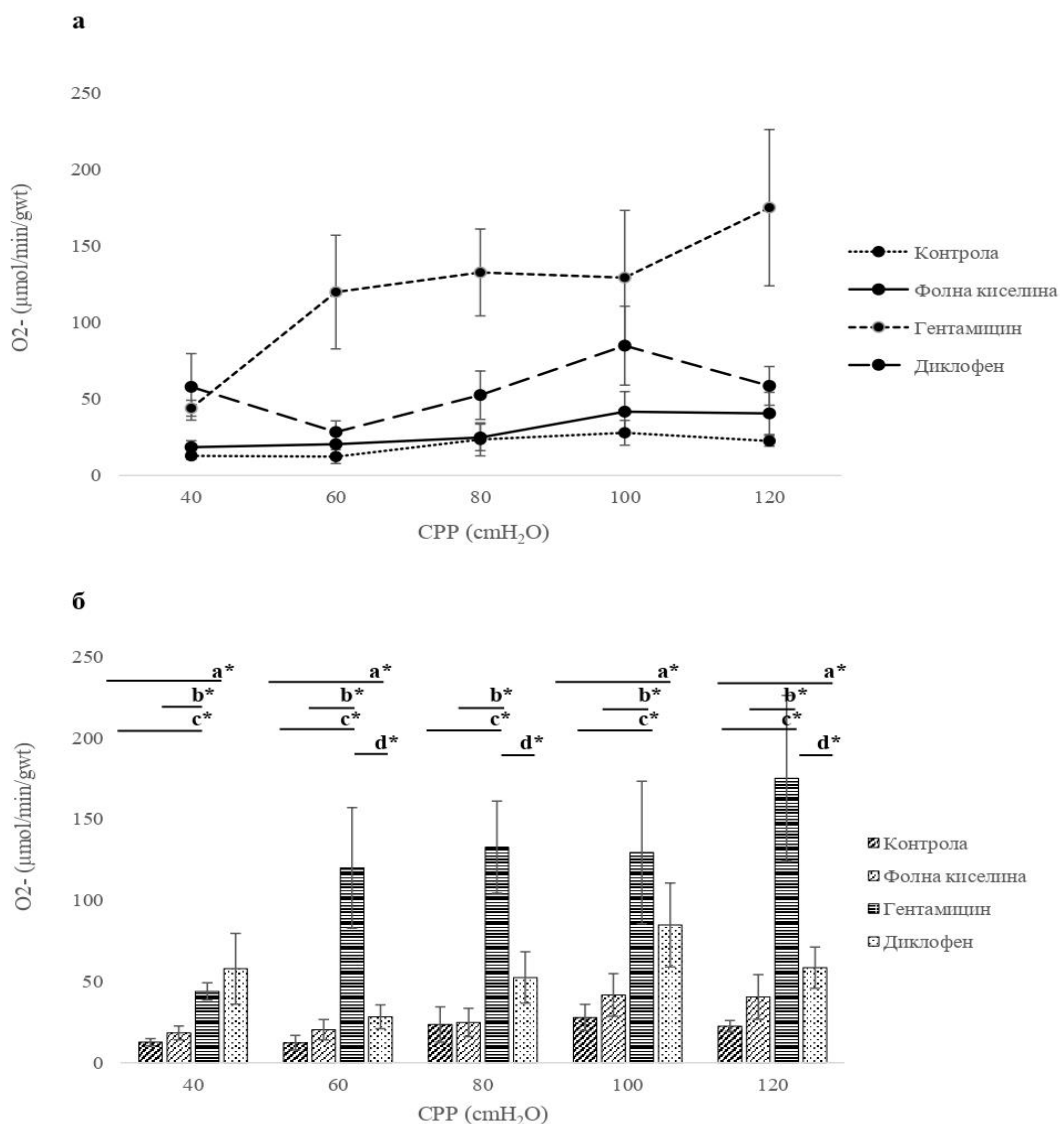
CPP	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	12,75 ± 2,22	12,75 ± 2,22	42,12 ± 6,19	42,12 ± 6,19
60	12,34 ± 4,54	13,31 ± 2,93	49,91 ± 4,52	50,95 ± 4,14
80	23,59 ± 10,80	23,71 ± 8,76	60,16 ± 6,27	59,73 ± 4,41
100	27,93 ± 8,13	26,78 ± 8,51	79,98 ± 10,13	83,87 ± 13,71
120	22,61 ± 3,48	21,22 ± 3,16	88,66 ± 9,62	89,50 ± 18,42
CPP	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min/gwt)		TBARS (μmol/min/gwt)	
	К	Е	К	Е
40	99,41 ± 12,95	99,41 ± 12,95	9,68 ± 1,16	9,68 ± 1,16
60	113,09 ± 11,33	115,24 ± 15,88	10,99 ± 0,91	11,72 ± 1,72
80	139,01 ± 8,22	141,83 ± 13,62	14,15 ± 1,12	15,28 ± 1,73
100	182,59 ± 28,01	172,05 ± 28,73	19,90 ± 3,34	20,64 ± 3,30
120	212,42 ± 36,66	219,98 ± 45,91	20,70 ± 3,91	21,51 ± 3,83

Вредности у табели су приказане као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ) у контролним (К) и експерименталним (Е) условима. O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анјон радикал, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - водоник пероксид, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - нитрити, TBARS - индекс липидне пероксидације.

#### 4.2.5. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова

##### 4.2.5.1. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) изолованог срца пацова у ефлуенту

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на супероксид анјон радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) у ефлуенту изолованог срца пацова приказано је на *Графикону 15*. Приликом поређења супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) различитих група са контролном групом регистрована је статистички значајно повишена вредност овог параметра у групи животиња третираних гентамицином у односу на контролну групу при свим вредностима коронарног притиска CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) као и диклофен групе у односу на контролну групу при скоро свим вредностима коронарног притиска CPP (40, 60, 100, 120 cmH<sub>2</sub>O). Међусобним поређењем група уочен је статистички значајан већи ниво O<sub>2</sub><sup>-</sup> у гентамицин групи у односу на групу третирану фолном киселином при свим вредностима коронарног притиска CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O), док је статистички значајно већи ниво O<sub>2</sub><sup>-</sup> уочен у диклофен групи у односу на гентамицин групу при CPP (60, 80, 120 cmH<sub>2</sub>O).



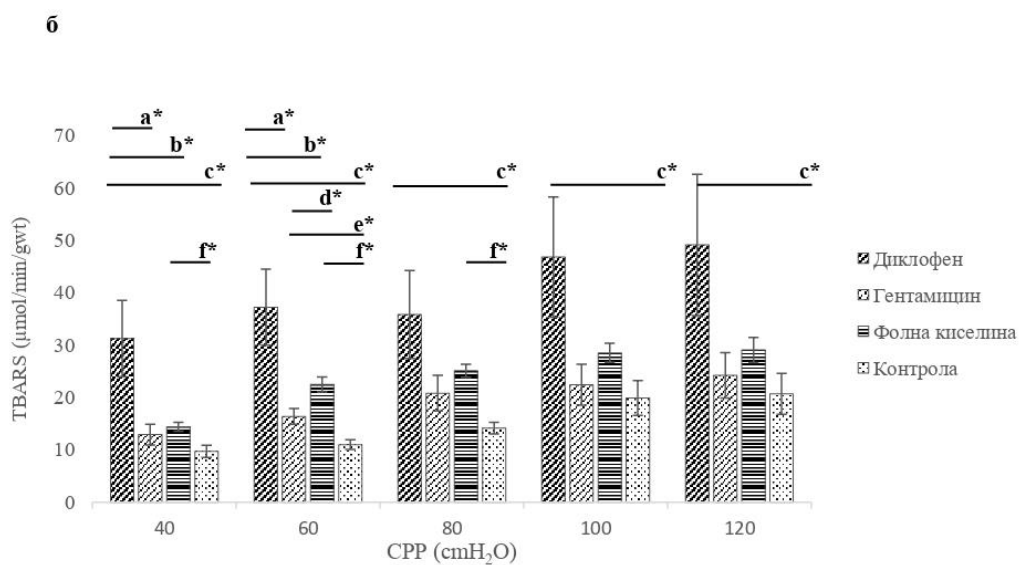
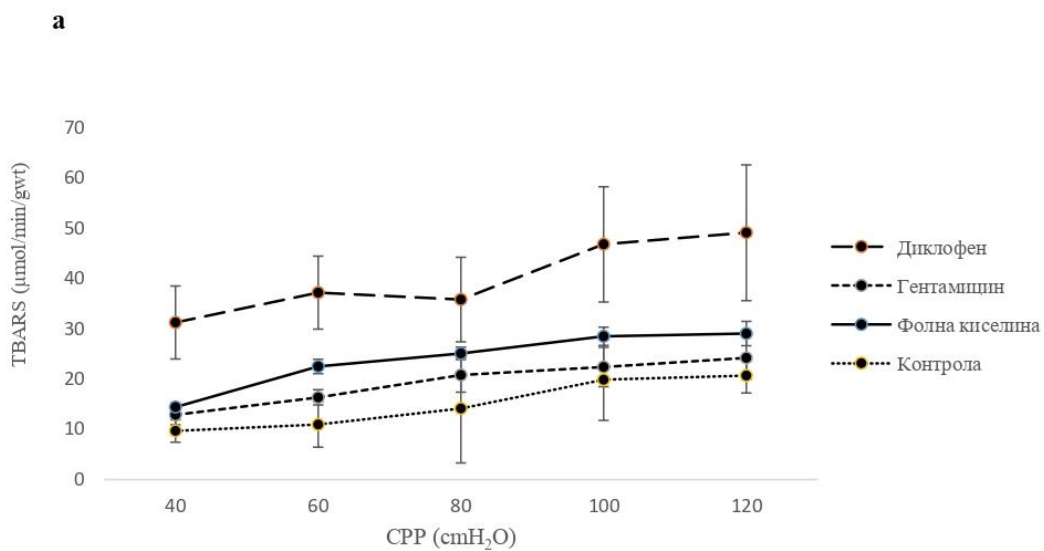
**Графикон 15.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ) у ефлуенту изолованог срца пацова при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O)

а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ,  $O_2^-$  - супероксид анјон радикал, статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ , а - диклофен vs контролна група, b - гентамицин vs. фолна к., c - гентамицин vs контролна група, d - диклофен vs. гентамицин група

#### 4.2.5.2. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на индекс липидне пероксидације (TBARS) у ефлуенту изолованог срца пацова

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на индекс липидне пероксидације (TBARS) у ефлуенту изолованог срца пацова приказано је на *Графикону 16*. Приликом

поређења TBARS-а експерименталних са контролном групом регистрована је статистички значајно повишена вредност овог параметра у групи животиња третираних диклофеном у односу на контролну групу при свим вредностима коронарног притиска CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) као и диклофен групе у односу на гентамицин и групу третирану фолном киселином при вредностима коронарног притиска CPP (40 и 60 cmH<sub>2</sub>O). Међусобним поређењем група уочен је статистички значајан већи ниво TBARS - а у групи третираној фолном киселином у односу на гентамицин групу при вредностима коронарног притиска од 60 cmH<sub>2</sub>O, као и статистички значајно повишене вредности у групи третираној фолном киселином у односу на контролну групу при вредностима коронарног притиска од 40-80 cmH<sub>2</sub>O. При вредностима коронарног притиска од 60 cmH<sub>2</sub>O регистроване су статистички значајно повишене вредности TBARS-а у гентамицин групи у односу на контролну групу.



