

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandra V. Kezić

Dejstvo mTOR inhibitora everolimusa na
aktivnost NF- κ B, inflamaciju i ishod
ishemijsko/reperfuzionog oštećenja
bubrega kod miševa

Doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Aleksandra V. Kezić

The effect of mTOR inhibitor everolimus on
NF- κ B activity, inflammation and outcome of
kidney ischemia/reperfusion injury in mice

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

PODACI O MENTORU I KOMISIJI

Mentor

Prof. dr Višnja Ležaić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor

Prof. dr Friedrich Thaiss, Univeziteteska klinika Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Nemačka

KOMISIJA

1. Prof. dr Milica Bajčetić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Miloš Marković, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Ljubica Đukanović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, profesor u penziji

REZIME

DEJSTVO mTOR INHIBITORA EVEROLIMUSA NA AKTIVNOST NF-kB, INFLAMACIJU I ISHOD ISHEMIJSKO/REPERFUZIONOG OŠTEĆENJA BUBREGA KOD MIŠEVA

Ishemijsko-reperfuziono (I/R) oštećenje bubrega klinički se manifestuje akutnom bubrežnom insuficijencijom. Javlja se u mnogim patološkim stanjima među kojima je i transplantacija bubrega nakon koje I/R oštećenje produžava period nefunkcionisanja grafta. Dva glavna procesa u patogenezi I/R oštećenja bubrega su apoptoza/nekroza i inflamacija. Jedan od glavnih medijatora inflamacije je NF-kB. Oporavak bubrežne funkcije nakon I/R oštećenja zavisi od brzine regeneracije tubularnih epitelnih ćelija u kojoj aktivacija mTOR puta ima važnu ulogu. Kliničke studije su pokazale odloženu funkcija grafta pacijenata lečenih mTOR inhibitorom rapamicinom nakon transplantacije bubrega, dok je kod pacova tretiranih rapamicinom i podvrgnutih I/R oštećenju bubrega nađena povećana apoptoza i odložena regeneracija tubularnih epitelnih ćelija sa odloženim oporavkom bubrežne funkcije.

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita uticaj mTOR inhibitora everolimusa na tok i ishod I/R oštećenja bubrega miševa, kao i efekat imunomodulatornog svojstva everolimusa na razvoj inflamacije u bubrezima nakon I/R oštećenja ispitiujući istovremeno aktivnost NF-kB. I/R oštećenje izazivano je postavljanjem atraumatskih klema na vaskularne peteljke oba bubrega miševa soja C57 BL/6N u trajanju od 45 min. Eksperimentalne životinje podvrgnute I/R oštećenju bile su podeljene na grupu netretiranih i grupu životinja tretiranih everolimusom. Po sedam životinja iz svake grupe žrtvovano je nakon 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h i jednog dana, dva dana, tri dana i sedam dana od trenutka započinjanja reperfuzije. Everolimus je aplikovan životinjama jednom dnevno subkutano u dozi od 0,25mg/kg telesne težine. Prvo doza everolimusa davana je 24 h pre izazivanja I/R oštećenja bubrega. U momentu žrtvovanja uzorkovana je krv za određivanje uree i kreatinina i tkivo bubrega za PAS bojenje i bojenje na F4/80 i CD3 markere, spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima antioksidacione zaštite kao i za određivanje proinflamatornih i

antiinflamatornih citokina, hem oksigenaze- 1 (HO-1) i komponenti NF- κ B familije transkripcionih faktora primenom kvantitativnog PCR-a, Western blota i EMSA metoda.

Naše istraživanje je pokazalo da tretman mTOR inhibitorom everolimusom prouzrokuje prolazno pogoršanje patohistoloških promena u tkivu bubrega u ranom periodu I/R oštećenja, nakon čega sledi brža rezolucija tkivnog oštećenja u kasnoj fazi I/R oštećenja u kojoj je primećena značajno manja infiltracija makrofaga u poređenju sa netretiranim životinjama. Uočena je bifazna ekspresija iRNK za hemokine (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10) koja pokazuje prvi maksimum ekspresije u ranoj fazi a drugi maksimum ekspresije na početku reparacione faze I/R oštećenja. Everolimus ne menja uočenu kinetiku ekspresije, ali značajno smanjuje njen intenzitet. Netretirane životinje pokazuju i treći porast ekspresije iRNK za CCL3, CCL5 i CXCL10 sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja. Dejstvom everolimusa ekspresija mRNK za TNF- α , IL-1 β i iNOS je povećana, dok je ekspresija HO-1 smanjena u bubrezima u ranoj fazi I/R oštećenja u poređenju sa netretiranim životinjama. Everolimus povećava aktivnost NF- κ B pokazujući skoro kontinuirano povećanu aktivnost vezivanja NF- κ B za DNK za razliku od netretiranih životinja koje pokazuju cikličnu aktivnost NF- κ B. Everolimus stimuliše pored klasičnog i alternativni put aktivacije NF- κ B koji se manifestuje povećanom ekspresijom RelB u jedru naročito u reparacionoj fazi I/R oštećenja bubrega.

U zaključku se može reći da tretman everolimusom povećava oksidativni i nitrozativni stres i stimuliše urođeni imunski odgovor u ranoj fazi I/R oštećenja bubrega, dok se u reparacionoj fazi I/R oštećenja uočava imunomodulatorni efekat everolimusa manifestovan smanjenom infiltracijom makrofaga i smanjenom produkcijom hemokina. Navedeni podaci mogu biti od kliničkog značaja u smislu određivanja povoljnog trenutka nakon transplantacije bubrega kada treba započeti imunosupresivnu terapiju m-TOR inhibitorima.

Ključne reči: ishemijsko/reperfuziono oštećenje, mTOR inhibitor, everolimus, inflamacija, hemokini, NF- κ B

Naučna oblast: Nefrologija i imunofarmakologija

SUMMARY

THE EFFECT OF mTOR INHIBITOR EVEROLIMUS ON NF-kB ACTIVITY, INFLAMMATION AND OUTCOME OF KIDNEY ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY IN MICE

Kidney ischemia/reperfusion (I/R) injury is clinically manifested by acute renal failure and is found in a numerous pathological conditions including kidney transplantation as one of very important, since I/R injury causes delayed graft function (DGF). Two key features of I/R injury are apoptosis/necrosis and inflammation. One of the most important mediators of inflammation is NF-kB. The recovery of renal function after I/R injury depends on tubular epithelial cell regeneration in which mTOR pathway activation plays an important role. Clinical studies reported increasing number of DGF in the patients who were treated by mTOR inhibitor rapamycin after kidney transplantation, while rapamycin treatment in a rat model of kidney I/R injury increased tubular epithelial cells apoptosis and delayed tubular epithelial cell regeneration and recovery of kidney function.

The aim of this study was to investigate the influence of mTOR inhibitor everolimus on course and outcome of kidney I/R injury, and also the effect of immunomodulatory properties of everolimus on kidney inflammation after I/R injury investigating contemporary NF-kB activity. I/R injury was induced in C57 BL/6N mice by occlusion of both renal pedicles with microvascular clamps for 45 minutes. Mice subjected to I/R injury were divided in two experimental groups, a group of non-treated and group of everolimus-treated animals. Seven animals in each group and each time point were sacrificed at the following time points: T = 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 1, 2, 3 and 7 days after IRI induction. Everolimus was administered subcutaneously in a dose of 0.25mg/kg b.w. once daily, starting one day before I/R injury induction. At the moment of sacrifice the blood for BUN and creatinine determination was taken. Part of kidney tissue was used for PAS method and immunohistochemistry staining of F4/80 and CD3 markers. In other parts of kidney tissue the activity of enzymes of anti-oxidative defense was determined using

spectrophotometry as proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, heme oxygenase-1 (HO-1) and proteins belonging NF- κ B transcription family using real time PCR, Western blot and EMSA .

Our investigation showed that treatment with mTOR inhibitor everolimus caused transient deterioration of kidney pathohistology changes in early period of I/R injury, followed by faster resolution in late phase of I/R injury, characterized by significantly decreased macrophage infiltration comparing to non-treated animals. Kidney I/R injury in mice is characterized by biphasic chemokine (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL10) mRNA expression showing first peak of expression in early, inflammatory phase and second peak at the beginning of reparatory phase of I/R injury. Everolimus does not change observed kinetic of expression, but decreases it's intensity. Non-treated animals show even third peak of CCL3, CCL5 and CXCL10 mRNA expression on day 7 after I/R injury induction. The expression of TNF- α , IL-1 β and iNOS mRNA is increased, while HO-1 expression is decreased in kidneys of everolimus-treated animals in early phase of kidney I/R injury, comparing to non-treated animals. Everolimus increases NF- κ B activity showing almost continued nuclear NF- κ B/DNA binding activity, differing from cyclic NF- κ B/DNA binding activity observed in non-treated animals. Except of the classical, everolimus stimulates also alternative way of NF- κ B activation which is manifested by increased nuclear RelB expression especially in reparatory phase of kidney I/R injury.

In conclusion, everolimus increases oxidative and nitrosative stress and stimulates innate immune response in early, inflammatory phase of kidney I/R injury, while in reparatory phase of I/R injury everolimus exerts immunomodulatory effect manifested by decreased macrophage infiltration and decreased . These data might be of clinical relevance in making decision when to start the treatment with mTOR inhibitors after kidney transplantation.