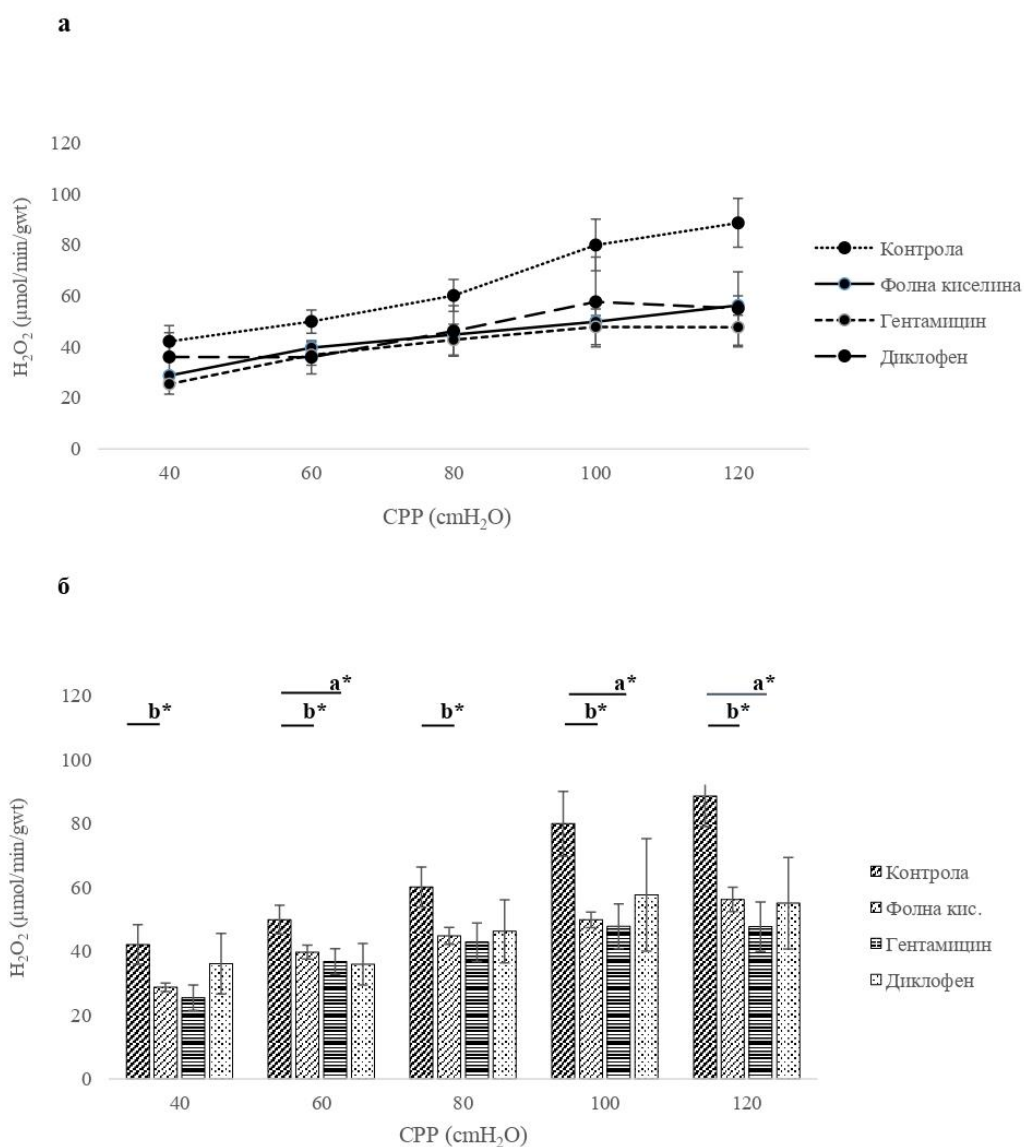


**Графикон 16.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на индекс липидне пероксидације (TBARS) у ефлуенту изолованог срца пацова при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O)

*а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ - TBARS –индекс липидне пероксидације, статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездicom (\*) уколико је  $p < 0,05$ , а - диклофен vs. гентамицин, b - диклофен vs. фолна к., c - диклофен vs контролна група, d - гентамицин vs фолна к., e - гентамицин vs контролна група, f - фолна к. vs контролна група*

#### **4.2.5.3. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) у ефлуенту изолованог срца пацова**

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на ниво водоник пероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) у ефлуенту изолованог срца пацова приказано је на *Графикону 17*. Приликом поређења H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> различитих група и контролне групе регистрована је статистички значајно снижена вредност овог параметра у групи животиња третираној фолном киселином у односу на контролну групу при свим вредностима коронарног притиска CPP (40 до 120 cmH<sub>2</sub>O) као и гентамицин групе у односу на контролну групу при вредностима коронарног притиска 60, 100 и 120 cmH<sub>2</sub>O.

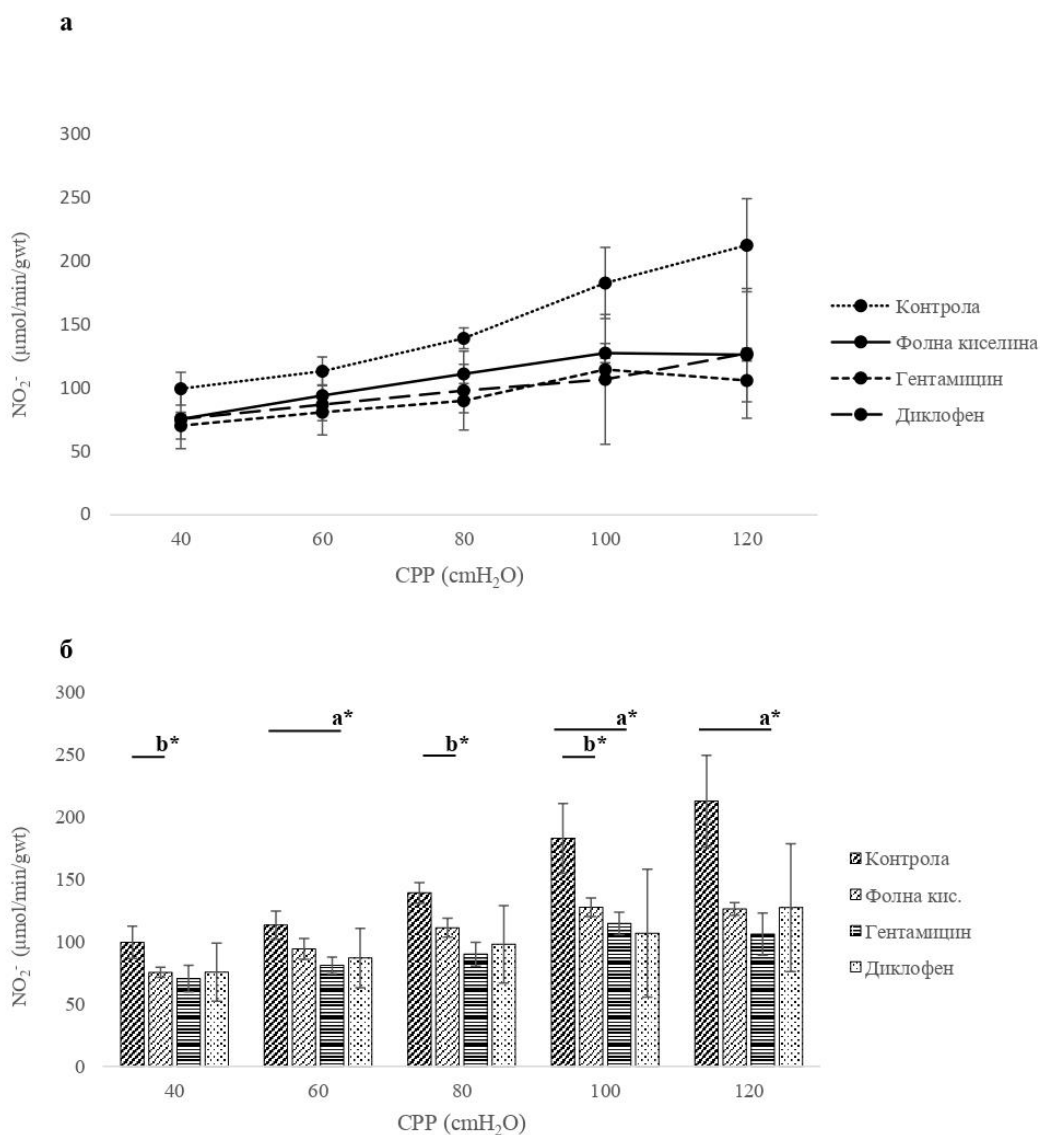


**Графикон 17.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на ниво водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) у ефлуенту изолованог срца пацова при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120  $cmH_2O$ )

а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ,  $H_2O_2$  - индекс липидне пероксидације, статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ , а - гентамицин vs контролна група, б - фолна к. vs контролна група

#### **4.2.5.4. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на ниво нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у ефлуенту изолованог срца пацова**

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на ниво нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у ефлуенту изолованог срца пацова приказано је на *Графикону 18*. Приликом поређења нивоа нитрита различитих група и контролне групе регистрована је статистички значајно снижена вредност овог параметра у гентамицин групи у односу на контролну групу при вредностима коронарног притиска 60, 100 и 120  $\text{cmH}_2\text{O}$  као и групе третиране фолном киселином у односу на контролну групу при вредностима коронарног притиска 40, 80 и 100  $\text{cmH}_2\text{O}$ .



**Графикон 18.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе на ниво нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у ефлуенту изолованог срца пацова при различитим коронарним перфузионим притисцима - CPP (40 до 120  $\text{cmH}_2\text{O}$ )

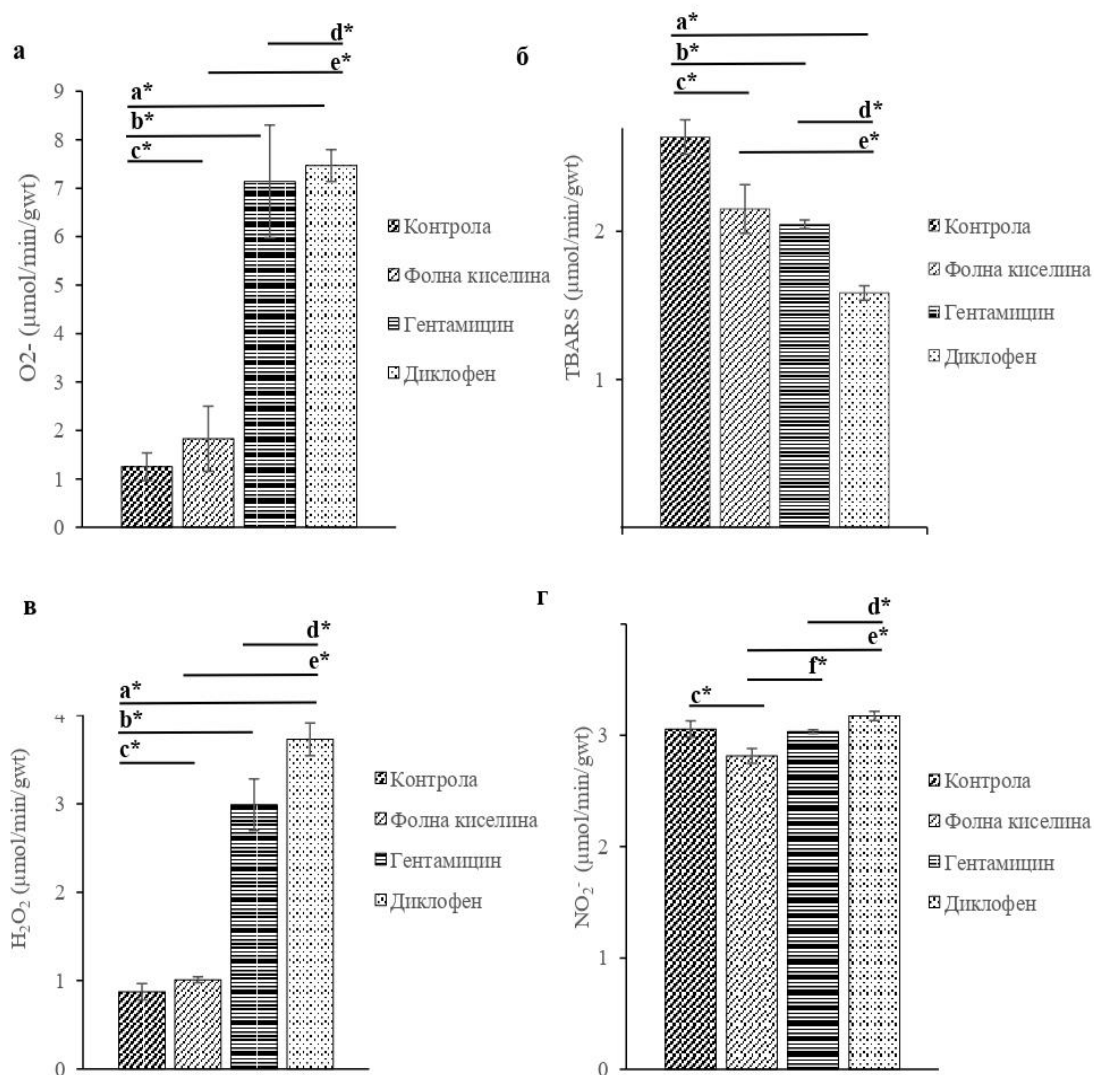
а) линеарни приказ, б) стубичаст приказ,  $\text{NO}_2^-$  - нитрити, статистички значајне разлике између посматраних група при различитим перфузионим притисцима су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, приказане су једном звездicom (\*) уколико је  $p < 0,05$ , а - гентамицин vs контролна група, б - фолнак. vs контролна група

#### 4.2.6. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре оксидационог стреса у плазми

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре оксидационог стреса у

плазми приказани су на *Графикону 19*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ .

Вредности супероксид анјон радикала и водоник пероксида су биле статистички значајно повишене у диклофен, гентамицин и групи третираној фолном киселином у односу на контролну групу, док су вредности индекса липидне пероксидације статистички значајно биле снижене у поменутиим групама у односу на контролну групу. Вредности нитрита биле су статистички значајно повишене само у групи третираној фолном киселином у односу на контролну групу. Међусобним поређењем група регистроване су статистички значајно повишене вредности супероксид анјон радикала, водоник пероксида и нитрита у диклофен групи у односу на гентамицин и групу третирану фолном киселином (*Графикон 18 а, в, г*), док је индекс липидне пероксидације био статистички значајно снижен у диклофен групи у односу на гентамицин и групу третирану фолном киселином (*Графикон 18 б*). Такође је забележена статистички значајно повишена вредност нитрита у гентамицин групи у односу на групу третирану фолном киселином (*Графикон 18 г*).



**Графикон 19.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре оксидационог стреса у плазми

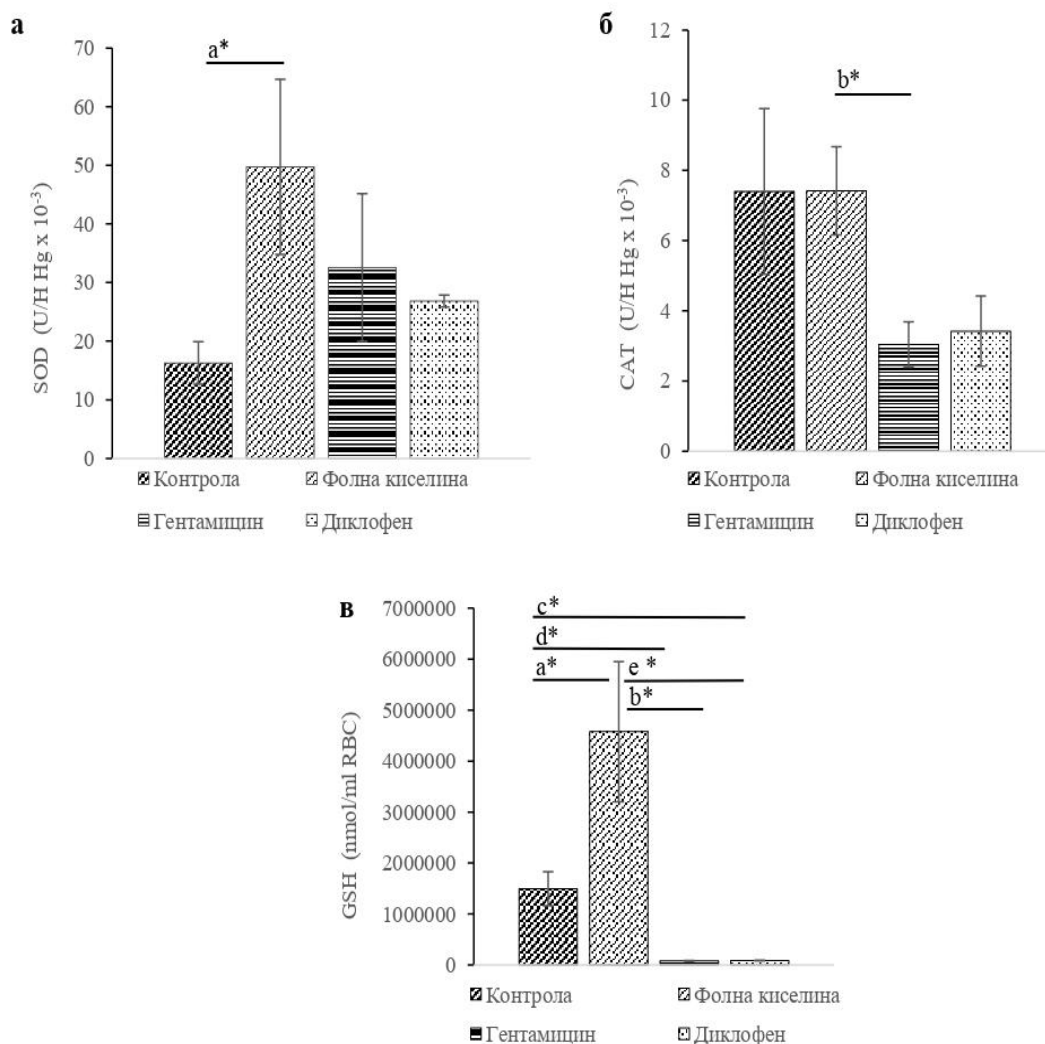
а)  $O_2^-$  - супероксид анјон радикал, б) TBARS - индекс липидне пероксидације, в)  $H_2O_2$  - водоник пероксид, г)  $NO_2^-$  - нитрити. Стаистички значајне разлике између посматраних група су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ ; а - контролна vs диклофен група, б - контролна vs гентамицин група, с - контролна група vs фолна к., d - гентамицин vs диклофен група, е - фолна к. vs диклофен група, f - фолна к. vs гентамицин група

#### 4.2.7. Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита приказани су на *Графикону 19*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између

контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$ .

Вредности супероксид дисмутаза (SOD) су биле значајно повишене у групи третираној фолном киселином у односу контролну групу (*Графикон 20 а*). Вредности редукованог глутатиона (GSH) биле су статистички значајно повишене у групи третираној фолном киселином у односу на контролну групу док су биле статистички значајно ниже у гентамицин и диклофен групи у односу на контролну (*Графикон 20 в*). Међусобним поређењем група вредности каталазе (CAT) су статистички значајно биле повишене у групи третираној фолном киселином у односу на гентамицин групу док је ниво GSH био статистички значајно повишен у групи третираној фолном киселином у односу на гентамицин и диклофен групу (*Графикон 20 б, в*).



**Графикон 20.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре антиоксидационог система заштите у лизату еритроцита

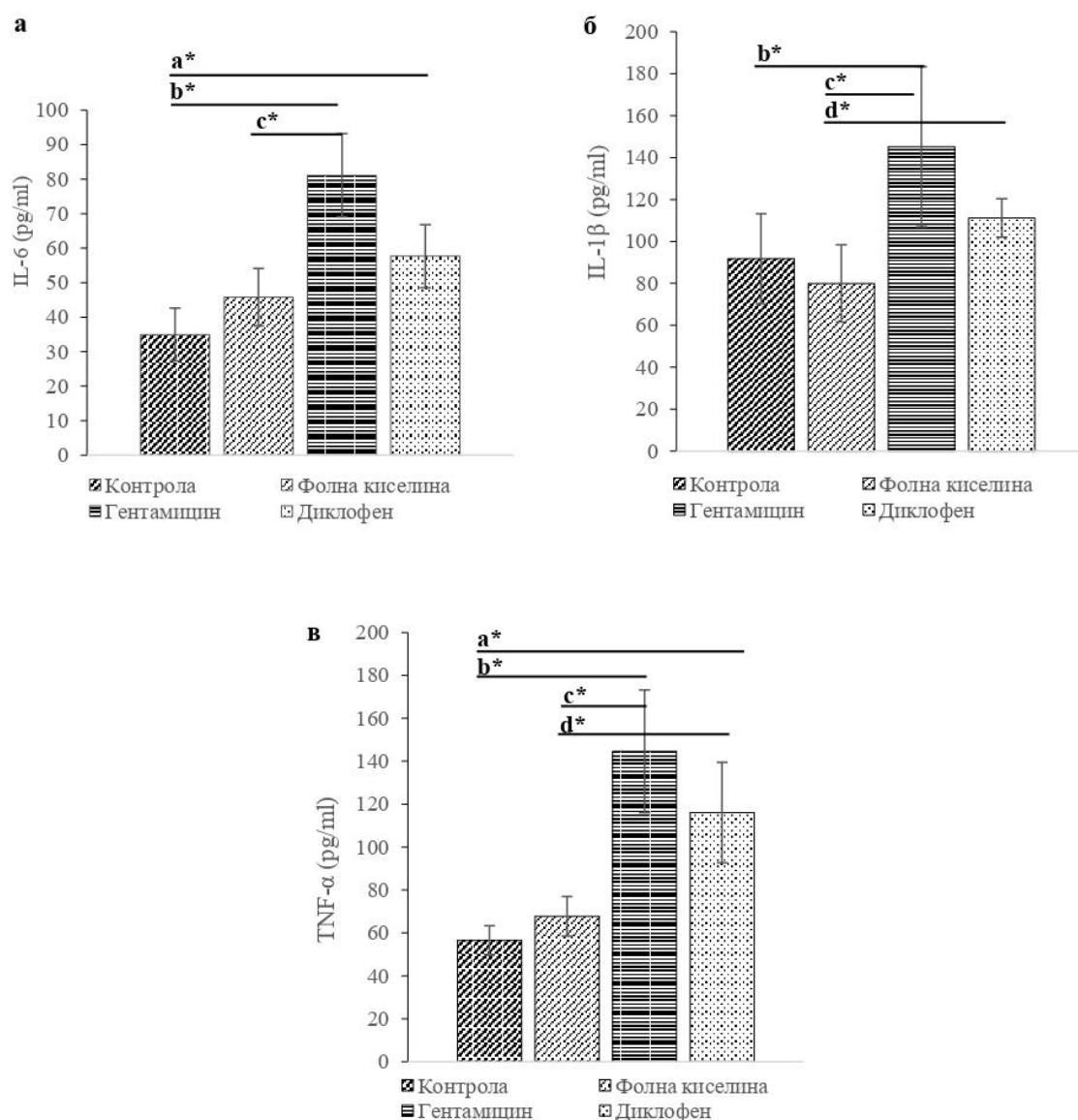
а) SOD - супероксид дисмутаза, б) CAT - каталаза, в) GSH - редуковани глутатион. Статистички значајне разлике између посматраних група су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$ . а - контролна vs гентамицин група, б - фолна к. vs гентамицин група, с - контролна vs диклофен група, д - контролна vs гентамицин група, е - фолна к. vs диклофен група



### **4.3. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре системске инфламације у плазми**

#### **4.3.1 Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре системске инфламације у плазми**

Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре системске инфламације у плазми приказани су на *Графикону 21*. Резултати поменутих параметара су приказани као средња вредност уз стандардну грешку ( $X \pm SE$ ), док је статистички значајна разлика испитиваних параметара између контролних и експерименталних услова приказана једном звездом (\*) уколико је  $p < 0,05$ . Вредности IL-6 биле су статистички значајно повишене у диклофен и гентамицин групи у односу на контролну групу док је диклофен група показала и статистички значајно повишене вредности у односу на групу која је примала фолну киселину *Графикон 21а*. Вредности IL-1 биле су статистички значајно повишене у гентамицин групи у односу на контролну групу. Такође је уочено статистички значајно увећање IL-6 у диклофен и гентамицин групи у односу на групу која је примала фолну киселину *Графикон 21б*. Што се тиче TNF- $\alpha$ , уочене су статистички значајно повишене вредности у диклофен и гентамицин групи у односу на контролну групу и групу која је примала фолну киселину *Графикон 21в*.