Key words: ischemia/reperfusion injury, mTOR inhibitor, everolimus, inflamamation, chemokines, NF- κ B

Scientific field: Nephrology and Immunopharmacology

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Definicija i medicinski značaj ishemijsko/reperfuzionog oštećenja	1
1.2. Patofiziološki mehanizmi I/R oštećenja	1
1.2.1. Promene u cirkulaciji i ćelijskoj morfologiji i funkciji u I/R oštećenju bubrega	1
1.2.2. Funkcija mitohondrija i uloga oksidativnog stresa u I/R oštećenju	3
1.2.3. Uloga NF- κ B u patogenezi I/R oštećenja	5
1.2.4. Uloga inflamacije u patogenezi I/R oštećenja bubrega	9
1.3. Uticaj imunosupresivne terapije na I/R oštećenje bubrega	13
1.4. Aktivacija i uloga mTOR receptora u fiziologiji ćelije	14
1.5. Dejstvo mTOR inhibitora u ćelijama imunskog sistema	17
1.6. Primena everolimusa	18
2. CILJEVI RADA	20
3. MATERIJAL I METODE	21
3.1. Eksperimentalne životinje	21
3.2. Lekovi	21
3.3. Izazivanje I/R oštećenja	22
3.4. Eksperimentalni dizajn	22
3.5. Određivanje uree i kreatinina u serumu	23

3.6. Određivanje everolimusa u krvi	23
3.7. Izolacija proteina iz tkiva bubrega	24
3.8. Izolacija RNK iz tkiva bubrega upotrebom trizola	24
3.9. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) od ukupne RNK	25
3.10. Kvantitativni PCR	26
3.11. Western blot	28
3.12. „ <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> “ (EMSA)	31
3.13. Metoda optičke mikroskopije i imunohistohemijsko bojenje	33
3.13.1. „ <i>Periodic acid-Schiff</i> “ (PAS) protokol bojenja tkiva	33
3.13.2. Imunohistohemijsko bojenje	33
3.14. Metode za određivanje aktivnosti enzima antioksidacione zaštite iz tkiva bub – rega	34
3.14.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	34
3.13.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	36
3.14.3. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px)	37
3.14.4. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR)	38
3.15. Statistička obrada podataka	39
4. REZULTATI	40
4.1. mTOR inhibicija	40
4.2. Nivo everolimusa u krvi	41

4.3 Analiza preživljavanja u I/R oštećenju bubrega	42
4.4. Bubrežna funkcija posle indukcije I/R oštećenja	43
4.5. Indeks tubulointersticijskog oštećenja	45
4.6. Ekspresija iRNK za hemokine i proinflamatorne citokine u tkivu bubrega posle indukcije I/R oštećenja	47
4.6.1. Ekspresija hemokina	48
4.6.2. Ekspresija TNF- α i IL-1 β	51
4.7. Ekspresija iRNK za antiinflamatorne citokine u I/R oštećenju bubrega	53
4.8. Dejstvo everolimusa na prisustvo F4/80 pozitivnih ćelija u I/R oštećenja bubrega miševa	55
4.9. Ekspresija iRNK za CXCR3 u bubregu posle indukcije I/R oštećenja	58
4.10. Infiltracija T-limfocita u tkivu bubrega posle indukcije I/R oštećenja	59
4.11. Nuklearna translokacija p65 i fosfo-Ser536-p65 u I/R oštećenju bubrega	61
4.12. Određivanje ekspresije I κ B α i fosfo-(Ser32/Ser36)-I κ B α u bubrezima posle induk- cije I/R oštećenja	64
4.13. Aktivnost vezivanja NF- κ B za DNK u I/R oštećenju bubrega	67
4.14. Nuklearna ekspresija RelB u I/R oštećenju bubrega	69
4.15. Nuklearna ekspresija p52 u I/R oštećenju bubrega	70
4.16. Uticaj everolimusa na aktivnost enzima antioksidacione zaštite u I/R oštećenju bubrega	71

4.16.1. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT)	71
4.16.2. Aktivnost glutation reduktaze (GR) i glutation peroksidaze (GSH-Px) ...	73
4.17. Produkcija iRNK za iNOS u I/R oštećenju bubrega	75
4.18. Ekspresija hem oksigenaze-1 (HO-1) u I/R oštećenju bubrega	77
5. DISKUSIJA	79
6. ZAKLJUČAK	96
7. LITERATURA	98

1. UVOD

1.1. Definicija i medicinski značaj ishemijsko/reperfuzionog oštećenja

Ishemijsko/reperfuziono (I/R) oštećenje predstavlja najčešći uzrok akutnog oštećenja bubrega i posledično akutne bubrežne insuficijencije (1). U osnovi reperfuzionog fenomena leži niz događaja koji paradoksalno nastavljaju da oštećuju tkivo uprkos uspostavljenoj cirkulaciji i dopremanju kiseonika u tkivo koje je prethodno bilo pod uticajem ishemije. Posebno je značajno I/R oštećenje koje nastaje u toku transplantacije bubrega i dovodi do odložene funkcije grafta što je povezano sa većom frekvencom akutnog odbacivanja i nastankom hronične alograft nefropatije (2, 3). I/R oštećenje može rezultovati razvojem sistemskog inflamatornog odgovora i disfunkcije brojnih organa sa posledičnom visokom stopom mortaliteta (4, 5, 6, 7). Sprovedena brojna istraživanja za sada ne daju usaglašen stav u vezi lečenja i/ili sprečavanja akutnog ishemijsko/reperfuzionog oštećenja bubrega.

1.2. Patofiziološki mehanizmi I/R oštećenja

1.2.1. Promene u cirkulaciji i ćelijskoj morfologiji i funkciji u I/R oštećenju bubrega

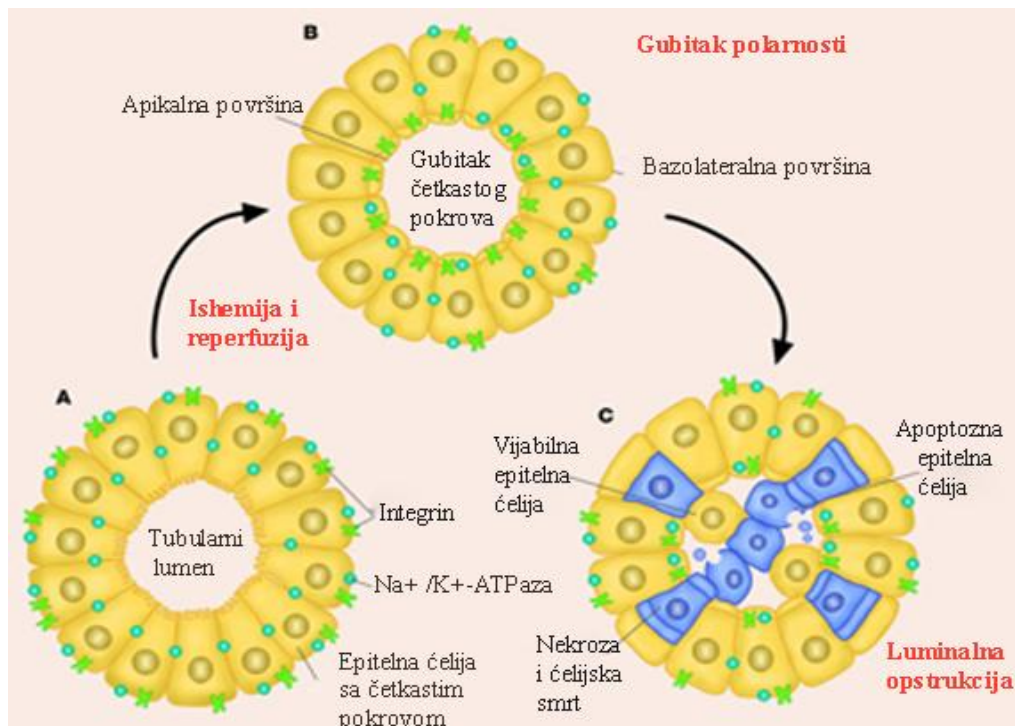
Nakon uspostavljanja reperfuzije, postishemijski bubreg pokazuje značajne promene u hemodinamici koje se ogledaju u uspostavljenoj kortikalnoj cirkulaciji i kongestiji peritubularnih kapilara u spoljašnjoj meduli koja se karakteriše leukocitnom akumulacijom i oštećenjem endotela što dovodi do nastavka hipoperfuzije tog regiona, čime se ishemijsko oštećenje bubrega može nazvati kao vazomotorna nefropatija (7, 8). Postishemijska kongestija ovog regiona pogoršava već postojeću relativnu hipoksiju koja se i u normalnim uslovima nalazi u zoni spoljašnje medule, što dovodi do apoptoze i nekroze epitelnih ćelija tubula koji se nalaze u ovoj regiji. U osnovi cirkulatorne disfunkcije je oštećenje endotela sa lokalnom neravnotežom koja se karakteriše povećanom produkcijom vazokonstriktornih supstanci kao što je endotelin i smanjenom

produkcijom vazodilatatornih supstanci u endotelu kao što je azot-monoksid NO (1, 9, 10).

Faza ishemije dovodi do hipoksemičnog oštećenja endotela koje se morfološki manifestuje oštećenjem aktinskog skeleta ćelija, bubrenjem ćelija, slabljenjem međućelijskih veza i odlublivanjem ćelija, koje se kao slobodne mogu naći i u cirkulaciji (1, 8). Ogoljena mesta u krvnom sudu su sklona izrazitoj vazokonstrukciji koja u fazi reperfuzije može dovesti čak i do reverzije toka krvi u peritubularnim kapilarima (11). Na endotelu se uočava povećana ekspresija adhezivnih molekula kao što je intercelularni adhezivni molekul-1 („intercellular adhesion molecule 1“ – ICAM-1) već 1 sat nakon I/R oštećenja koji ubrzava adheziju leukocita za endotel i njihovu migraciju u perivaskularno tkivo sa započinjanjem inflamacije (12). U prilog takvoj ulozi ICAM-1 govore i rezultati da su miševi koji nemaju ICAM-1 zaštićeni od I/R oštećenja (13). Endotelne ćelije povećavaju i ekspresiju hemokina fraktalkina (CX3CL1) koji predstavlja ligand za CX3CR1, receptor značajno eksprimiran na makrofagama i bitan za migraciju makrofaga iz krvnih sudova u okolni intersticijum (14). U procesima agregacije leukocita u peritubularnim kapilarima učestvuju i trombociti preko P-selektina što dovodi do stvaranja agregata neutrofila i trombocita u peritubularnim kapilarima sa dodatnim kompromitovanjem cirkulacije (12, 15).

Produbljenje lokalne hipoksije u toku reperfuzije dovodi do promena metabolizma u tubularnim epitelnim ćelijama sa padom adenozin trifosfata (ATP) rezultirajući u gubitku polarnosti bazolateralne Na⁺/K⁺-ATPaze i prekidu aktina u apikalnim delovima ćelije sa redistribucijom aktina iz apikalnih delova u citoplazmu i β1 integrina iz bazalnih u apikalne delove ćelije (16, 17) (Slika 1).

Posledice navedenih procesa su povećane propustljivosti membrana sa otokom ćelija, smanjena reapsorpcija Na sa povećanjem frakcione ekskrecije Na uz odlubljivanje tubularnih epitelnih ćelija i stvaranje cilindara, dok se na mestima odlubljenih tubularnih epitelnih ćelija uočava povratni tok tubularne tečnosti iz tubula u intersticijum („back leak“ fenomen) (1, 10). U početnoj fazi optičkom mikroskopijom uočava se gubitak četkastog pokrova tubularnih epitelnih ćelija. Kako promene napreduju uočavaju se pojedinačna polja dilatacije proksimalnih tubula sa poljima gubitka tubularnih epitelnih ćelija i pojavom cilindara u distalnim tubulima uz vrlo mala



Slika 1. Prikaz promena na tubularnim epitelnim ćelijama u I/R oštećenju

(modifikovano iz reference br. 1)

polja nekroze koja se skoro isključivo nalaze u spoljašnjem regionu medule bubrega. U proksimalnim tubulima se uočava kako, odlubljivanje vijabilnih ćelija tako i procesi apoptoze i sekundarno nekroze, dok se u distalnim tubulima uočava skoro isključivo apoptoza (10). Sve navedene morfološke promene su praćene izraženom inflamatornom reakcijom koja pored apoptoze i nekroze predstavlja bitnu karakteristiku I/R oštećenja.