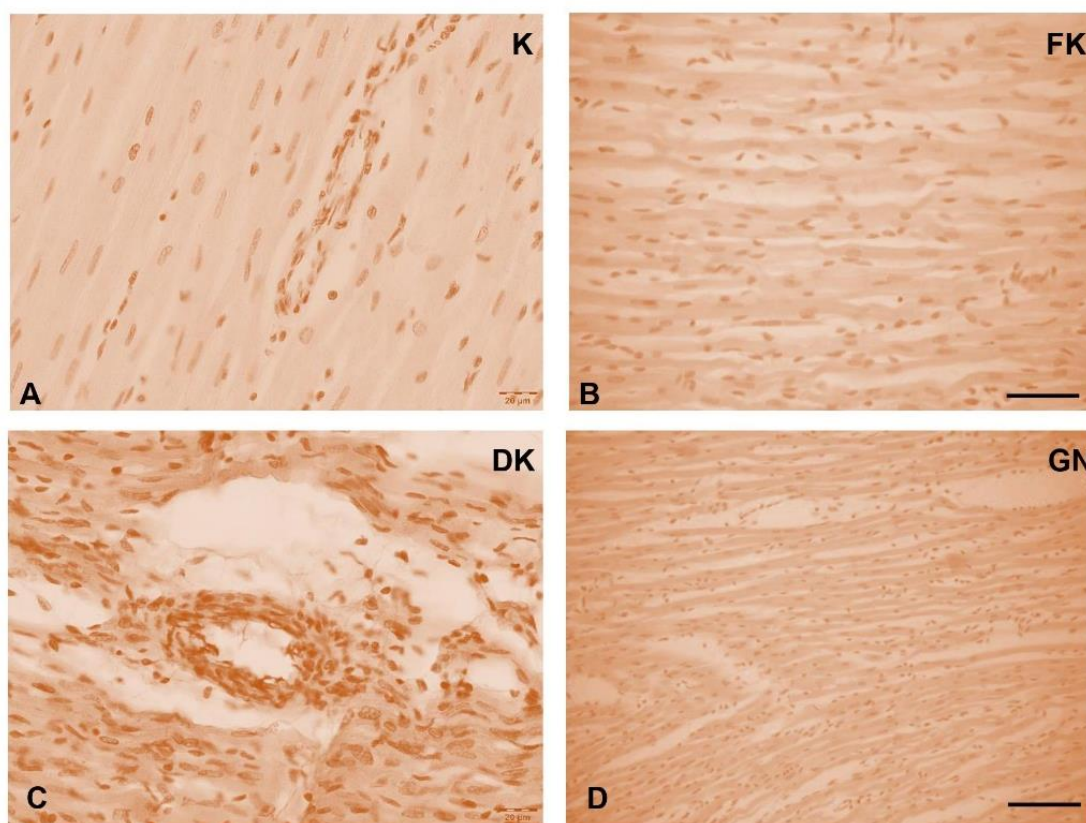
**Графикон 21.** Поређење ефекта акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре системске инфламације у плазми

а) IL-6 - интерлеукин-6, б) IL-1β - интерлеукин-1 бета, в) TNF-α - фактор тумора некрозе алфа. Стастички значајне разлике између посматраних група су одређене Kruskal Wallis-овим тестом, а приказане једном звездицом (\*) уколико је  $p < 0,05$ . а - контролна vs диклофен група, б - контролна vs гентамицин група, с - фолна к. vs гентамицин група, д - фолна к. vs диклофен група.

#### 4.4. Ефекти акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на грађу органа пацова

##### 4.4.1. Ефекти акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на грађу срца и бубрега пацова

Грађа срца пацова третираних диклофеном, гентамицином, фолном киселином као и контролне групе приказана је на слици 1.

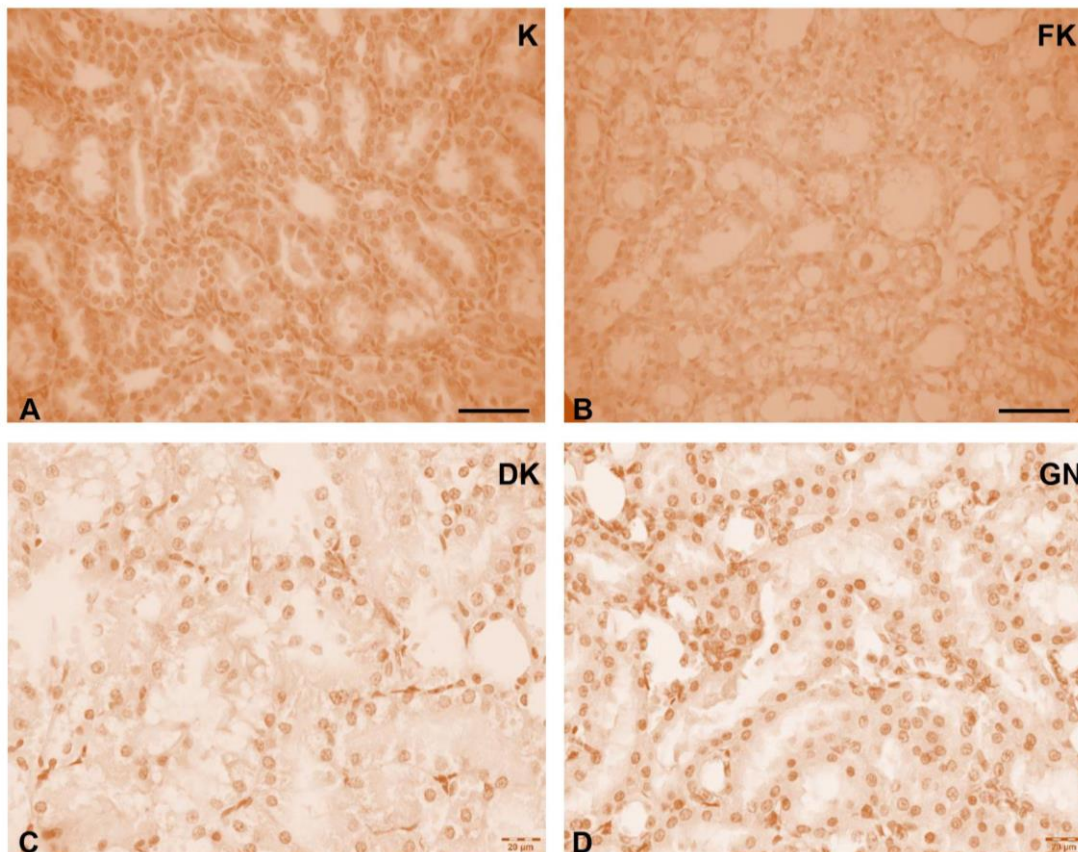


**Слика 3.** Хистопатолошке промене у срцу пацова (увећање, Н&Е x 400): А - контролна група, В - група која је примала фолну киселину, С - диклофен група, D - гентамицин група.

На препарату срца контролне групе пацова која је третирана физиолошким раствором (контролна група) (Слика 3А) уочавају се мишићна влакна регуларно распоређена, уједначене дебљине, очуване попречне испруганости, униформних једара, без умножавања везивно ткивних влакана и проширења интерстицијума. На препарату срца пацова третираних фолном киселином (Слика 3В) мишићна влакна су дегенеративно измењена у регуларном распореду, већим делом истањена а мањим делом очуване дебљине, без губитка попречне испруганости и прекида мишићних влакана, проширеног интерстицијума, повећане целуларности типа мононуклеарних ћелијских елемената. Једра мишићних ћелија су лако ирегуларне морфологије, дисперзно расутог хроматина. На препаратима срца животиња у диклофен групи (Слика 3С) уочена су мишићна влакна у ирегуларном распореду, умерено

хипетрофична, дегенеративно измењена, хипереозинофилна, проширеног интерстицијума. Једра мишићних ћелија су полиморфна, дисперзно расутог хроматина. Крвни судови су задебљалог зида, са знацима умерено изражене периваскуларне фиброзе. Срце пацова у гентамицин групи (Слика 3D) показује мишићна влакна у ирегуларном распореду, дегенеративно измењена, проширеног интерстицијума.

Грађа бубрега пацова третираних диклофеном, гентамицином, фолном киселином и контролне групе приказана је на слици 2.



**Слика 4.** Хистопатолошке промене у бубрегу пацова (увећање, Н&Е x 400): А- контролна група, В- група која је примала фолну киселину, С- диклофен група, Д- гентамицин група.

Хистолошки препарати бубрега контролне групе (Слика 4А) показује следеће: проксимални и дистални каналићи су уједначеног облика и величине, регуларне морфологије тубуларног епитела, правилних базално постављених једара, јасно уочљивих нуклеолуса, очуване базалне мембране, без проширења интерстицијума. Хистолошки препарати бубрега пацова третираних фолном киселином (Слика 4В) показују неуједначену величину проксималних тубула. Промене на тубуларном епителу варирају од израженог едема до тубуларне епителне некрозе и апоптозе, праћене десквамацијом некротичних тубуларних ћелија, фокално огољене, очуване базалне мембране. У дисталним тубулима присутна је дилатација лумена са појавом еозинофилних, хијалиних цилиндара. Интерстицијум едематозан, дилатираних крвних судова. Хистолошком анализом бубрега пацова третираних диклофеном (Слика 4С)

уочава се неуједначена величина проксималних тубула, промене на тубуларном епителу варирају од израженог едема до тубуларне епителне некрозе и апоптозе, праћене десквамацијом некротичних тубуларних ћелија, огољене, очуване базалне мембране. У дисталним тубулима присутна је дилатација лумена са појавом еозинофилних, хијалиних цилиндара. Интерстицијум је едематозан, дилатираних крвних судова. Анализом бубрега пацова третираних гентамицином (*Слика 4D*) региструје се неуједначена величина проксималних тубула, промене на тубуларном епителу варирају од умереног едема до лакостепене тубуларне епителне некрозе, фокално огољене, очуване базалне мембране. У дисталним тубулима присутна дилатација лумена. Интерстицијум едематозан, дилатираних крвних судова (*Слика 4D*).

## **5. ДИСКУСИЈА**

## 5.1. Акутно оштећење бубрега и морфолошке промене изолованог срца и бубрега

Примарни циљ студије био је да испита утицај акутног оштећења бубрега на хемодинамске параметре изолованог срца пацова као и на параметре оксидационог стреса и антиоксидационе заштите у ефлуенту и серуму. Такође је испитиван утицај акутног оштећења бубрега на параметре инфламације у серуму и хистопатолошку грађу бубрега и срца. Акутно оштећење бубрега је изазвано високим дозама потенцијално нефротоксичних лекова: диклофеном, гентамицином и фолном киселином у поређењу са контролном групом. Суштина испитивања је била експериментална потврда кардио-ренталног синдрома тип 3 који представља нагло настало и примарно погоршање функције бубрега које доводи до акутне кардијалне дисфункције. Број пацијената са удруженим оштећењем бубрега и срца у свету се константно повећава те је ова студија имала за циљ да покаже и расветли механизме којима оштећење бубрега узрокује дисфункцију удаљених органа (78).

Акутно оштећење бубрега изазвано је потенцијално нефротоксичним агенсима-лековима за које је доказано како у клиничкој пракси тако и у експерименталним условима, могу изазвати акутно оштећење бубрега (79). Према одговарајућем протоколу за сваку експерименталну групу примена нефротоксичних агенаса је довела до акутног оштећења бубрега што је потврђено резултатима биохемијског испитивања порастом вредности азотних материја (уреа и креатинина) и хистопатолошким прегледом. У групи третираној фолном киселином резултати биохемијског истраживања показују значајно повишене вредности уреа и релативно мали пораст вредности креатинина у односу на остале експерименталне групе. Ови резултати су конзистентни са резултатима које су спровели *Schmidt* и сарадници који су такође показали значајно повишене вредности уреа у првих 10 минута са достизањем максимума у 60. минуту након примене фолата (80). Ова студија је такође показала пораст вредности калијума у серуму 30 минута након примене фолата, што је у складу са нашим резултатима. Студија спроведена на мишевима од стране *Wan-* а и сарадника такође је показала пораст уреа 48 сати након апликације фолне киселине који је праћен истим морфолошким променама као у нашој студији (81). Ови резултати сугеришу да фолна киселина вероватно доводи до повећања реапсорпције уреа услед повећаног интратубуларног притиска. Истраживање спроведено од стране *Wen-*а и сарадника је показало да се оштећење бубрега јавља 24 сата након примене фолне киселине на шта упућују повећане вредности уринског NGAL-а (липокалин удружен са желатиназом неутрофила) који представља рани маркер бубрежног оштећења (82).

Морфолошке промене на бубрезима у групи третираној фолном киселином указују на распрострањену акутну тубулску некрозу која доводи до акутног оштећења бубрега. Слични резултати су виђени и у студији коју је спровео *Jin* која је светлосном микроскопијом открила екстензивна оштећења како тубула тако и гломерула након интраперитонеалне примене истих доза фолне киселине као и у нашој студији (83). Постоји више објашњења механизма акутног оштећења бубрега индукованог фолном киселином. Иницијално објашњење које је предложио *Huguenin* и сарадници је да повећани интратубуларни притисак доводи до тубуларне некрозе (84). Примарна тубуларна опструкција преципитатима фолне киселине би била најбоље објашњење повишеног интратубуларног притиска и пораста ефективног притиска гломеруларне филтрације. Преципитати фолне киселине формирају кристале у тубулима и сабирним каналићима 15 минута након интравенске апликације фолне киселине. Хистолошка анализа у нашој студији није показала постојање кристала фолне киселине у ренталним тубулима и сабирним каналићима као што је показано у студији *Huguenin* и сарадника.