1.2.2. Funkcija mitohondrija i uloga oksidativnog stresa u I/R oštećenju

Jedna od glavnih promena u I/R oštećenju dešava se na nivou mitohondrija koja menja energetski naboj ćelije, povećava produkciju slobodnih kiseoničnih radikala (SKR) i utiče na sistem zaštite protiv štetnog dejstva oksidativnog stresa. Ćelijska hipoksija inhibira ekspresiju multikomponentne citohrom oksidaze (kompleks IV) koja predstavlja finalno mesto oksidativne fosforilacije u mitohondrijama (18). Gubitak

aktivnosti citohrom oksidaze dovodi do oštećenja ćelija za vreme reoksigenacije zato što odsustvo finalnog akceptora elektrona povećava produkciju superoksidnog anjona na kompleksima koji prtehode u respiratornom lancu (18, 19). U toku hipoksije respiratorni lanac u mitohondrijama preuzima elektrone i prelazi u redukovano stanje što potencira nastanak superoksidnog anjona (O_2^-). U toku reoksigenacije mitohondrijalni respiratorni lanac nastavlja da stvara O_2^- koji dejstvom superoksid-dismutaze (SOD) prelazi u vodonik peroksid (H_2O_2), koji kasnije reagujući sa Fe formira hidroksilne radikale ($\cdot OH$). Neutralizaciju štetnog dejstva H_2O_2 vrši katalaza (CAT) i glutation-peroksidaza (GSH-Px) uz utrošak glutationa (GSH) koji prelazi u oksidovanu formu (GSSG). Glutation-reduktaza (GR) regeneriše GSH iz GSSG uz utrošak nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH). Navedeni enzimi predstavljaju parametre antioksidantne zaštite. Antioksidantni sistem zaštite na čelu sa SOD značajno smanjuje svoju aktivnost kao i ekspresiju putem smanjene stabilnosti iRNK u toku hipoksije, nastavljajući svoju smanjenu aktivnost i u toku reoksigenacije (20, 21).

Osim mitohondrijalnog respiratornog lanca postoje i drugi odeljci u ćeliji gde mogu nastati SKR kao što je citoplazma u kojoj SKR nastaju aktivnošću ksantin-dehidrogenaze koja je učestvuje u oksidativnom metabolizmu purina (22). SKR osim direktnog oštećenja proteina, DNK i lipidnih struktura u ćeliji, reaguju sa slobodnim azotnim radikalom ($\cdot NO$) dovodeći do nastanka peroksinitritnog anjona ($ONOO^-$) koji može oštetiti brojne proteine u ćeliji nitrozilacijom tirozinskih rezidua (23, 24). U mnogim ćelijskim tipovima dokazana je indukcija inducibilne NO-sintaze (iNOS) koja dovodi do nastanka $\cdot NO$. Nitrozilacijom se mogu inhibirati enzimi respiratornog lanca a isto tako i enzimi antioksidativne odbrane kao što je SOD (25). Međutim, postoje dokazi koji ukazuju na protektivno dejstvo $\cdot NO$ u toku I/R oštećenja i ono se zasniva na povećanju ćelijskog cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) i parcijalnoj inhibiciji ćelijske respiracije sa posledičnim smanjenim preuzimanjem O_2 i smanjenjem produkcije O_2^- (26).

Osim smanjene ekspresije kompleksa IV, u toku reoksigenacije hipoksijskih mitohondrija uočava se i disfunkcija kompleksa I, što dovodi do smanjene produkcije energije u tubularnim epitelnim ćelijama (22, 27). Anaerobni metabolizam sukcinata i metabolita ciklusa trikarbonskih kiselina generiše dovoljno adenzin trifosfata (ATP) i

štiti proksimalne tubularne epitelne ćelije od otećenja nastalog reoksigenacijom (28). Ukoliko dođe do većeg influksa Ca u mitohondrije sa aktivacijom pora koje povećavaju propustljivost mitohondrijalne membrane („*mitochondrial permeability transition pores*“ – MPTP), sa posledičnom mitohondrijalnom depolarizacijom i gubitkom citohroma C iz mitohondrija dolazi do aktivacije kaspaza i programa ćelijske smrti sa razvojem apoptoze (22, 29, 30). SKR ne samo što direktno učestvuju u oštećenju proteina i lipidnih struktura u ćeliji peroksidacijom (31), već i direktno učestvuju u aktivaciji određenih signalnih transdukcionih puteva kao što su nuklearni faktor-kapa B („*nuclear factor-kappa B*“ – NF-κB), faktor indukovano hipoksijom („*hypoxia-inducible factor*“ – HIF-1), aktivirajući protein 1 („*activator protein 1*“ – AP-1), i nekih protein kinaza aktiviranih mitogenom („*mitogen activated protein kinase*“ – MAPK) (32, 33), a mogu i direktno aktivirati programe ćelijske smrti (30, 34). Pojačana ekspresija antiapoptotskog proteina zvanog „*B cell lymphoma-2*“ (Bcl-2) sprečava oslobađanje citohroma C iz mitohondrija i posledičnu aktivaciju kaspaze 3 i kaspaze 9, kao i produkciju O₂⁻, što sve zajedno sprečava proces apoptoze (22, 35).

1.2.3. Uloga NF-κB u patogenezi I/R oštećenja

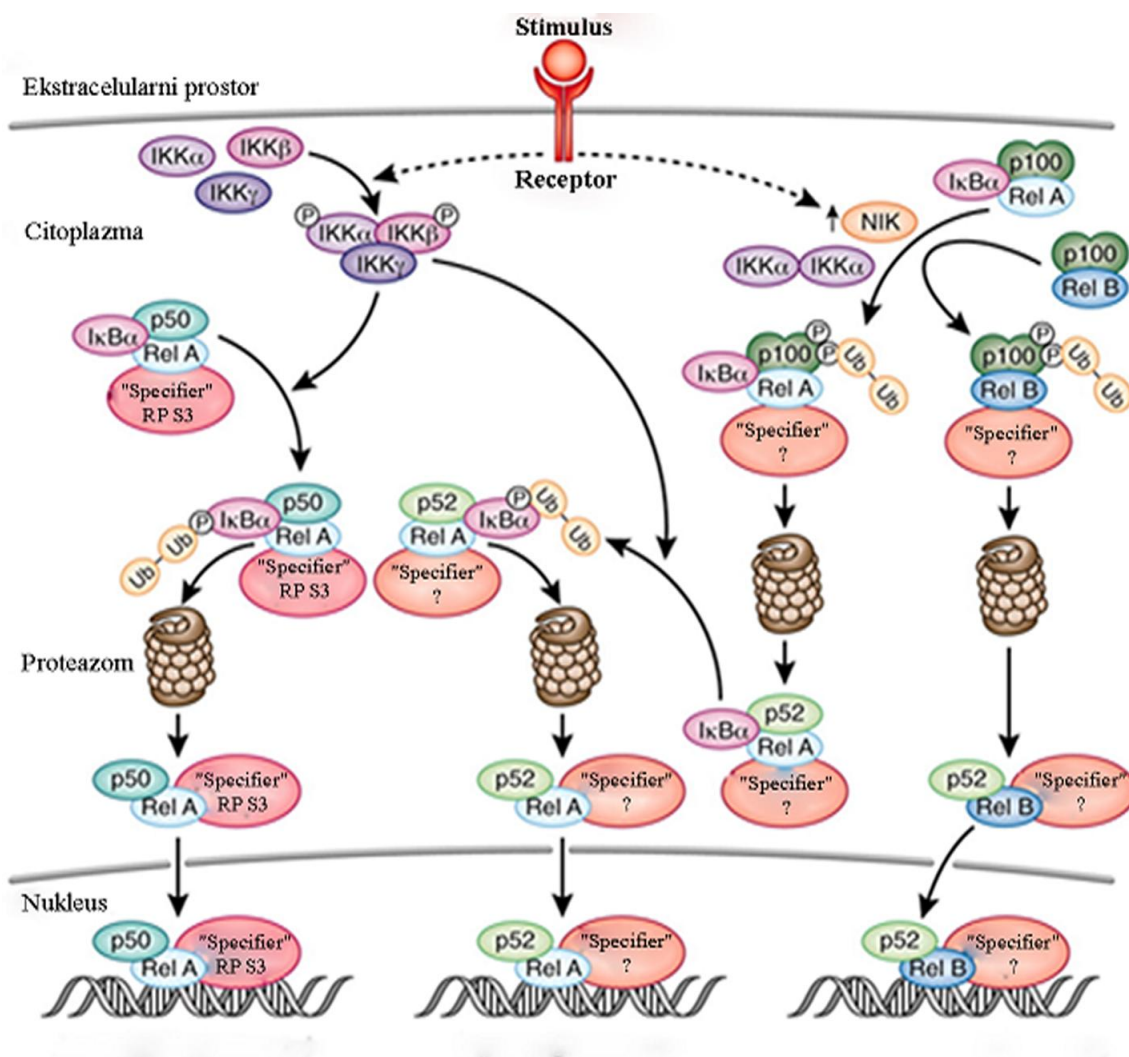
NF-κB se javlja kao jedan od ključnih faktora u regulaciji događaja koji leže u osnovi I/R oštećenja. On predstavlja glavni transkripcioni faktor koji je uključen u regulaciju imunskog odgovora, posreduje inflamaciju, reguliše citoprotektivne tj. antiapoptozne puteve ali, paradoksalno, i proapoptozne puteve (36, 37, 38, 39). Uporedo sa produkcijom SKR u vaskularnom endotelu registruje se povećana aktivnost NF-κB i povećana ekspresija ICAM-1 (40). Apoptoza u endotelijalnom reperfuzionom modelu zahteva aktivaciju NF-κB koji smanjuje ekspresiju Bcl-2, dok je u drugim studijama naglašena antiapoptotska uloga NF-κB (41, 42). Davanje sintetskih oligonukleotida koji oponašaju komplementarne sekvence nukleinskih kiselina za koje se vezuje NF-κB (NF-κB „*decoy oligonucleotides*“), kompetitivnim putem sprečava vezivanje NF-κB za ciljne promoterske regione gena i dovodi do značajno smanjenog oštećenja u I/R modelu oštećenja bubrega što se manifestuje pre svega u smanjenju inflamacije u bubrezima (43). Sem proinflamatorne uloge dokazana je i uloga NF-κB u rezoluciji

inflamacije, što ukazuje na postojanje bifaznog odgovora NF- κ B kod inflamatornih oboljenja (44).

Pod uticajem hipoksije preusmerava se transkripciona aktivnost ćelije u cilju veće produkcije citoprotektivnih i proinflamatornih komponenti (36). Taj proces je u najvećoj meri kontrolisan dejstvom NF- κ B. Nakon reperfuzije i dalje se održava prethodno indukovana promena transkripcione aktivnosti ćelija ishemijskog tkiva kao odgovor na novonastale uslove. Ovaj odgovor pre svega podrazumeva produkciju HIF-1, heterodimera koji se sastoji od konstitutivno eksprimiranog HIF-1 β i inducibilnog HIF-1 α (45). Nakon indukcije HIF kao odgovora na hipoksiju, u ćelijama se beleži i porast ekspresije NF- κ B i I κ B α , inhibitora NF- κ B (46). NF- κ B svojim dejstvom reguliše nivo iRNK za HIF-1 α , mada je stabilnost tj. dužina dejstva HIF-1 α najviše uslovljena parcijalnim pritiskom kiseonika. Ovim svojim dejstvom NF- κ B utiče na odgovor ćelije na hipoksiju a sa druge strane HIF-1 „priprema“ ćeliju koja se već nalazi u uslovima hipoksije za posledične puteve inflamacije i opstanka koji su posredovani dejstvom NF- κ B.

NF- κ B se pojavljuje kao homodimer ili heterodimer. Homodimernu ili heterodimernu formu čine dva proteina koji pripadaju Rel familiji proteina. Rel familija se sastoji od sledećih proteina: RelA (p65), RelB, cRel, p105/p50 (NF- κ B1) i p100/p52 (NF- κ B2) (47). Svih pet proteina imaju Rel homologni domen koji sadrži sekvencu koja vezuje DNK i nuklearni lokalizacioni signal (48). Nakon aktivacije NF- κ B dolazi do ekspozicije nuklearnog lokalizacionog signala koji ubrzava translokaciju NF- κ B kompleksa u jedro gde se može vezati za κ B „konsenzus“ sekvencu 5'GGGRNNYYCC3' (47). Kompletno vezivanje za κ B sekvencu na DNK se ostvaruje samo ako je učestvovao ceo NF- κ B kompleks što znači da oba proteina Rel familije učestvuju u vezivanju za DNK. U citoplazmi ćelija inaktivna forma NF- κ B kompleksa postoji kao trimerna forma koja se sastoji od već spomenute homodimerne ili heterodimerne forme za koju je vezan jedan od inhibitornih proteina klase „*kappa*“-B proteina: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ ili B-ćelijski limfom-3 protein („*B cell lymphoma-3*“ – Bcl-3) (49, 50). U slučaju NF- κ B kompleksa koji sadrže p100 ili p105, inhibicija se ostvaruje putem aktivnosti karboksiterminalnog kraja koji ima značajan stepen homologije sa I κ B proteinima (49). Homodimerna ili heterodimerna forma se

dezinhibira i premešta u jedro nakon aktivacije jednog od tri sledeća puta: kanonički ili klasični put, alternativni put i hibridni put (51, 52, 53, 54) (Slika 2).



Slika 2. Putevi aktivacije NF-κB (modifikovano iz reference br. 54)

Kanonički tj. klasični put aktivacije NF-κB je najčešći. U ovom putu stimulusi kao što su interleukin-1 (IL-1) i faktor nekroze tumora-alfa („*tumor necrosis factor-alpha*“ – TNF-α) nakon vezivanja za specifične ćelijske receptore preko niza kaskadnih reakcija aktiviraju IκB kinazni kompleks (IKK) koji se sastoji od IKKα, IKKβ i regulatorne subjedinice NEMO/IKKγ. Aktivacija se sastoji u fosforilaciji IKKβ nakon čega fosforilisana forma IKKβ fosforiliše serin na poziciji 32 (ser32) i serin na poziciji 36 (ser36) na N-terminalnom kraju IκBα (49, 51). Nakon fosforilacije sledi

poliubikvitinilacija (lizin 21 i 22 u I κ B α) i na kraju degradacija I κ B α putem aktivnosti 20S/26S proteazoma kojom se NF- κ B dimerna forma oslobađa i transportuje u jezgro gde se vezuje za genom i reguliše transkripciju određenih gena (49, 51). Dezinhibicija NF- κ B kompleksa koji sadrže p100 ili p105 se ostvaruje nakon proteolitičke degradacije karboksiterminalnog kraja kojom nastaju p52 i p50 (55). Dominantna izoforma NF- κ B u humanim tkivima se sastoji od p65 i p50. Ekspresija RelB je uglavnom ograničena na limfoidno i hematopoezno tkivo. Asocijacija određenih I κ B proteina sa Rel dimerima je visoko specifična implicirajući ulogu tipa ćelije i stimulusa u aktivaciji određenih puteva koji delujući na određene I κ B forme proteina rezultiraju aktivacijom tačno određenih NF- κ B homo ili heterodimernih formi sa određenom dužinom delovanja. Nakon dejstva TNF- α nastaje degradacija I κ B α sa posledičnom kratkotrajnom aktivnošću NF- κ B, dok se dejstvo lipopolisaharida (LPS) ili IL-1 karakteriše degradacijom i I κ B α i I κ B β i dužim dejstvom NF- κ B koje traje nekoliko sati do nekoliko dana (56). Dodatna modifikacija aktivnosti NF- κ B u cilju povećanja njegove transkripcione aktivnosti se ostvaruje fosforilacijom transaktivacionih domena p65 i acetilacijom njegovih perifernih rezidua, promenama hromatinske strukture, istovremenim vezivanjem za DNK nekih od I κ B proteina kao što je Bcl3 ili vezivanjem dodatnih transkripcionih faktora na κ B „konsenzus“ sekvencu (54, 57, 58). Dodatno stimulisanje specifičnog vezivanja NF- κ B homo ili heterodimera za ciljne gene obezbeđuje ribozomalni protein S3 koji se može naći vezan za NF- κ B dimere u citoplazmi i drugačije je nazvan „*specifier*“ (54). U klasičnom putu IKK- β je ključni molekul sa efektorskim dejstvom pri čemu je uloga IKK- α dodatna i sastoji se u modifikaciji histonske strukture i intranuklearne NF- κ B aktivnosti (54, 59). Odgovor akutne faze se završava kada se pod uticajem NF- κ B sintetiše dovoljna količina I κ B α koja će vezivanjem sa aktivnom homodimernom ili heterodimernom formom ponovo uspostaviti trimernu formu kao inaktivni oblik NF- κ B. Osim I κ B α , najvažniji ciljni geni čiju transkripciju reguliše NF- κ B su geni za proinflamatorne produkte kao što su IL-1 α i β , TNF- α , interleukin 8 (IL-8), hemokinski ligandi 2 i 5 sa CC motivom (CCL2 i CCL5), vaskularni ćelijski adhezivni molekul („*vascular cell adhesion molecule*“ – VCAM-1), ICAM-1, ciklooksigenaza-2 (COX-2), iNOS, p53, antiapoptozni proteini (cIAP-1, cIAP-2, XIAP, A1, c-FLIP) i brojni drugi (54, 60).

U alternativnom putu aktivnošću IKK- α i kinaze koja indukuje NF- κ B („*NF- κ B inducing kinase*“ – NIK) vrši se posttranslaciona razgradnja p100 iz koje nastaje p52 sa generacijom RelB/p52 heterodimera (54, 61). Fosforilisanu formu p100 prepoznaje E3 ligaza i zatim je ubikvitiniliše, a zatim fosfo-ubikvitinilisana forma p100 reaguje se S9 podjedinicom 19S proteazoma gde se razgradi do nastanka p52 (61). Genetska istraživanja su pokazala da u citoplazmi egzistiraju kompleksi koji sadrže samo IKK- α . Glavni inhibitor RelB je p100 i stvaranje p52/RelB rezultira proteolitičkom razgradnjom pula p100/RelB (62). Ovi kompleksi se ne zadržavaju u citoplazmi već ubrzo ulaze u jedro i vezuju se za ciljne gene da bi pokrenuli transkripciju.

Za razliku od njih p52/p65 i p52/cRel nastali nakon proteolitičke razgradnje p100/p65 i p100/c-Rel ostaju u citoplazmi vezujući se za jedan od inhibitornih I κ B proteina, čija je degradacija indukovana aktivacijom IKK kompleksa klasičnim putem (63). To znači da aktivacija heterodimera p52/RelB zahteva samo aktivnost alternativnog puta, dok aktivacija p52/p65 ili p52/cRel uključuje „hibridne puteve“ tj. kombinaciju klasičnog i alternativnog puta koja se u stvari ogleda u osobini da aktivatori alternativnog puta istovremeno aktiviraju i klasični put. To dejstvo ostvaruju citokini koji pripadaju TNF superfamiliji kao što su ligand za CD40 (CD40L), B-ćelijski aktivirajući faktor („*B-cell activating factor*“ – BAFF), slab induktor apoptoze koji je sličan TNF („*TNF related weak inducer of apoptosis*“ – Tweak), ligand za receptor koji aktivira NF- κ B („*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*“ – RANKL), limfotoksin alfa1beta2 (LT α 1 β 2) itd. (64, 65).

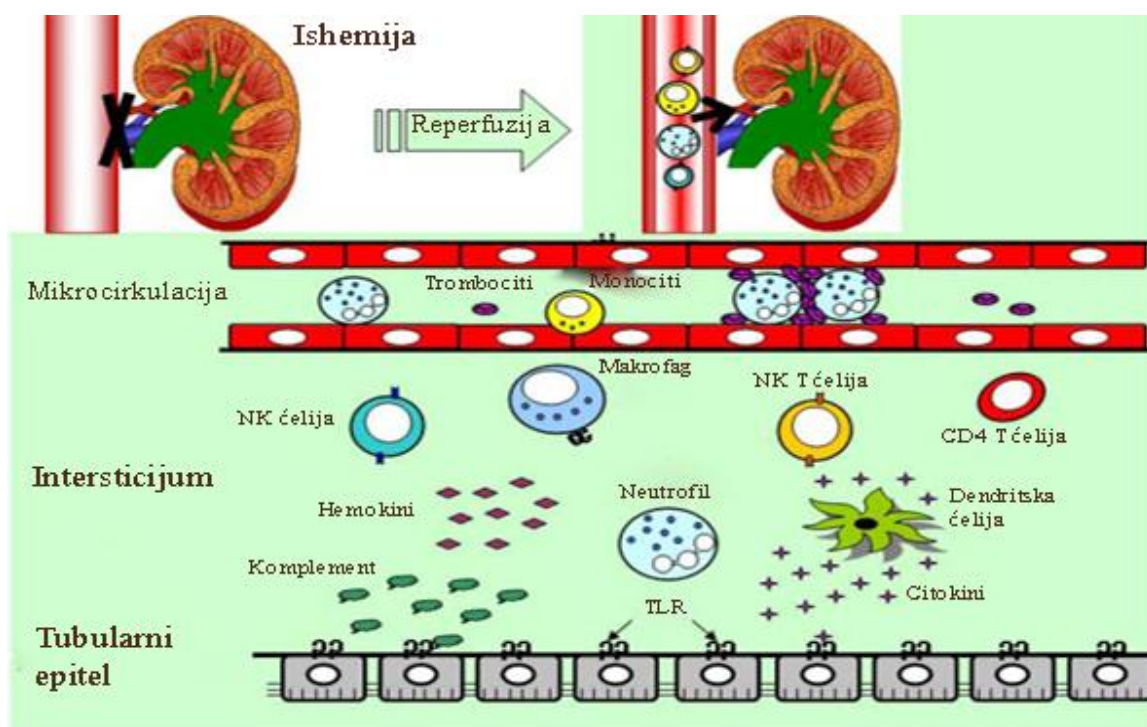
1.2.4. Uloga inflamacije u patogenezi I/R oštećenja bubrega