Ово је објашњено као последица делимичног опоравка тубуларног епителијалног оштећења 48 сати након апликације фолне киселине. *Schmidt* и сарадници указују да је оштећење бубрега изазвано фолном киселином настало као последица измењене АТР-зависне тубуларне функције (85). Такође је показана да сулфасалазин доводи до сличних промена на тубулима бубрега као оне које настају као последица тубуларне опструкције услед лигације уретера (86). Дакле, претпоставља се да су промене у ензимској активности уочене након адиминистрације фолне киселине резултат повећања тубуларног притиска, а не директног биохемијског ефекта фолне киселине.

За разлику од групе која је третирана фолном киселином, друге две групе (диклофен и гентамицин) показују пораст серумске урее и креатинина без преминације урее, што указује на присутно акутне тубулске некрозе вероватно као последица директног нефротоксичног ефекта гентамицина и диклофена. Хистолошке промене бубрега у диклофен групи варирају од израженог едема до тубуларне епителне некрозе и апоптозе, праћене десквамацијом некротичних тубуларних ћелија. Наведене промене су последица смањеног протока бубрежног паренхима услед констрикције бубрежних артериола као последица инхибиције реналних простагландина диклофеном (87). Хистолошке промене на бубрегу изазване гентамицином показују такође присуство тубулске некрозе које су последица директног цитотоксичног дејста гентамицина на ћелије тубула. Код људи као и животиња гентамицин изазива лизозомалну фосфолипидозу која резултира некрозом ћелија проксималних тубула, док су промене мањег интензитета у сабирним каналићима и дисталним тубулима (88). У гломерулима гентамицин доводи до контракције мезангијума смањујући тако гломерулску филтрацију. Такође гентамицин стимулише пролиферацију мезангијумских ћелија што доводи до компензаторног повећања њихове апоптозе (89).

Патохистолошке промене на препаратима срца пацова показују широк спектар промена, почев од повећане целуларности типа мононуклеарних ћелијских елемената у групи третираном фолном киселином, преко умерено хипертрофичних мишићних влакана са знацима периваскуларне фиброзе у диклофен групи. Код све три групе доминирају проширен интерстицијум, делимично истањена, дегенеративно измењена мишићна влакна, осим у диклофен групи где доминирају хипертрофична. Наведене промене сугеришу на утицај како инфламације тако и параметара оксидационог стреса на грађу миоцита што је показано у студији спроведеној од стране *Alihematti-a* и сарадника (90). За разлику од нашег истраживања у наведеној студији акутно оштећење бурега изазвано је методом исхемија/реперфузија, која подразумева једнострану или обострану лигацију бубрежне артерије.

## **5.2. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на хемодинамске параметре изолованог срца пацова**

Механизми настанка ренокардијалног синдрома, тј кардио-реналног синдрома тип 3 су још увек недовољно истражени. Потенцијални механизми којима акутно оштећење бубрега изазива срчано оштећење су инфламација, активација симпатичког нервног система, активирање ренин - ангиотензин - алдостерон система и повећање оксидационог стреса. У студији спроведеној од стране *Kelly-a* и сарадника хистолошке промене у срчаном ткиву 48 сати након акутне реналне исхемије показују апоптозу миоцита која је доказана TUNEL (енг *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) реакцијом. Ова студија је такође показала повећану активност кардијалне



мијелопероксидазе (MPO), TNF $\alpha$  и IL-1 као резултат реналне исхемије (91). Експериментална истраживања су такође показала патолошку улогу апоптозе у акутном оштећењу бубрега и у развоју срчане слабости (92). У патофизиологији миокардне дисфункције током акутног оштећења бубрега кључни допринос има инфилтрација и активација неутрофила као и апоптоза кардиомиоцита. Међутим наши хистолошки налази који показују индиректне знаке кардиомиоцитне апоптозе преко једра кардиомицита која су лако ирегуларне морфологије, дисперзно расутог хроматина су у складу са налазима *Kely-a* и сарадника. Истраживања која су спровели *Burchill* и сарадници показују да акутно оштећење бубрега и након 10 дана изазива оштећење срца која се карактерише хипертрофијом, фиброзом и повећањем кардијалног ангиотензин конвертујућег ензима 2 као компензаторни и заштитини механизам у циљу повећања продукције антифибротичног пептида (93).

Мали број студија је проучавао ефекте акутног оштећења бубрега на кардијалну функцију нарочито изазвано нефротоксичним агенсима-лековима. У нашем истраживању показано је да је акутно оштећење бубрега изазвано нефротоксичним агенсима (дифлофеном, гентамицином и фолном киселином) удружено са смањеном срчаном контракцијом и релаксацијом који доводе до систолне и дијастолне дисфункције изолованог срца пацова. Погоршање срчане функције је такође било праћено смањењем коронарног протока. Резултати истраживања *Robinson-a* и сарадника показала су да је код пацова са акутим оштећењем бубрега регистрован смањен инотропни одговор на спектар различитих срчаних стимулуса. Ова студија је открила да до оштећења инотропног одговора долази због поремећаја у броју, афинитету, ефикасности или спреси дихидропиридинског рецептора са калцијумским каналом L типа у кардиомиоцитима (94). Испитивањем кардиодинамских параметара изолованог срца пацова у нашој студији у свим експерименталним групама показано је статистички значајно смањење дијастолног притиска (DLVP) у односу на контролну групу, док је вредност систолног притиска леве коморе (SLVP) статистички значајно била снижена у диклофен и гентамицин групи у односу на контролну групу, при свим вредностима коронарног перфузионог притиска (*Графикон 7* и *Графикон 8*). Миокард пацова који су третирани фолном киселином показао је нешто бољу систолну функцију. Разлог овоме лежи највероватније у њеним антиинфламаторним и антиоксидационим својствима, што је показано у наши студији (*График 19*). Истраживање *Kelly-a* и сарадника је показало промене у срчаној функцији након експерименталне обостране исхемије бубрега које се манифестују дилатацијом леве коморе и смањењем фракције скраћења срца пацова, што је у нашој студији показано кроз смањење дијастолног и систолног притиска леве коморе. Контрактилност ( $dp/dt \max$ ) миокарда је углавном била очувана у свим експерименталним групама, једино је у диклофен и гентамицин групи забележено благо смањење при високом перфузионом притиску. Релаксатна способност миокарда или његово лузитропно својство ( $dp/dt \min$ ) највише је компромитовано у диклофен групи. Поред наведеног утицаја на дијастолну и систолну функцију такође видимо да акутно оштећење бубрега доводи до поремећаја релаксације и контрактилности миокарда. Све наведене кардиодинамске промене најизраженије су у диклофен групи, па затим у групи третираној гентамицином. Најмање изражене су у групи третиране фолном киселином, највероватније зато што фолна киселина поред нефротоксичног ефекта има и системски антиоксидациони ефекат. Нижи коронарни проток и срчана фреквенца у групи третираној фолном киселином показују да антиоксидациони ефекат фолне киселине има значајан ефекат на ове параметре као и на адаптилност миокарда ових пацова на утицај штетних фактора акутног бубрежног оштећења. Разлог томе је утицај

фолне киселине на инхибицију азот моноксид синтетазе (NOS), што за ефекат има смањење срчане фреквенце путем смањења синтезе азот монооксида (95, 96). Исти ефекат је показан на систолни притисак у левој комори, где није било значајног смањења у групи третираној фолном киселином у односу на контролну групу. Испитивана је, такође, функција срца као и коронарни проток током ауторегулације у нормоксичним и хипероксичним условима. Генерално, забележени су испади у контрактилној и релаксантној способности срца при вишим вредностима коронарног притиска тј у хипероксичним условима у диклофен и гентамицин групи уз очувану перфузију. Објашњење очуваности ауторегулационих способности у групи третираној фолном киселином указује на очуваност регулаторних механизма у почетним фазама акутног оштећења бубрега захваљујући њеним поменути антиоксидационим својствима. Инхибитори циклоксигеназе (диклофенак) у експерименталним условима нису показали негативан утицај на кардиодинамске параметре и коронарни проток изолованог срца пацова чиме је показано да ефекти који су настали у нашој студији јесу последица акутног оштећења бубрега (97).

Показано је такође да проинфламаторни цитокин TNF- $\alpha$  учествује директно у апоптози миоцита, депресији контрактилности и нисходној регулацији саркомерних протеина (98). Истраживања спроведена од стране *Raine*-а и сарадника показала су да уремија, укључујући уреу и креатинин немају утицај на кардијалну функцију изолованог срца пацова (99). Насупрот овом истраживању, *Scheurer* са својим сарадницима је показао повећану контрактилну резерву у срцима пацова у почетној фази уремије у *in vivo* условима (100). Што може указати да срца уремијских пацова или имају нормалну или увећану срчану резерву у одговору на различите интервенције које захтевају повећан срчани рад у периоду од 24 до 48 сати након појаве уремије. Ово истраживање може објаснити могућност постојања одређених једињења у крви у раном стадијуму уремије која имају позитиван инотропни ефекат. Побољшање кардијалне функције није уочено када су срца уремијских пацова перфундована у *in vitro* условима неуремијским медијумом. Ова истраживања потврђују да акутно оштећење бубрега има комплексан утицај на кардијалну функцију.

### **5.3. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на оксидациони статус пацова**

У последњој деценији многобројне студије указале су на доказе о улози ROS на патогенезу различитих бубрежних болести, укључујући ту и моделе акутног токсичног оштећења бубрега изазваног гентамицином, глицеролом, цисплатином и циклоспорином А (101). У нашој студији коришћени су модели акутног оштећења бубрега изазваног гентамицином, фолном киселином и диклофеном. Сваки од поменутих агенаса на специфичан начин делује на оштећење бубрега изазивајући при том акутно оштећење бубрега које, између осталог, утиче механизмима оксидацијског стреса на кардијалну функцију. Гентамицин као антибиотик из групе аминогликозида је из свакодневне клиничке праксе познат по свом нефротоксичном дејству. Своје нефротоксично дејство остварује путем инхибиције механизма антиоксидационе заштите као што су глутатион пероксидаза и супероксид дисмутаза (102, 103). Наведени резултати су у складу са нашим у којима је такође у гентамицин групи показана деплеција наведених ензима у плазми. Неселективни инхибитори циклоксигеназе као што је диклофен, у експерименталним условима показали су нефротоксичност инхибицијом ензима COX1 и COX2 и смањењем нивоа простагландина у бубрегу услед смањења бубрежног протока. Такође је показано и повећање нивоа ROS што за последицу има апоптозу ћелија каналића бубрега

доведећи тако до акутног оштећења бубрега. Подаци студија које су испитивале утицај НСАИЛ на параметре оксидационог стреса у плазми су опречни. Одређене студије су показале извесна антиоксидациона својства НСАИЛ-а док су у другим истраживања регистрована повећања ROS (104). Наше истраживање је показало пораст плазматског  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  и TBARS-а у диклофен групи, док вредност NO није била значајно повећана што је у складу са студијом која је спроведена од стране *Li*-а и сарадника у којој, такође, није забележен пораст NO (105). Исто тако је регистрована и деплеција параметара антиоксидационе заштите (GSH, CAT, SOD) што је доказано и у студији спроведеној од стране *Bolat*-а и сарадника (106).