U I/R oštećenju dužina i ozbiljnost primarne ishemije određuje krajnji intenzitet imunskog odgovora a samim tim i stepen oštećenja tkiva. Kada je period ishemije kratak, onda se putem dejstva hipoksije i SKR indukuje samo manji stepen NF- κ B aktivnosti koji podstiče sintezu citoprotektivnih komponenti. Ovaj fenomen predstavlja osnovu pristupa u pokušaju prevencije razvoja I/R oštećenja brojnih organa u kojem se putem nekoliko kratkih faza ishemije od 5 do 10 min „priprema“ tkivo za duži period ishemije koji naknadno sledi, te se ceo proces naziva ishemijsko prekonicioniranje (66,

67). Međutim, kada je period ishemije znatno produžen, masivno oslobađanje komponenti iz nekrotičnih ćelija kao što su protein toplotnog šoka 70 („*heat shock protein*“ – HSP70) i proinflamatorni citokini (TNF α i IL-1), rezultira u infiltraciji i aktivaciji neutrofila i makrofaga (68, 69). Važnu ulogu u ovom procesu igra aktivacija preko receptora sličnih toll-u („*toll-like receptors*“ – TLR) 2, 4, 5. TLR predstavljaju evoluciono konzerviranu familiju transmembranskih receptora čija se aktivacija ostvaruje putem vezivanja liganda nastalih nakon oštećenja sopstvenog tkiva kao što su hijaluronska kiselina, fibronektin, HSP i DNK (70). TLR se ne nalaze samo na ćelijama koje učestvuju u urođenom imunskom odgovoru kao što su makrofagi, već se nalaze i na tubularnim epitelnim ćelijama (71). Transdukcija signala nakon aktivacije TLR je zavisna od nekoliko adaptornih proteina među kojima je najvažniji MyD88, a rezultira aktivacijom NF- κ B i produkcijom proinflamatornih citokina kao što su IL-1, CCL2, makrofagni inflamatorni protein-2 („*macrophage inflammatory protein-2*“ – MIP-2), hemokin kojeg proizvode keratinociti (KC) i interleukin 6 (IL-6) (71, 72, 73). TLR-2 i TLR-4 su konstitutivno eksprimirani na tubularnim epitelnim ćelijama u bubrezima i njihova ekspresija se pojačava u toku I/R oštećenja (71, 72). Normalno, tubularne epitelne ćelije eksprimiraju inhibitor komplementa nazvan Crry na bazolateralnoj membrani. U toku I/R oštećenja dolazi do redistribucije Crry što omogućava depoziciju C3 komponente komplementa i aktivaciju komplementa alternativnim putem (74). Kao posledica ovih događaja tubularne epitelne ćelije proizvode navedene proinflamatorne citokine i započinju inflamatornu reakciju što dovodi do privlačenja neutrofila i makrofaga u tkivo bubrega.

Makrofagi infiltriraju bubreg odmah nakon neutrofila. Infiltracija je posredovana signalnim putevima preko receptora tip 1 i tip 2 za hemokine sa CC motivom (CCR1 i CCR2) i CX3CR1 (75, 76). Protočnom citofluorimetrijom je dokazano da su ovi makrofagi značajan izvor sekretovanih proinflamatornih citokina kao što su IL-1 α , IL-6, TNF- α , interleukin-12 (IL-12) i da poseduju izraženu fagocitnu aktivnost (76, 77). Deplecija bubrežnih i slezinskih makrofaga putem lipozomalnog klodronata pre izazivanja I/R oštećenja sprečava akutno oštećenje bubrega (78). Značajnu stimulaciju makrofagi dobijaju od interferona-gama (IFN- γ) kojeg sekretuju neutrofili i takozvane invarijantne T-ćelije prirodne ubice („*invariant natural killer T*

cells“- iNKT), koje se smatraju pored dendritskih ćelija najznačajnijom vezom između urođene i stečene imunosti (79) (Slika 3).



Sl. 3. Šematski prikaz patogeneze inflamacije u I/R oštećenju (modifikovano iz reference br 77)

iNKT-ćelije su jedinstvena populacija T-limfocita sa ćelijskim receptorima koji su karakteristični kako za T ćelije tako i za ćelije prirodne ubice („natural killer cells“ – NK) (79). Na njima se može naći T ćelijski receptor („T cell receptor“ – TCR) zajedno sa NK ćelijskim markerom NK1.1. TCR ne prepoznaje peptide u sklopu MHC I ili II klase, već prepoznaje glikolipide koji su prezentovani u sklopu CD1d, molekula sličnih molekulima MHC I klase. Jedan do dva sata nakon prepoznavanja iNKT-ćelije proizvode značajnu količinu citokina Th1 tipa (IFN- γ , TNF- α) kao i Th2 tipa (IL-4, IL-13). Infiltracija ovih ćelija u bubrezima počinje već nakon 30 min od I/R oštećenja, a maksimum infiltracije i produkcije IFN- γ se ostvaruje već 3 h nakon I/R oštećenja (80). Svojim dejstvom ove ćelije ne samo što regulišu funkciju dendritskih ćelija već mogu i amplifikovati njihovo dejstvo a posredno i funkciju T-ćelija, regulatornih T-ćelija (Treg-

ćelije), B-ćelija i NK-ćelija povezujući urođenu i stečenu imunost. U prilog važne uloge iNKT-ćelija govore i rezultati da blokada iNKT-ćelija upotrebom anti-CD-1d antitela ili anti-NK1.1 antitela sprečava nastanak akutnog oštećenja bubrega nakon izazivanja I/R oštećenja (80).

Osim iNKT-ćelija i dendritske ćelije se javljaju kao jedna od važnih spona između urođene i stečene imunosti. U normalnim uslovima u bubrezima se mogu naći CD11c⁺ MHCII⁺ dendritske ćelije (76, 81). Njihov broj se povećava u I/R oštećenju transplantiranog bubrega što je pokazano kako na pacovskom eksperimentalnom modelu (82), tako i u humanoj populaciji, ukazujući na njihovu ulogu u odloženoj funkciji i akutnom odbacivanju grafta (83). Nakon stimulacije, dendritske ćelije povećavaju ekspresiju MHC molekula II klase i kostimulatornih molekula dok istovremeno smanjuju svoju fagocitnu aktivnost. Prezentacijom antigena T-ćelijama kao profesionalne antigen prezentujuće ćelije one učestvuju u aktivaciji T-ćelija posredujući u razvoju stečene imunosti. Dokazana je migracija dendritskih ćelija iz bubrega u lokalne limfne čvorove u toku I/R oštećenja gde indukuju proliferaciju T ćelija u antigen specifičnom odgovoru (84). Interreakcijom sa iNKT-ćelijama putem CD40-CD40L i prezentacijom glikolipida preko CD1d molekula aktiviraju iNKT-ćelije, a produkcijom proinflamatornih citokina kao što su TNF- α , IL-6, CCL2, CCL5, IL-12, interleukin-23 (IL-23), amplifikuju već započeti imunski odgovora (80, 85).

Brojne studije pokazuju značaj T-ćelija u I/R oštećenju. Atimični „*nu/nu*“ miševi kojima nedostaju CD4⁺ i CD8⁺ T-ćelije rezistentni su na I/R oštećenje bubrega, ali se oštećenje izaziva ukoliko se prethodno izvrši transfer CD4⁺ T-ćelija (86). Kinetičke analize su pokazale značajnu infiltraciju CD4⁺ T-limfocita u bubregu već 1 h od izazivanja I/R oštećenja. Značaj kostimulatornog puta CD28-B7-1 za T-ćelijsku adherenciju i aktivaciju, je potvrđen nalazom ekspresije B7-1 na endotelniim ćelijama ascedentnog dela *vasa recta* u humanim bubrezima posle ishemije (87). U patogenezi I/R oštećenja veliki značaj imaju Th1 ćelije koji proizvode IFN- γ (88). Citofluorimetrijska analiza infiltrišućih limfocita u ishemijskom bubregu detektuje 24 h nakon I/R oštećenja povećan broj T-limfocita koji sekretuju IFN- γ i TNF- α (89). Kada se „*nu/nu*“ miševima i miševima kojima nedostaje gen koji kodira enzim koji učestvuje u rekombinaciji gena za T-ćelijski receptor i imunoglobuline („*recombinasa activating*

gene“-RAG1) izvrši transfer CD4⁺-T-ćelija koje su deficitarne u ekspresiji CD28 ili sekreciji IFN- γ , ne dolazi do I/R oštećenja bubrega (86). Za razliku od Th1 ćelija, Th2 ćelije su se pokazale kao protektivne u I/R oštećenju bubrega. Nedavna istraživanja su pokazala da su miševima koji nemaju IL-4 izazvana značajno intenzivnija I/R oštećenja u odnosu na divlje sojeve, što ukazuje na protektivnu ulogu Th2 ćelija (90). Protektivnu ulogu u I/R oštećenju bubrega su pokazale i Treg-ćelije koje se karakterišu CD25 markerom na ćelijskoj membrani i transkripcionim faktorom koji pripada FOX familiji proteina i ima karakteristični račvasti oblik domena kojim se vezuje za DNK („*forkhead box P3*“ -FoxP3). Treg-ćelije proizvode antiinflamatorne citokine ako što su interleukina 10 (IL-10) i faktora transformacije rasta-beta („*transforming growth factor- β* “ -TGF- β). Jedna studija je pokazala da deplecija CD4⁺CD25⁺ regulatornih T-ćelija putem anti-CD25 antitela ima malo uticaja na ranu fazu I/R oštećenja, ali dovodi do većeg stepena nekroze 3 dana nakon I/R oštećenja (91). Navedeni podaci ukazuju na složenu ulogu T-ćelija u različitim fazama I/R oštećenja, naročito ako se uzme u obzir da se T-ćelije mogu aktivirati i u odsustvu antigena putem dejstva SKR, IFN- γ , interleukin-2 (IL-2), CCL5 (88). Iznete činjenice ukazuju na kompleksnu vezu između urođene i stečene imunosti u patogenezi I/R oštećenja ukazujući na značajnu ulogu inflamacije i razvoja antiinflamatornih strategija u prevenciji i lečenju I/R oštećenja.

1.3. Uticaj imunosupresivne terapije na I/R oštećenje bubrega

S obzirom da je inflamacija bitan faktor u patogenezi I/R oštećenja, to se jasno uviđa i mogući značaj antiinflamatornog efekta imunosupresivne terapije u transplantaciji bubrega. Broj pacijenata kojima je potrebna transplantacija bubrega je godinama sve veći, što je uslovalo razvoj transplantacije bubrega sa kadavera. Po svojoj definiciji proces skidanja bubrega sa kadavera i kasnija transplantacija podrazumeva da su ti bubrezi podvrgnuti različitim periodima hladne i tople ishemije. I/R oštećenje koje nastaje u manjem ili većem stepenu kod svih pacijenata podvrgnutih transplantaciji bubrega sa kadavera nije samo povezano sa odloženom funkcijom grafta već predstavlja i najvažniji antigen-nezavisni faktor u kasnijem razvoju hronične alograft nefropatije (92). Ovde je važno napomenuti da je I/R oštećenje samo po sebi dodatni faktor u

pojačanju imunogeničnosti tkiva što povećava rizik za akutno odbacivanje koje je takođe faktor u razvoju hronične alograft nefropatije (93).

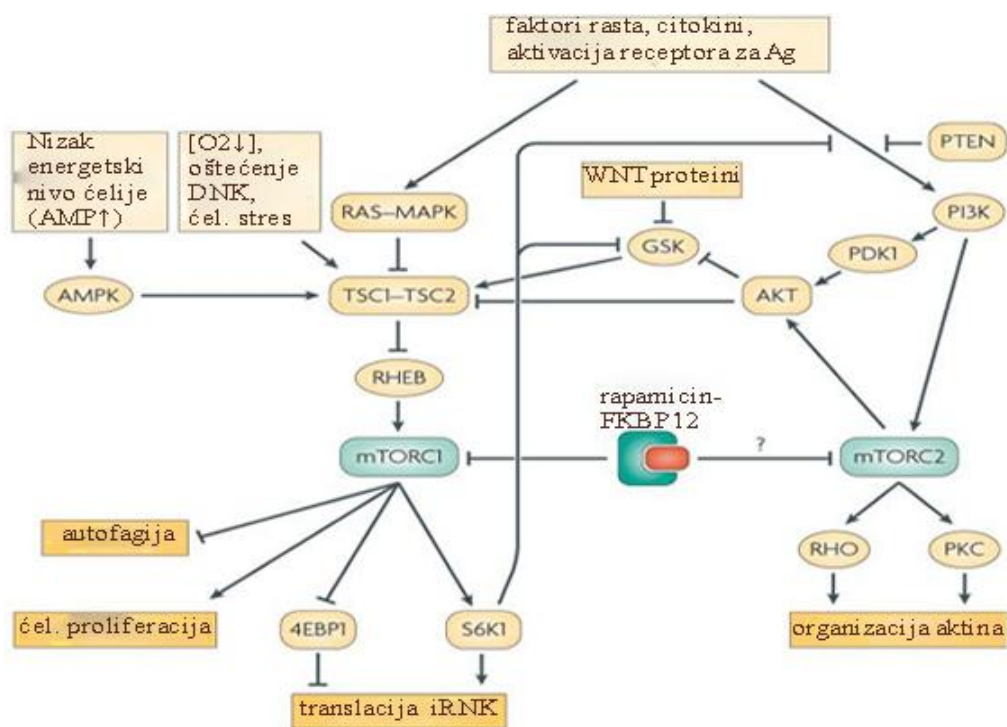
Efekat različitih imunosupresiva na tok I/R oštećenja u transplantaciji bubrega varira. Ciklosporin usporava oporavak funkcije grafta u ranom postransplantacionom periodu verovatno svojim vazokonstriktornim efektom (94, 95). Za mikofenolat mofetil je pokazano u animalnom modelu da ublažava promene nastale u toku I/R oštećenja (96). U cilju izbegavanja neželjenih štetnih efekata terapije ciklosporinom, proteklih godina su se razvile nove imunosupresivne strategije uvođenjem mTOR inhibitora, pre svega rapamicina i u nešto manjoj meri everolimusa. Rapamicin, makrociklični laktonski antibiotik sa antifungalnim dejstvom, suprimira prenos signala od receptora za IL-2 blokirajući mTOR signalni put (97). Klinički podaci naglašavaju njegovu ulogu u sprečavanju odbacivanja bubrega, očuvanju funkcije bubrega tj. grafta kod hronične nefrotoksičnosti indukovane ciklosporine i sprečavanju rasta tumora (98, 99). Nekoliko kliničkih studija je pokazalo i neželjene efekte rapamicina u usporavanju uspostavljanja funkcije grafta kod odložene funkcije grafta nakon transplantacije bubrega sa kadavera, ali je jednogodišnje preživljavanje grafta bilo isto kao i kod pacijenata koji su bili lečeni drugim imunosupresivima (100, 101). U pacovskom modelu I/R oštećenja pokazano je da je tretman rapamicinom odložio oporavak bubrežne funkcije pre svega usporavajući regeneraciju tubularnih epitelnih ćelija i povećavajući apoptozu, ali je oporavak bubrežne funkcije ipak postignut (102).

1.4. Aktivacija i uloga mTOR receptora u fiziologiji ćelije

Put mTOR receptora može se aktivirati različitim stimulusima: ovaj put registruje nivo energije u ćeliji konstantnim nadzorom odnosa ATP i adenzin monofosfata (AMP) u ćeliji, preko njega svoje dejstvo ostvaruju insulin, amino kiseline, faktori rasta, pa čak i signali koji stižu putem aktivacije TLR.

mTOR je serin, treonin-protein-kinaza i može se naći u dva kompleksa: mTOR kompleks 1 (mTORC1) i mTOR kompleks 2 (mTORC2) (103). mTORC1 direktno kontroliše sintezu proteina i sastoji se od mTOR, regulatornog proteina udruženim sa mTOR-om („*regulatory-associated protein of mTOR*“ – Raptora) i podjedinice nazvane

LST8 (104) (Slika 4). Njega mogu inhibirati rapamicin i everolimus koji vezivanjem za imunofilinski protein koji vezuje takrolimus koji je ranije nazivan FK506 („FK506 binding protein“ – FKBP12), grade kompleks koji se potom vezuje za kinazno mesto na mTOR molekulu zvano FRB domen čime inhibiraju funkciju mTOR. mTORC2 se sastoji od mTOR, LST8, proteina pridruženog mTOR-u koji je nesenzitivan na dejstvo rapamicina („Rapamycin-insensitive companion of mTOR“ – Rictor) i proteina koji interreaguje sa protein-kinazama koje su aktivirane stresom („stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1“ – SIN1) (103).



Slika 4. Aktivacija mTOR receptora (modifikovano iz reference br. 116)

Fosfotransferazna aktivnost mTORC1 stimulisana je malim G proteinom koji je homologan Ras-u i značajno je zastupljen u mozgu („Ras homolog enriched in brain“ – RHEB), za koji je vezan guanozin trifosfat (GTP) (105). Regulisan je heterodimernim tumor supresorom koji se sastoji od tuberozne skleroze 1 (TSC1) i tuberozne skleroze 2 (TSC2) (105). TSC2 ostvaruje svoj supresorni efekat na m-TOR prevodeći RHEB u inaktivni oblik vezan za guanozin difosfat (GDP). Glavni cilj delovanja mTORC1 su

komponente translacione mašinerije čijom se aktivacijom započinje translacija proteina a to su 40S ribozomalni protein S6 kinaza (S6K1) i protein koji vezuje eukariotski translacioni inicijacioni faktor 1 („*Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*“ – 4E-BPs) (106). Jasno je dakle da mTOR igra jednu od centralnih uloga u ćelijskom rastu. Faktori rasta delujući na tirozin kinazne receptore i receptore kuplovane sa G-proteinom aktiviraju nekoliko signalnih puteva među kojima su najznačajniji put aktivacije fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K) i serin-treonin specifične kinaze zvane Akt, kao i put preko aktivacije kinaza regulisanih ekstracelularnim signalom („*Extracellular signal-regulated kinases*“ – ERK) koje interreaguju sa proteinom koji pripada familiji proteina, takozvanim „malim GTP-azama“ i zove se Ras. Oba navedena puta stimulišu mTORC1 prethodno inhibirajući TSC1-TSC2 kompleks koji je negativni regulator mTORC1 (106). Akt fosforiliše TSC2 na pozicijama Ser 939 i Ser 981, a moguća je i fosforilacija putem aktivnosti S6K1 (107). PI3K-Akt put je aktiviran insulinom i najnovija istraživanja pokazuju da je receptorski supstrat za insulin 1 („*insulin receptor substrate 1*“ – IRS1) fosforilisan dejstvom S6K1 čime se ostvaruje negativna povratna veza (108). Mitogenom aktivirani Ras-ERK put takođe fosforiliše TSC2 i time dezinhbibira mTORC1, ali je moguća i direktna fosforilacija Raptora pri čemu se podstiče kinazna aktivnost mTORC1 (109). TNF- α u svojim signalnim putevima takođe može aktivirati mTORC1 aktivirajući IKK β koja fosforiliše TSC1 na pozicijama Ser487 i Ser511, ili TNF- α direktno aktivira Akt koji onda indukuje IKK α da se asocira sa mTORC1 u Akt i time aktivira mTORC1 (110, 111). Pokazano je takođe da ova mTOR- $\text{IKK}\alpha$ interreakcija koja je regulisana dejstvom Akt-a stimuliše NF- κ B aktivnost, ali je važno napomenuti da je dokaz izveden na ćelijskim linijama kancera prostate koje se karakterišu konstitutivnom ekspresijom Akt molekula (111). mTORC1 predstavlja mesto gde se odlučuje da li će ćelija ući u deobu i pokrenuti neophodnu sintezu proteina, predstavljajući stecište brojnih puteva koji prenose informacije od senzora kako spoljašnje okoline tako i unutrašnjih događanja u ćeliji. Ukoliko nema dovoljno nutrijenata i energije u ćeliji, neće se započeti sinteza proteina. Protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom („AMP-activated protein kinase“ – AMPK) je senzor nivoa energije u ćeliji i kada je nivo energije niži ona fosforiliše Raptor, što rezultuje u inhibiciji aktivnosti mTORC1 (112). Putem dejstva HIF-1 α u hipoksičnim uslovima preko proteina koji nastaje u odgovoru ćelije na stres kao što su hipoksija i oštećenje

DNK („*regulated in development and DNA damage responses 1*“ – REDD1), omogućena je inhibitorna funkcija TSC2 na mTORC1 (113).