Резултати оксидационог статуса срца у нашој студији показују да акутно оштећење бубрега индуковано фолном киселином има негативан ефекат на кардиодинамске параметре који нису посредовани оксидационим стресом. Системски оксидациони статус пацова потврђује антиоксидациона својства фолне киселине због јаке мобилизације већине механизма антиоксидационе заштите. У раду који је објавио *Kolling* показано је да фолна киселина има заштитну улогу у оксидационом нитратном стресу у срца пацова захваљујући својим антиоксидационим својствима. У овој студији оксидационо-нитратни стрес је изазван хомоцистеином (96). Наше истраживање је показало значајно снижене вредности нитратног оксида ( $NO_2^-$ ) и водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) у коронарном ефлуенту док су вредности TBARS -а биле статистички значајно повишене. Тиме је показано да високе дозе фолне киселине поред свог нефротоксичног имају и протективан ефекат на оксидациони стрес у срцима пацова осим у нивоу TBARS. Ови налази се слажу са резултатима студије коју су спровели *Djuric* и сарадници који су показали да фолна киселина повећава нивое TBARS у коронарном ефлуенту (107). Ова студија је такође потврдила да високе дозе фолне киселине (100  $\mu M$ ) не утичу битно на кардијалну функцију већ доводе до повећања коронарног протока при свим вредностима коронарног притиска и коронарну вазодилатацију срца пацова изазвану фолном киселином. Дозе фолне киселине у овој студији су биле неколико пута мање него у нашем истраживању. Нивои друга два параметра оксидационог стреса ( $NO_2^-$  и  $H_2O_2$ ) у ефлуенту су највероватније нижи због преминације антиоксидационог ефекта фолне киселине на ове две компоненте ROS-а.

Плазма концентрације ROS-а су биле ниже у групи третираној фолном киселином, нарочито TBARS и  $NO_2^-$  чије су вредности биле статистички значајно ниже. Ови налази указују на претходно поменуто преминацију антиоксидационих ефеката фолне киселине. Параметри системске антиоксидационе заштите у нашој студији су показали високе вредности, нарочито SOD и GSH. Насупрот нашем истраживању, студија спроведена од стране *Gupta*-е и сарадника је показала да акутна примена фолне киселине у мишева води до стварања оксидационог стреса и промена мембранске архитектуре и на тај начин доводи до акутног оштећења бубрега (108). Ранија истраживања су показала контрадикторне резултате. Повишен ниво SOD је показан код пацијената са акутним оштећењем бубрега у септичном шоку и сугеришу да SOD може бити рани маркер акутног бубрежног оштећења (109). Са друге стране друга истраживања показују нормалне активности ензима антиоксидационе заштите CAT и SOD у пацијената са мултиорганским оштећењем и акутним оштећењем бубрега (110). Наше истраживање сугерише на то да фолна киселина може бити корисна у лечењу акутног оштећења бубрега услед својих антиоксидационих ефеката, једина ограничавајућа ствар је њена доза јер у великим може довести до акутног оштећења бубрега.

Све три експерименталне групе у нашем истраживању показале су извештан степен појачане активности параметера оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова, доминантно  $O_2^-$  и TBARS-а. Студија спроведена од стране *Jevdjevic*-а и сарадника показала је да примена диклофена није имала значајан утицај на параметре оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова (111). Можемо закључити да акутно оштећење бубрега утиче добрим делом на повећање оксидационог стреса у срцу што је показано и у студији *Wellington*-а и сарадника, која је испитивала утицај акутног оштећења бубрега изазваног исхемијом/реперфузијом на ћелијско оштећење миокарда (112).

#### **5.4. Утицај акутног оштећења бубрега изазваног фолном киселином, гентамицином, диклофеном и контролне групе на параметре системске инфламације у плазми**

Као што је раније поменуто, акутно оштећење бубрега утиче путем инфламације на функцију многобројних органа, почев од срца преко плућа, јетре, мозга и гастроинтестиналног тракта (113). Механизми којима инфламација утиче на функцију других органа добро су познати (114). Наша студија је показала повећану системску инфламацију код пацова који су третирани агенсима који су изазвали акутно оштећење бубрега. Тиме је показано да су инфламацијски цитокини TNF- $\alpha$ , IL-1 и IL-6 могући узроци настанка срчане дисфункције као последица системског инфламаторног одговора услед акутног оштећења бубрега. У нашој студији показано је да је значајна активност инфламаторног одговора регистрована у пацова третираних диклофеном и гентамицином док је најмања активност забележена у пацова третираних фолном киселином чиме је уједно показано њено антифламаторно дејство. Једна од претпоставки је да су промене на бубрегу које изазива диклофен екстензивније и одговорне за нешто јачи инфламаторни одговор. Познато је да цисплатина као највише проучавани нефротоксични лек изазива повећање TNF- $\alpha$  у серуму како у *in vivo* тако и у експерименталним условима (115). Механизам којим цисплатина доводи до активације инфламаторног одговора лежи у активацији инфламаторних ћелија као што су макрофаги и леукоцити. Убрзо након примене цисплатине у експерименталним условима долази до инфилтрације бубрежног парехима CD3<sup>+</sup> Т ћелијама која достиже свој пик 12 сати након апликације. Макрофаги и неутрофили се активирају касније, након 24 до 48 сати од момента примене цисплатине (116). Студија коју су спровели *Zhang* и сарадници показала је да TLR 4 (енгл. *Toll Like Receptor*) сигнални пут игра значајну улогу у продукцији инфламаторних цитокина у токсичном оштећењу бубрега изазваном цисплатином. Показано је да пацови који су дефицијентни у толичним рецепторима 4 (TLR 4) показују значајно мање серумске вредности IL-1, IL-6 као и TNF- $\alpha$  након примене цисплатине (117). Нефротоксично дејство аминокликозида, међу њима највише проучаваног гентамицина је одавно познато. Поред описаних механизма нефротоксичности гентамицина, показано је да путем активације оксидационог стреса доводи до апоптозе мезангијалних ћелија гломерула посредством TNF- $\alpha$  и IL-1 што је у складу са резултатима наше студије (118). Познато је да диклофен изазива оштећење бубрега путем инхибиције синтезе простагландина и активацијом оксидационог стреса (119). Такође је доказано да диклофен изазива акутно оштећење бубрега путем активације NF- $\kappa$ B који доводи до продукције проинфламаторних цитокина TNF- $\alpha$  и IL-1 чије стварање зависи од диклофен зависног NF- $\kappa$ B (120). Акутно оштећење бубрега изазвано фолном киселином у нашој студији није довело до пораста проинфламаторних цитокина, што може указати да фолна киселина има механизме који нису везани за инфламацију и могу бити предмет будућих студија.

## **5. ЗАКЉУЧЦИ**

На основу добијених резултата можемо закључити следеће:

1. Диклофен, гентамицин и фолна киселина доводе до АОБ својим специфичним механизмима поред којих су укључени инфламација и оксидациони стрес
2. Наше истраживање показује да АОБ изазвано диклофеном и гентамицином утиче на морфолошко и функционално оштећење кардиомиоцита које се манифестује кроз оштећење како систолне тако и дијастолне функције срца
3. АОБ изазвано фолном киселином утиче на морфолошко и функционално оштећење кардиомиоцита које се манифестује кроз смањење дијастолне функције миокарда као и смањење коронарног протока и срчане фреквенце
4. АОБ изазвано диклофеном, гентамицином и фолном киселином утиче на смањење контрактилне и релаксантне способности миокарда
5. АОБ изазвано диклофеном, гентамицином и фолном киселином изазива активацију параметара системског оксидацијског стреса и то  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  док фолна киселина поред наведених изазива и повећање  $NO_2^-$
6. АОБ изазвано диклофеном, гентамицином и фолном киселином изазива активацију параметара системског оксидационог стреса у ефлуенту изолованог срца пацова
7. АОБ изазвано диклофеном и гентамицином доводи до снижења нивоа антиоксидационих молекула
8. АОБ изазвано диклофеном и гентамицином изазива пораст параметера системске инфламације:  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1$  и  $IL-6$ .
9. Фолна киселина поред свог нефротоксичног ефекта показује снажна антиинфламаторна и антиоксидациона својства
10. Ово истраживање је експериментална потврда кардио-реналног синдрома тип 3 у коме акутна кардијална дисфункција настаје као последица акутног оштећења бубрега.
11. Негативни ефекти акутног оштећења бубрега не обухватају само оксидациони стрес, већ у томе значајну улогу игра и инфламација као један од битних фактора комуникације између органа (енг. *organ crosstalk*).
12. С обзиром на то да епидемиолошка истраживања показују да акутно оштећење бубрега значајно утиче на срчану функцију, наше истраживање истиче значај кардио-реналног синдрома тип 3 због пораста морталитета пацијената са овим синдромом у клиничкој пракси, нарочито у јединицама интензивног лечења.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney inter.* 2012; 2: 1–138.  
<https://kdigo.org/wp-content/uploads/2016/10/KDIGO-2012-AKI-Guideline-English.pdf>
2. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, et al. Acute kidney injury: An increasing global concern. *Lancet.* 2013; 382 (9887): 170-179. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)60647-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)60647-9)
3. Vanmassenhove J, Kielstein J, Jörres A, Biesen W Van. Management of patients at risk of acute kidney injury. *Lancet.* 2017; 389 (10084): 2139-2151.  
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31329-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31329-6)
4. Ali T, Khan I, Simpson W, et al. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 1292–98.  
<https://doi.org/10.1681/asn.2006070756>
5. Negi S, Koreeda D, Kobayashi S, Yano T, Tatsuta K, Mima T, et al. Acute kidney injury: Epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies. *Semin Dial.* 2018; 31(5): 519–27. <https://doi.org/10.1111/sdi.12705>
6. Adhikari NK, Rubenfeld GD. Worldwide demand for critical care. *Curr Opin Crit Care* 2011; 17: 620–25. <https://doi.org/10.1097/mcc.0b013e32834cd39c>
7. Naicker S, Aboud O, Gharbi MB. Epidemiology of acute kidney injury in Africa. *Semin Nephrol* 2008; 28: 348–53. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2008.04.003>
8. Mehta P, Sinha A, Sami A, et al. Incidence of acute kidney injury in hospitalized children. *Indian Pediatr.* 2012; 49: 537–42. <https://doi.org/10.1007/s13312-012-0121-6>
9. Krishnamurthy S, Mondal N, Narayanan P, Biswal N, Srinivasan S, Soundravally R. Incidence and etiology of acute kidney injury in southern India. *Indian J Pediatr.* 2013; 80: 183–89. <https://doi.org/10.1007/s12098-012-0791-z>
10. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol.* 2012; 2(2): 1303–53. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110041>
11. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev.* 2016; 37 (2): 85-98.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5198510/>
12. Heyman S, Rosenberger C, Rosen S. Acute kidney injury: lessons from experimental models. 2011;169: 286-296. <https://doi.org/10.1159/000313957>
13. Rosen S, Heyman SN: Difficulties in understanding human ‘acute tubular necrosis’: limited data and flawed animal models. *Kidney Int.* 2001; 60: 1220–1224.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00930.x>
14. Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders HJ. Acute kidney injury. *Nat Rev Dis Prim.* 2021; 7(1): 52. <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-021-00284-z>
15. Schley G, Köberle C, Manuilova E, et al. Comparison of plasma and urine biomarker performance in acute kidney injury. *PLoS One.* 2015; 10 (12): 1-23.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145042>
16. Uchino S. The epidemiology of acute renal failure in the world. *Curr Opin Crit Care.* 2006; 12 (6): 538-543. <https://doi.org/10.1097/01.ccx.0000247448.94252.5a>
17. Uber AM, Sutherland SM. Nephrotoxins and nephrotoxic acute kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2020; 35 (10): 1825–33. <https://doi.org/10.1007/s00467-019-04397-2>
18. Naughton CA. Drug-induced nephrotoxicity. *Am Fam Physician* 2008; 78: 743.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18819242/>