1.5. Dejstvo mTOR inhibitora u ćelijama imunskog sistema

mTOR inhibitori inhibiraju fagocitozu, ometaju preuzimanje antigena u dendritskim ćelijama i smanjuju ekspresiju MHC molekula II klase (114, 115). Oni kočće sazrevanje dendritskih ćelija i njihovu sposobnost da stimulišu nastanak efektorskih T-ćelija (116). U ćelijama mijeloidne fagocitne loze mTOR inhibitori aktiviraju NF- κ B i tako povećavaju sintezu IL-12 i IL-23, dok inhibicijom transduktora signala i aktivatora transkripcije („*Signal transducer and activator of transcription 3*“ – STAT3) smanjuju sintezu IL-10 a inhibicijom faktora 5 i 7 koji regulišu interferon („*interferon regulatory factor*“ – IRF-5 i 7) smanjuju produkciju interferona tip I (117, 118, 119). U T-ćelijama aktivacija mTOR receptora povećava aktivnost NF- κ B. mTOR inhibitori zaustavljaju progresiju u ćelijskom ciklusu T-limfocita nakon aktivacije receptora za IL-2 (120), blokiraju proliferaciju T efektorskih ćelija i proliferaciju ćelija u pravcu razvoja Th1/Th17 profila usled smanjenja produkcije IFN- γ nakon aktivacije receptora za IL-12 na površini T-ćelija (121, 122).

Postoji znatan broj dokaza da mTOR inhibitori stimulišu razvoj Treg-ćelija (123, 124). Treg-ćelije imaju sposobnost da suprimiraju proliferaciju efektorskih T ćelija (124). Kod pacijenata tretiranih rapamicinom u dužem periodu, nađen je veći procenat Treg-ćelija u odnosu na ukupan broj T-limfocita (125). Njihova regulatorna funkcija se manifestuje povećanom sekrecijom IL-10 i TGF- β i smanjenom aktivnošću kako ćelija Th1 tako i ćelija Th2 profila što u osnovi stvara uslove za toleranciju tj. nereagovanje na antigen (126). Pokazano je da rapamycin indukuje produkciju TGF- β i time podstiče „*de novo*“ konverziju alloantigen-specifičnih CD4⁺ T-ćelija u Treg-ćelije (112). Ovaj proces u T-ćelijama se odvija povećanjem sekundarnog glasnika koji pripada familiji proteina koji modulira dejstvo TGF- β i homologan je proteinu nađenom u Drozofili („*Mothers against decapentaplegic homolog 3*“ – SMAD3). SMAD3 uz nuklearni faktor aktiviranih T-ćelija („*nuclear factor of activated T-cells*“ – NFAT) nastalim nakon aktivacije TCR i receptora za IL-2, dovodi do povećane transkripcije FoxP3.

Dakle, inhibicija mTOR receptora u T-ćelijama inhibira razvoj specifičnog imuniteta blokirajući proliferaciju T-ćelija, suprimirajući razvoj Th1 odgovora i pospešujući nastanak Treg-ćelija koje imaju ključnu ulogu u nastanku imunološke tolerancije. Uzevši u obzir dejstvo mTOR inhibitora na funkciju makrofaga, krajnji rezultat ovakvog dejstva mTOR inhibitora je stimulacija urođene i blokada stečene imunosti.

1.6. Primena everolimusa

Nakon uvođenja u praksu rapamicina sintetisana su još tri mTOR inhibitora: temsirolimus, deforolimus i everolimus (127). Everolimus ($C_{53}H_{83}NO_{14}$, molekularna masa-958,2) predstavlja semisintetički makrolidni derivat nastao uvođenjem 2-hidroksietil grupe na poziciju 40 molekulske strukture sirolimusa. Time je postignuta veća solubilnost everolimusa u organskim rastvaračima.

Everolimus je hidroksietil-etar derivat rapamicina koji ostvaruje isto dejstvo kao i rapamicin, uz naglašen antiproliferativni efekat (128). Lek je postao dostupan na evropskom tržištu od 2010. godine od kada je njegova upotreba odobrena za sprečavanje odbacivanja organa nakon transplantacije bubrega, što je prethodno potvrđeno u velikim kliničkim studijama (129, 130). Ukoliko se izuzmu neki neželjeni efekti everolimusa kao što su usporeno zarastanje rana, hiperlipidemija i porast proteinurije, u pravilno selektovanih pacijenata sa transplantiranim bubregom everolimus se sve više koristi u protokolima imunosupresivne terapije. Rana eliminacija kalcineurinskih inhibitora uvođenjem imunosupresivnih protokola baziranih na everolimusu poboljšala je funkciju transplantiranog bubrega 12 meseci nakon transplantacije, ali je bila praćena većim brojem epizoda odbacivanja grafta dokazanih biopsijom grafta u grupi pacijenata lečenih everolomusom (131, 132). Oralni everolimus je takođe vrlo uspešan u sprečavanju nastanka vaskulopatije grafta i u ograničavanju nastanka plaka u intimi koronarnih arterija kod pacijenata sa transplantiranim srcem (129, 133). Pokazano je da everolimus osim svog antiproliferativnog dejstva na tumorske ćelije ima i inhibitorski efekat na angiogenezu tako što inhibira ekspresiju HIF-1 α (134). Uzimajući u obzir navedena antitumorska

dejstva everolimusa i pokazanu sigurnost i efikasnost everolimusa u lečenju pacijenata sa uznapredovalim karcinomom bubrega („*renal cell carcinoma*“) kod kojih je bilo neuspešno lečenje sunitinibom i sorafenibom, Uprava za hranu i lekove („*Food and drug administration*“ – FDA) u Sjedinjenim američkim državama (SAD) je 2009. godine odobrila everolimus u lečenju uznapredovalog tj. metastatskog karcinoma bubrega kod pacijenata kod kojih je bilo neuspešno lečenje sunitinibom i sorafenibom (135, 136).

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da postoje određene interreakcije mTOR i NF- κ B, ali je nedovoljno jasno međusobno dejstvo ovih puteva u patogenezi I/R oštećenja odnosno u kojoj meri mTOR inhibicija inhibira početno citoprotektivno dejstvo NF- κ B ili eventualno pojačava njegovo proapoptotsko i proinflamatorno dejstvo. Naročito je nerazjašnjen uticaj modifikacije inflamacije na oporavak bubrežne funkcije nakon I/R oštećenja.

2. CILJEVI RADA

Polazeći od pretpostavke da postoji veza između aktivacije m-TOR receptora i aktivnosti NF- κ B i imajući u vidu ulogu NF- κ B u razvoju inflamacije i značaj inflamacije u patogenezi I/R oštećenja, ovo istraživanje ima za cilj da utvrdi:

- Da li imunosupresivno dejstvo mTOR inhibitora everolimusa utiče na razvoj inflamacije u bubrezima nakon I/R oštećenja i u kojem stepenu se taj uticaj ostvaruje putem promena u aktivnosti NF κ B?
- Da li imunomodulatorno dejstvo mTOR inhibitora everolimusa utiče na tok i ishod I/R oštećenja bubrega?

3. MATERIJAL I METODE

Ovo istraživanje je sprovedeno u laboratoriji Istraživačkog centra Univerzitetske klinike Eppendorf u Hamburgu, odsek nefrologija, pod rukovodstvom Prof. dr Friedrich Thaiss-a i laboratoriji Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom Prof. dr Milica Bajčetić u periodu od septembra 2009. do aprila 2011. godine.

3.1. Eksperimentalne životinje

Za ovo istraživanje korišćeni su miševi soja C57 BL/6N uzgojenih na farmi Charles River, Sulzberg, Nemačka. Eksperimentom su obuhvaćeni miševi muškog pola, starosti od 8 do 12 nedelja, težine od 22 do 28g. Životinje su čuvane u sterilnim kavezima u grupama od po 5 u dvanaestčasovnom dnevno-noćnom režimu, sa slobodnim pristupom hrani i vodi i adaptacionim periodom od 5 dana do početka eksperimenta, na prosečnoj ambijentalnoj temperaturi od $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Eksperimenti su sprovedeni u skladu sa etičkim principima i smernicama za brigu o životinjama odobrenim od Veterinarske agencije i komiteta za brigu o životinjama SR Nemačke i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.2. Lekovi

U eksperimentima je korišćen everolimus (RAD, 2% mikroemulzija, Novartis). Neposredno pre korišćenja rastvaran je u 5%-nom rastvoru glukoze i kao takav aplikovan eksperimentalnim životinjama jednom dnevno subkutano (*s.c.*) u dozi od 0,25 mg/kg telesne težine. Prva doza je davana 24 h pre izazivanja I/R oštećenja bubrega, druga doza 30 min do sat vremena pre izazivanja I/R oštećenja. Svaka sledeća doza je aplikovana jednom dnevno do dana kada je bilo predviđeno žrtvovanje životinja. Životinjama koje su žrtvovane prvog, drugog, trećeg i sedmog dana nakon indukcije I/R oštećenja na dan žrtvovanja nije davan lek. Raspored davanja everolimusa je sproveden

prema sličnom eksperimentalnom dizajnu I/R oštećenja na miševima pod tretamanom rapamicinom publikovanom u radu Lui i saradnika (137). Netretiranim životinjama davan je samo 5% rastvor glukoze .

3.3. Izazivanje I/R oštećenja

I/R oštećenje je izazivano postavljanjem atraumatskih klema na vaskularne peteljke oba bubrega miševa u uslovima opšte anestezije. Miševi su uvođeni u opštu anesteziju intraperitonealnim (i.p.) ubrizgavanjem 1 ml smeše koja se sastoji od ketamin hidrohlorida (Ketanest® S, Pfizer) u dozi 100 mg/kg i ksilazin hidrohlorid (Rompun®, Bayer) u dozi 8 mg/kg. Miševi su postavljeni na grejnu ploču. Operativni rez je učinjen po središnjoj liniji abdomena. Nakon pažljive preparacije organa abdomena u cilju pristupa organima retroperitoneuma, odvojene su obostrano, uz pažljivu preparaciju, vaskularne peteljke bubrega i na njih su postavljene atraumatske kleme, istovremeno i na arteriju i na venu. Visceralni sadržaj abdomena je vraćen na svoje mesto i abdomen je prekriven gazom. Od momenta stavljanja vaskularnih klema, mereno je vreme ishemije koje je iznosilo tačno 45 min. U tom periodu je ubrizgavan fiziološki rastvor i.p. u cilju sprečavanja dehidracije životinja. Nakon perioda ishemije od 45 min skidane su kleme. Sutura abdomena je učinjena po uočavanju makroskopskog fenomena reperfuzije. Životinje su po buđenju iz anestezije nadgledane i držane na toploj podlozi u kavezima još 2 h.