19. Dam VP, Scott JL, Ross A, Kinobe RT. Inhibition of cystathionine gamma-lyase and the biosynthesis of endogenous hydrogen sulphide ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 2012; 685 (1-3): 165-73.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.030>
20. Randjelović P, Veljković S, Stojiljković N, Sokolović D, Ilić I. Gentamicin nephrotoxicity in animals: Current knowledge and future perspectives. *EXCLI J.* 2017; 16: 388-399. <https://doi.org/10.17179/excli2017-165>
21. Besen A, Kose F, Paydas S, et al. The effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium on the rat kidney, and alteration by furosemide. *Int Urol Nephrol.* 2009; 41 (4): 919-26. <https://doi.org/10.1007/s11255-008-9496-7>
22. Yasmeen T, Qureshi GS, Perveen S. Adverse effects of Diclofenac sodium on renal parenchyma of adult albino rats. *J Pak Med Assoc.* 2007; 57 (7): 349-351.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17867257/>
23. Scott JT. Phenacetin, aspirin and kidney damage. *Am Heart J* 1966; 71 (5): 715-7.  
[https://doi.org/10.1016/0002-8703\(66\)90326-7](https://doi.org/10.1016/0002-8703(66)90326-7)
24. Fink M, Henry M, Tange JD. Experimental foic acid nephropathy. *Pathology.* 1987; 19(2): 143–9. <https://doi.org/10.3109/00313028709077125>
25. Kavlock RJ, Rehnberg BF, Rogers EH. Amphotericin B- and Folic Acid-Induced in Developing Rats ' Nephropathies. 1985; *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 81: 407-4.  
[https://doi.org/10.1016/0041-008x\(85\)90412-0](https://doi.org/10.1016/0041-008x(85)90412-0)
26. Kumar D, Singla SK, Puri V, Puri S. The restrained expression of NF-kB in renal tissue ameliorates folic acid induced acute kidney injury in mice. *PLoS One.* 2015; 10(1) :1–23.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115947>
27. Kingma JG, Simard D, Rouleau JR. Renocardiac syndromes: physiopathology and treatment stratagems. *Can J kidney Heal Dis.* 2015; 2: 41.  
<https://dx.doi.org/10.1186%2Fs40697-015-0075-4>
28. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52 (19): 1527-1539. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.07.051>
29. Doi K, Rabb H. Impact of acute kidney injury on distant organ function: Recent findings and potential therapeutic targets. *Kidney Int.* 2016; 89(3): 555–64.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2015.11.019>
30. Liano F, Pascual J, and The Madrid Acute Renal Failure Study Group. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. *Kidney Int.* 1996; 50: 811-8. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.380>
31. Chuasuwana A, Kellum JA. Cardio-Renal Syndrome Type 3: Epidemiology, Pathophysiology, and Treatment. *Semin Nephrol.* 2011; 32 (1): 31-39.  
doi:10.1016/j.semnephrol.2011.11.005
32. Feltes CM, Van Eyk J, Rabb H. Distant-organ changes after acute kidney injury. *Nephron - Physiol.* 2008; 109(4). <https://doi.org/10.1159/000142940>
33. Rosner MH, Ronco C, Okusa MD. The Role of Inflammation in the Cardio-Renal Syndrome: A Focus on Cytokines and Inflammatory Mediators. *Semin Nephrol.* 2012; 32(1): 70–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semnephrol.2011.11.010>
34. Bagshaw SM, Hoste EA, Braam B, Briguori C, Kellum JA, McCullough PA, et al. Cardiorenal Syndrome Type 3: Pathophysiologic and Epidemiologic Considerations. *Contrib Nephrol.* 2013; 182:137–57.  
<https://www.karger.com/Article/FullText/349971>

35. Qin F, Patel R, Yan C, Liu W. NADPH oxidase is involved in angiotensin II-induced apoptosis in H9C2 cardiac muscle cells: effects of apocynin. *Free Radic Biol Med.* 2005; 40: 236-46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.010>
36. Zanchetti A, Stella A. Cardiovascular disease and the kidney: An epidemiologic overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999; 33(1): S1–S6. <https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/toc/1999/00001>
37. Virzì GM, Day S, de Cal M, Vescovo G, Ronco C. Heart-kidney crosstalk and role of humoral signaling in critical illness. *Crit Care.* 2014;18(1):201. <https://doi.org/10.1186/cc13177>
38. Mitaka C, Khin M, Si H, et al. Effects of atrial natriuretic peptide on inter-organ crosstalk among the kidney, lung, and heart in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Intensive Care Med Exp.* 2014; 2: 28. <https://doi.org/10.1186/s40635-014-0028-8>
39. Serteser M, Koken T, Kahraman A, Yilmaz K, Akbulut G, Dilek ON: Changes in hepatic tnf-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res* 2002; 107: 234–40. <https://doi.org/10.1006/jsre.2002.6513>
40. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997; 82: 291-295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
41. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25 (3): 287-299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
42. Dröge W, Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82 (1): 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
43. Cadenas E, Davies KJ a. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging  
This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(3-4):222-230. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8)
44. Kao MPC, Ang DSC, Pall A, Struthers AD. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J Hum Hypertens.* 2010; 24(1):1–8. <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jhh.2009.70>
45. Kisić Božović B, Mirić D, Dragojević I. The role of nitric oxide physiological and pathophysiological processes. *Praxis medica.* 2007; 35 (20): 93-98. <https://scindeks.ceon.rs/article.aspx?artid=0350-87730702093K>
46. Halliwell b. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 70: 737–757, 1989.
47. Noiri E, Nakao A, Uchida K, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 281 (5): F948-F957.
48. Pavlakou P, Liakopoulos V, Eleftheriadis T, Mitsis M, Dounousi E. Oxidative Stress and Acute Kidney Injury in Critical Illness : Pathophysiologic Mechanisms — Biomarkers — Interventions, and Future Perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017; vol. 2017, Article ID 6193694; <https://doi.org/10.1155/2017/6193694>
49. Noleto Magalhães RC, Guedes Borges de Araujo C, Batista de Sousa Lima V, Machado Moita Neto J, do Nascimento Nogueira N, do Nascimento Marreiro D. Nutritional status of zinc and activity superoxide dis- mutase in chronic renal patients undergoing hemodialysis. *Nutr Hosp.* 2011; 26: 1456–61. <https://doi.org/10.1590/s0212-16112011000600037>
50. Costa NA, Gut AL, Azevedo PS, et al. Erythrocyte superoxide dismutase as a biomarker of septic acute kidney injury. *Ann Intensive Care.* 2016; 6 (1): 95. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs13613-016-0198-5>

51. Mortensen J, Shames B, Johnson CP, Nilakantan V. MnTMPyP, a superoxide dismutase/catalase mimetic, decreases inflammatory indices in ischemic acute kidney injury. *Inflamm Res*. 2011; 60 (3): 299-307. <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0268-3>
52. Simmons EM, Himmelfarb J, Tugrul Sezer M, Chertow GM, Mehta RL, Paganini EP, Soroko S, Freedman S, Becker K, Spratt D, Shyr Y & Alp Ikizler T. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. *Kidney International*. 2004; 65 (4) 1357–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00512.x>
53. Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney International*. 2001; 60(6): 2118–2128. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00043.x>
54. Tecklenborg J, Clayton D, Siebert S, Coley SM. The role of the immune system in kidney disease. *Clin Exp Immunol*. 2018;192(2):142–50. <https://doi.org/10.1111/cei.13119>
55. Chung, Arthur C.K., and Hui Y. Lan. Chemokines in Renal Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011; 22 (5): 802–9. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010050510>.
56. Rabb H, Griffin, MD, McKay Di. B, Swaminathan S, Pickkers P, Rosner M H, Kellum, JA, & Ronco C. Inflammation in AKI: Current understanding, key questions, and knowledge gaps. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2016; 27: (2), 371–379. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015030261>
57. Perše M, Večerić-Haler Ž. Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. Ramkumar V, editor. *Biomed Res Int [Internet]*. 2018; 2018:1462802. <https://doi.org/10.1155/2018/1462802>
58. Privratsky JR, Zhang, J, Lu X, Rudemiller N., Wei Q, Yu YR, Gunn MD & Crowley SD. Interleukin 1 receptor (IL-1R1) activation exacerbates toxin-induced acute kidney injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2018; 315 (3): F682–F691 <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00104.2018>
59. Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 967826. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/967826>
60. McWilliam SJ, Wright RD, Welsh GI, Tuffin J, Budge KL, Swan L, Wilm T, Martinas IR, Littlewood J, & Oni L. The complex interplay between kidney injury and inflammation. *Clinical Kidney Journal*. 2020; 1–9. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa164>
61. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008; 7(1): 3–18.
62. Heyman S, Rosenberger C, Rosen S. Acute kidney injury: lessons from experimental models. *Contrib Nephrol*. 2011; 169 : 286-296. <http://www.karger.com/Article/FullText/313957>.
63. Agmon Y, Peleg H, Greenfeld Z, et al: Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *J Clin Invest* 1994; 94: 1069–1075.
64. Prasad PV, Edelman RR, Epstein FH: Noninvasive evaluation of intrarenal oxygenation with BOLD MRI. *Circulation* 1996; 94: 3271–3275. <https://doi.org/10.1161/01.cir.94.12.3271>
65. Erdem A, Gündoğan NU, Usubütün A, et al. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15(8): 1175-82. <https://doi.org/10.1093/ndt/15.8.1175>
66. Efrati S, Berman S, Siman-Tov Y, et al. N-acetylcysteine attenuates NSAID-induced rat renal failure by restoring intrarenal prostaglandin synthesis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22(7): 1873-81. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm113>

67. Jin QR, Shim WS, Choi MK, et al. Decreased urinary secretion of belotecan in folic acid-induced acute renal failure rats due to down-regulation of Oat1 and Bcrp. *Xenobiotica*. 2009; 39 (10): 711-21. <https://doi.org/10.1080/00498250903026458>
68. Zivkovic V, Jakovljevic V, Pechanova O, Srejovic I, Joksimovic J, Selakovic D, Barudzic N, Djuric DM. Effects of DL-Homocysteine Thiolactone on Cardiac Contractility, Coronary Flow and Oxidative Stress Markers in the Isolated Rat Heart: The Role of Different Gasotransmitters. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 318471. <https://doi.org/10.1155/2013/318471>
69. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *AnalBiochem*. 1979; 95:351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
70. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and (15 N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126 (1): 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
71. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Une, Boca Raton. 1985; pp 123–132. <http://www.worldcat.org/oclc/11842763>
72. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. 1980; 38 (1-2):161–170. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90340-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90340-3)
73. McCord J. M., Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J.Biol. Chem*. 1969; 244 (22): 6056–6063. <http://www.jbc.org/content/244/22/6056.long>
74. Beutler E. Catalase. In: Beutler E, editor. *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. New York (NY): Grune and Stratton; 1982; p. 105-6. <http://www.worldcat.org/oclc/10850472>
75. Tsuchihashi M. Zur kernntnis der blutkatalase. *Biochem. Z*. 1923; 140: 65–72. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10004924373/>
76. Misra H. P., Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem*. 1972; 247 (10):3170–3175. <http://www.jbc.org/content/247/10/3170.long>
77. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*. (Ed. E. Beutler). Grune and Stratton, New York. 1975; pp 112–114. <https://nla.gov.au/anbd.bib-an24626030>
78. Heywood JT. The cardiorenal syndrome: lessons from the ADHERE database and treatment options. *Heart Fail Rev*. 2004; 9: 195–201. <https://doi.org/10.1007/s10741-005-6129-4>
79. Singh, A. P., Junemann, A., Muthuraman, A., Jaggi, A. S., Singh, N., Grover, K., & Dhawan, R. (2012). Animal models of acute renal failure. *Pharmacological Reports* : PR, 64 (1), 31–44. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70728-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70728-4)
80. Schmidt U, Dubach UC, Torhorst J, Huguenin ME, Bieder I, Funk B. Acute Renal Failure after Folate : Na K ATPase in Isolated Rat Renal Tubule. *Europ. J. clin. Invest*. 1973; 3(3): 169-178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1973.tb00346.x>
81. Wan B, Hao L, Qiu Y, et al. Blocking tumor necrosis factor-alpha inhibits folic acid-induced acute renal failure. *Exp Mol Pathol*. 2006; 81 (3): 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.02.005>

82. Wen X, Peng Z, Li Y, et al. One dose of cyclosporine A is protective at initiation of folic acid-induced acute kidney injury in mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27(8): 3100-3109. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr766>
83. Jin QR, Shim WS, Choi MK, et al. Decreased urinary secretion of belotecan in folic acid-induced acute renal failure rats due to down-regulation of Oat1 and Bcrp. *Xenobiotica*. 2009; 39 (10): 711-721. <https://doi.org/10.1080/00498250903026458>
84. Huguenin ME, Birbaumer A, Brunner FP, et al. An evaluation of the role of tubular obstruction in Folic Acid-Induced Acute renal failure in the rat. *Nephron*. 1978; 22: 41-45. <https://doi.org/10.1159/000181422>
85. Schmidt U, Dubach UC, Torhorst J. Behaviour of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in rat kidney tissue by folic acid. *Experientia*. 1969; 25 (12): 1288-90. <https://doi.org/10.1007/BF01897504>
86. Hsueh W, Rostorfer HH. Chemically induced renal hypertrophy in the rat. *Lab Invest*. 1973; 29 (5): 547-55. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4753020/>
87. Yasmeen, T., Qureshi, G. S., & Perveen, S. Adverse effects of Diclofenac sodium on renal parenchyma of adult albino rats. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 2007; 57(7): 349–351. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17867257/>
88. Randjelović, P., Veljković, S., Stojiljković, N., Sokolović, D., & Ilić, I. (). Gentamicin nephrotoxicity in animals: Current knowledge and future perspectives. *EXCLI Journal*. 2017; 16: 388–399. <https://doi.org/10.17179/excli2017-165>
89. Martinez-Salgado C, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM. Glomerular nephrotoxicity of aminoglyco- sides. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; 223: 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.05.004>
90. Alihemmati, A., Yousefi, H., Ahmadiasl, N., & Habibi, P. Apoptosis and histopathology of the heart after renal ischemia-reperfusion in male rat running title: Ischemia-reperfusion injury. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2017; 60 (12): 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160244>
91. Kelly KJ. Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol [Internet]*. 2003; 14 (18):1549-1558 <http://dx.doi.org/10.1097/01.ASN.0000064946.94590.46>
92. Havasi A, Borkan SC. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney Int*. 2011; 80: 29–40. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.120>
93. Burchill L, Velkoska E, Dean RG, et al. Acute kidney injury in the rat causes cardiac remodelling and increases angiotensin-converting enzyme 2 expression. *Exp Physiol*. 2008; 93: 622–630. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.040386>
94. Robinson SC, Bowmer CJ, Yates MS. Cardiac Function in Rats with Acute Renal Failure. *J Pharm Pharmacol*. 1992; 44 (12): 1007-1014. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1992.tb07083.x>
95. Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, et al. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci*. 2007; 81 (10) :779–93. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.07.019>
96. Kolling J, Scherer EB, Da Cunha AA, Da Cunha MJ, Wyse ATS. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: Prevention by folic acid. *Cardiovasc Toxicol*. 2011; 11(1): 67–73. <https://doi.org/10.1007/s12012-010-9094-7>
97. Zivkovic V, Djuric D, Turjacanin-Pantelic D, Marinkovic Z, Stefanovic D, Srejavic I, et al. The effects of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibition on cardiodynamic parameters and coronary flow in isolated rat hearts. *Exp Clin Cardiol [Internet]*. 2013; 18(2):e102. Available from: /pmc/articles/PMC3718609/

98. Patten M, Kramer E, Bunemann J, Wenck C, Thoenes M, Wieland T, Long C. Endotoxin and cytokines alter contractile protein expression in cardiac myocytes in vivo. *Pflugers Arch.* 2001; 442: 920–927. <https://doi.org/10.1007/s004240100612>
99. Raine AEG, Seymour AML, Roberts AFC, Radda GK, Ledingham JGG. Impairment of cardiac function and energetics in experimental renal failure. *J Clin Invest.* 1993; 92 (6): 2934-2940. <https://doi.org/10.1172/JCI116916>
100. Scheuer J, Nivatpumin T, Tada Y. Effects of Moderate Uremia on Cardiac Contractile Responses. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975; 150: 471-474. <https://doi.org/10.3181/00379727-150-39058>
101. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah S. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1997; 29: 465– 477. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(97\)90212-2](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(97)90212-2)
102. Yang, C.L., Du, X.H., Han, Y.X., Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by Gentamicin. *Ren. Fail.* 1995; 17: 21–26. <https://doi.org/10.3109/08860229509036371>
103. Ali, B.H., Abdel Gayoum, A.A., Bashir, A.A. Gentamicin nephrotoxicity in rat: some biochemical correlates. *Pharmacol. Toxicol.* 1992; 70: 419–423. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1992.tb00500.x>
104. Abiola TS, Adebayo OC, Babalola OO, Abiola TS, Adebayo OC, Babalola OO. Diclofenac-Induced Kidney Damage in Wistar Rats: Involvement of Antioxidant Mechanism. *J Biosci Med* 2019; 7 (12): 44–57. <https://doi.org/10.4236/jbm.2019.712005>
105. Li H, Hortmann M, Daiber A, Oelze M, Ostad A, Schwarz PM, et al. COX2-selective and non-selective NSAIDs induce oxidative stress by upregulating vascular NADPH oxidases. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 326 (3): 745-53. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.108.139030>
106. Bolat D, Selcuk ML. Stereological and biochemical evaluation of diclofenac-induced acute nephrotoxicity in rats. *Rev Med Vet (Toulouse).* 2013; 164(6): 290–4. [https://www.researchgate.net/publication/272887118\\_Stereological\\_and\\_biochemical\\_evaluation\\_of\\_diclofenac-induced\\_acute\\_nephrotoxicity\\_in\\_rats](https://www.researchgate.net/publication/272887118_Stereological_and_biochemical_evaluation_of_diclofenac-induced_acute_nephrotoxicity_in_rats)
107. Djuric D, Vusanovic A, Jakovljevic A. The effects of folic acid and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2007; 300: 177–183. <https://doi.org/10.1007/s11010-006-9381-6>
108. Gupta A, Puri V, Sharma R, Puri S. Folic acid induces acute renal failure (ARF) by enhancing renal prooxidant state. *Exp Toxicol Pathol.* 2012; 64(3): 225-32. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.08.010>
109. Costa NA, Gut AL, Azevedo PS, et al. Erythrocyte superoxide dismutase as a biomarker of septic acute kidney injury. *Ann Intensive Care.* 2016; 6 (1): 95. <https://doi.org/10.1186/s13613-016-0198-5>
110. Metnitz GH, Fischer M, Bartens C, Steltzer H, Lang T, Druml W. Impact of acute renal failure on antioxidant status in multiple organ failure. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2000; 44(3): 236-240. <https://doi.org/10.1034/j.1399-6576.2000.440304.x>
111. Jevdjevic M, Ivan S, Zivkovic V, Nevena B, Anica P, Jovana B, et al. The effects of diclofenac and ibuprofen on heart function and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Ser J Exp Clin Res.* 2014; 15 (3): 157-159. <https://doi.org/10.2478/sjecr-2014-0002>
112. Caio-Silva W, Da Silva Dias D, Junho CVC, Panico K, Neres-Santos RS, Pelegriano MT, et al. Characterization of the Oxidative Stress in Renal Ischemia/Reperfusion-Induced Cardiorenal Syndrome Type 3. *Biomed Res Int.* 2020; 2020. Article ID 1605358 <https://doi.org/10.1155/2020/1605358>

113. White LE, Hassoun HT. Inflammatory Mechanisms of Organ Crosstalk during Ischemic Acute Kidney Injury. *Int J Nephrol*. 2012; 2012: 505197. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3118535&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
114. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of Inflammation in Acute Kidney Injury. Morand E, editor. *Mediators Inflamm*. 2009; 2009: 137072. <https://doi.org/10.1155/2009/137072>
115. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest*. 2002; 110: 835–842. <https://doi.org/10.1172/jci15606>
116. Perše M., Večerić-Haler Ž. Cisplatin-induced rodent model of kidney injury: Characteristics and challenges. *Biomed. Res. Int*. 2018; 2018: 1462802. <https://doi.org/10.1155/2018/1462802>
117. Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, Akira S, Reeves WB. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19(5): 923–32. <https://doi.org/10.1681/asn.2007090982>
118. Böhler T, Waiser J, Hepburn H, Gaedeke J, Lehmann C, Hambach P, et al. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine*. 2000; 12(7): 986–91. <https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0633>
119. S JP, Evan Prince S. Diclofenac-induced renal toxicity in female Wistar albino rats is protected by the pre-treatment of aqueous leaves extract of *Madhuca longifolia* through suppression of inflammation, oxidative stress and cytokine formation. *Biomed Pharmacother*. 2018; 98 (October 2017): 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.028>
120. Fattori V, Borghi SM, Guazelli CFS, Giroldo AC, Crespigio J, Bussmann AJC, et al. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF- $\kappa$ B activation in mice. *Pharmacol Res*. 2017; 120: 10–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.039>

## Биографија

- Др Томислав Николић рођен је 03.04.1980. године у Крагујевцу, а своје основно и средње образовање односно завршену средњу Медицинску школу похађао је у Крагујевцу, након чега је уписао основне студије медицине на Медицинском факултету, универзитета у Крагујевцу 1999. године. Након завршених студија и обављеног приправничког стажа своју лекарску праксу започиње 2009. као клинички лекар - волонтер у Интернистичком делу Центра за ургентну медицину КЦ Крагујевац све до 2013. године. Студент је завршне године Докторских академских студија на Факултету Медицинских наука у Крагујевцу, ужа научна област интерна медицина – кардиологија. Од октобра 2011. године запослен је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу као сарадник у настави на катедри за Интерну медицину. Од августа месеца 2020. године изабран је у звање асистента. Звање специјалисте интерне медицине стекао је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу 2018. године. Стални радни однос у Центру за нефрологију и дијализу Универзитетског Клиничког Центра Крагујевац засновао је 2013. године. Тренутно се налази на ужој специјализацији из области нефрологије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Члан је српског лекарског друштва као и Удружења нефролога Србије.

## Библиографија

1. *Nikolic T*, Petrovic D, Matic S, Turnic TN, Jeremic J, Radonjic K, Srejovic I, Zivkovic V, Bolevich S, Bolevich S, Jakovljevic V. The influence of folic acid-induced acute kidney injury on cardiac function and redox status in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2020; 393 (1): 99-109 M22
2. Simic I, Iric-Cupic V, Vucic R, Ignjatovic V, Miloradovic V, Vuckovic-Filipovic J, *Nikolic T*. Three-dimensional reconstruction of intermediate coronary lesions: comparison with FFR. Exp Clin Cardiol 2014; 20 (6): 145-160. M23
3. Simic I, *Nikolic T*, Zdravkovic V, Vucic R, Iric-Cupic V, Ignjatovic V, Vuckovic-Filipovic J. Quality of life in patients waiting for cardiac bypass surgery more than six months. Exp Clin Cardiol 2014; 20 (10): 6463-6473. M23
4. Hamzagic N, *Nikolic T*, Popovska Jovičić B, Čanović P, Jačović S, Petrović D. Acute kidney damage: definition, classification and optimal time of hemodialysis. Ser J Exp Clin Res 2019; 20 (3): 267-275 M51
5. Draskovic B, *Nikolic T*, Jacovic S, Petrovic D. Acute kidney damage in pregnancy: etiopathogenesis, diagnostics and basic principles of treatment. Ser J Exp Clin Res. 2020; 21 (2) : 113-119 M51



6. Antić J, Draginić N, Jovanović M, **Nikolić T**, Jeremić N, Živković V, Srejšović I, Petrović D. Relation between oxidative stress and carotid artery atherosclerosis in hemodialysis patients. DOI: 10.2478/sjecr-2019-0052 M51
7. Janković I, **Nikolić T**, Mitrović S, Vojinović R. Spontaneous subcapsular renal hematoma as a complication of acute pyelonephritis: a case report. Ser J Exp Clin Res 2017; 18 (4): 357-359 M51
8. **Nikolić T**, Radovanović M, Srećković M, Marković M, Petrović D. Cardiorenal syndrome type 1: definition, etiopathogenesis, diagnostic and treatment. Ser J Exp Clin Res 2018; 19 (1): 73-80 M51
9. Petrović D, Srećković M, **Nikolić T**, Živković Radojević M, Miloradović V. Renovascular hypertension: clinical features, differential diagnosis and basic principles of treatment. Ser J Exp Clin Res 2016; 17 (3): 251-256. M51
10. **Николић Т**, Радовановић М, Радовановић М, Видојевић С. Анализа морталитета код болесника са благовремено постављеном дијагнозом акутне дисекције аорте. Медицински часопис 2013; 47(2): 69-73. M53
11. Радовановић МР, Марјановић ВС, Милетић Г, **Николић Т**, Радовановић МС. Фатални инфаркт миокарда након намерне ингестије сумпорне киселине. Медицински часопис 2012; 46 (4): 237-240. M53

Образац 1

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_ Томислав Николић \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Ефекти акутног оштећења бубрега нефротоксичним агенсима на функцију миокарда пацова

\_\_\_\_\_ која је одбрањена на \_\_\_\_\_ Факултету Медицинских Наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У \_\_\_\_\_ Крагујевцу \_\_\_\_\_, 7.12.2021. године,

  
\_\_\_\_\_ потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, \_\_\_\_\_ Томислав Николић \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

"Ефекти акутног оштећења бубрега нефротоксичним агенсима на функцију миокарда пацова"

која је одбрањена на \_\_\_\_\_ Факултету Медицинских Наука \_\_\_\_\_

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 7.12.2021. године,

  
\_\_\_\_\_

потпис аутора

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>