3.4. Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalne životinje su podeljene u dve osnovne grupe:

- grupa netretiranih životinja: životinje (n=63) podvrgnute I/R oštećenju bubrega
- grupa životinja tretiranih everolimusom: životinje (n=63) podvrgnute I/R oštećenju bubrega i tretirane everolimusom

Životinje obe eksperimentalne grupe bile su razvrstane po principu slučajnosti u 9 podgrupa od po 7 životinja koje su žrtvovane nakon 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, jednog dana, dva dana, tri dana i sedam dana od trenutka započinjanja reperfuzije. Od svih žrtvovanih životinja uzorkovano je po 500 μ l krvi iz koje su određivani urea i kreatinin.

Potom su hiruškim zahvatom odstranjeni bubrezi. Iz 2/3 tkiva jednog bubrega urađena je izolacija nuklearnih i citoplazmatskih proteina, Ostatak bubrežnog tkiva bio je zamrznut u tečnom azotu a zatim smešten u zamrzivač na -85°C . Iz njega je kasnije održivana aktivnost enzima antioksidantne zaštite. Iz jedne polovine drugog bubrega urađena je izolacija RNK, a preostala polovina drugog bubrega poslužila je za histološku analizu I/R oštećenja primenom tehnike „*Periodic acid Schiff*“ (PAS) bojenja za optičku mikroskopiju i imunohistohemijskog bojenja. Kao kontrola služile su lažno operisane životinje („*Sham*“- operisane životinje) koje su bile podvrgavane anesteziji i operativnoj proceduri, ali bez stavljanja klema na vaskularnu peteljku bubrega, kao i potpuno zdrave životinje (intaktna kontrola), koje uopšte nisu bile podvrgavane operativnoj proceduri. „*Sham*“- operisane životinje su bile podeljene na grupu koja nije primala everolimus i grupu koja je primala everolimus.

3.5. Određivanje uree i kreatinina u serumu

Serumski kreatinin i urea određivani su spektrofotometrijski (Helios β , Termo Spectronic). Vrednosti uree i kreatinina su izražavane u mg/dl.

3.6. Određivanje everolimusa u krvi

Koncentracija everolimusa u krvi određivana je putem metode tečne hromatografije jedan dan, tri dana i sedam dana nakon početka aplikacije leka i izražavana je u ng/ml.

3.7. Izolacija proteina iz tkiva bubrega

Proizvođač svih supstanci upotrebljenih u ovoj metodi je Sigma. Rastvori potrebni za ovu metodu su:

1. Hipotoni pufer A	2. Hipertoni pufer B	3. 10%NP40
- 10 mM HEPES pH 7,9	- 20 mM HEPES pH 7,9	
- 10 mM KCl	- 400 mM NaCl	
- 0,1 mM EDTA pH 8	- 1 mM EDTA	
- 0,1 mM EGTA pH 8	- 1mM EGTA	

Pre upotrebe u puferu A i B je dodat sveže pripremljen ditioneitol (DTT) tako da finalna koncentracija DTT u rastvorima bude 1 mM i miks inhibitora proteaze u razblaženju 1:100. U rastvore pufera A i pufera B se zatim dodaje natrijum vanadat tako da finalna koncentracija natrijum vanadata bude 100 mM. Rastvori pufera A i pufera B se zatim dobro vorteksiraju nakon čega se upotrebljavaju u daljoj proceduri. Tkivo bubrega je nakon dodatka 1 ml hipotoničnog pufera A homogenizovano u staklenom tubusu snažnim, gnječećim pokretima uz pomoć staklenog tučka. Homogenizovan sadržaj je prenesen u Eppendorf epruvetu i inkubiran 15 min na ledu. Zatim je dodato 100 µl 10%-nog NP40 i sadržaj je vorteksiran 15-20 min, nakon čega je odmah centrifugiran na 13000 rpm, na temperature od 4°C (t-4°C), u trajanju od 30 min. Dobijeni supernatant predstavlja citoplazmatsku frakciju proteina. Talog je resuspendovan u 200 µl hipertoničnog pufera B, vorteksiran i inkubiran 15-20 min na rotirajućoj mešalici u hladnoj sobi (t-4° C). Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 5 min na 13000 rpm i t-4° C. Supernatant koji predstavlja rastvor nuklearnih proteina, prenet je u nove Eppendorf epruvete i čuvan za duži period na -80° C.

3.8. Izolacija RNK iz tkiva bubrega upotrebom trizola

U ovoj metodi sve posuđe, Eppendorf epruvete i nastavci za pipette moraju biti sterilni tj. oslobođeni od RNK-aze, što se postiže suvom sterilizacijom na t od 200° C u

trajanju od 2 h. Polovina bubrega je u Petrijevoj šolji upotrebom pincete i skalpela oslobođena kapsule i masnog tkiva i zatim stavljena u epruvetu (Eppendorf) od 1,5 ml. Dodato je 200 μ l Trizola (Gibco) i tkivo je homogenizovano upotrebom plastičnih štapića koji su prethodno oprani u 80%-nom etanolu (Sigma) i osušeni na vazduhu na sobnoj temperaturi. Nakon homogenizacije dodato je još 800 μ l Trizola u svaki uzorak, uzorci su dobro vorteksirani, nakon čega su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. U uzorke je zatim dodato 200 μ l hloroforma (Sigma), nakon čega su vorteksirani intenzivno tokom 15 s, inkubirani 3 min na sobnoj temperaturi a zatim centrifugirani na 10000 rcf i t-4° C u trajanju od 10 min. Supernatant je prebačen u novu epruvetu (Eppendorf), dodato je 500 μ l 2-propanola (Sigma) i epruvete su vorteksirane i zatim inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 15 min na 10000 rcf i t-4° C.

Posle centrifugiranja sledeći koraci su sprovedeni na ledu. Supernatant je odbačen. Talog je ispiran tri puta uz dodatak 500 μ l 80%-nog etanola u vodi kojoj je dodat dietilpirokarbonat (DEPC, Sigma) i dobro vorteksiran. DEPC ima svojstvo da inhibira RNK-azu. Između ispiranja, uzorci su centrifugirani 5 min na 10000 rcf i t-4° C. Nakon poslednjeg centrifugiranja supernatant je odbačen, a epruvete sa talogom koji predstavlja RNK su postavljene u rotirajući „*speed vac*“ koncentrator na t do 4°C u trajanju od 5 min radi dodatnog isušivanja i koncentrovanja materijala. Ukoliko talog nije potpuno bio suv, procedura je ponovljena još jednom u trajanju od 2 min. Talog je zatim rastvaran u 50 μ l vode koja je oslobođena od RNK-aze, i uzorci su za dalje analize čuvani na -80° C.

3.9. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) od ukupne RNK

Za ovu metodu je neophodno da sav materijal koji se upotrebljava (nastavci za pipete i epruvete) bude sterilisan. Pre pristupanja sintezi cDNK izmerena je koncentracija RNK u uzorcima spektrofotometrijskom metodom. U toku merenja uzorci RNK su držani na ledu. Za dalji rad pripremljeni su sledeći rastvori Mastermix I i Mastermix II. Sve supstance potrebne za pravljenje oba rastvora su dobavljene od proizvođača Invitrogen.

1. **Mastermix I** (date su mere po jednom uzorku):

- 2 μ l prajmera (heksamer) koncentracije 100 ng/ μ l - 2 μ l dNTP (10 mM)

- 16 μ l vode za PCR

Voda za PCR predstavlja visoko prečišćenu vodu koja je testirana na sadržaj eukariotske i prokariotske DNK bez endonukleazne, egzonukleazne i RNK-zne aktivnosti.

2. **Mastermix II** (date su mere po jednom uzorku):

- 8 μ l FS pufera (5 X first strand buffer)

- 4 μ l DTT (100 mM)

- 2 μ l RNase Out (rekombinantni nekompetitivni inhibitor ribonukleaze)

- 2 μ l M-MLV reverzne transkriptaze (rekombinantna DNK polimeraza koja sintetizira komplementarnu DNK od jednolančane RNK i DNK).

Nakon merenja koncentracije RNK uzeto je iz svakog uzorka po 1 μ l i dodato mu je onoliko vode za PCR tako da novodobijeni rastvori uzoraka imaju koncentraciju RNK od 100 ng/ μ l. Od novodobijenih rastvora uzimano je 4 μ l (ukupno 400 ng RNK) u koje je dodavano 20 μ l rastvora mastermix I. Tako pripremljeni uzorci su stavljeni u aparat za umnožavanje („*cycler*“) na 65° C da se inkubiraju 5 min, a zatim je u njih dodavano 16 μ l rastvora mastermix II. Nakon dodavanja rastvora mastermix II uzorci su ponovo inkubirani u „*cycler*“-u po sledećem programu: 50 min na 37° C, zatim 15 min na 37° C i na kraju su uzorci ostavljani na t od 4° C. Ukoliko se metoda kvantitativni PCR („*real-time*“ PCR- rtPCR) nije radila odmah, uzorci su čuvani za kraći period na -20° C ili na -80° C za duži period.

3.10. Kvantitativni PCR

Ova metoda kvantifikacije RNK je zasnovana na upotrebi boje SYBRE Green (Invitrogen) i prajmera za specifičnu informacionu RNK (iRNK), koji dovode do njene

sinteze iz prethodno dobijene DNK od native RNK. Neophodno je voditi računa da sav material, uključujući nastavke za pipetu, epruvete i ploče za PCR mora biti sterilan kao i u sintezi cDNK, uz uslov da se u ovoj metodi koriste specijalni nastavci za pipete koji onemogućavaju aspiraciju DNK iz drugih izvora s obzirom na mogućnost kontaminacije analiziranog materijala. Pre započinjanja metode pripremljen je rastvor (Realtime Mastermix). Mere su date za jedan uzorak. Svaki uzorak je rađen u duplikatu. Negativna kontrola nije sadržavala uzorak DNK.

Rastvor (Realtime Mastermix):

-6,25 µl SYBRE Green mix

-1,25 µl „sense“ prajmera (0,9 µM)

-1,25 µl „antisense“ prajmera (0,9 µM)

-2,25 µl vode za PCR

Od svakog uzorka uzimano je dva puta po 1,5 µl DNK i stavljano u udubljenje na PCR ploči (ukupno dva udubljenja po uzorku uz utrošak 3 µl rastvora DNK uzorka). Istovremeno je za svaki uzorak rađen i rtPCR za 18S rRNK, takođe u duplikatu, s tim što je prethodno DNK uzorka razblažena vodom za PCR u odnosu 1:500 i od tog rastvora je uzimano dva puta po 1,5 µl i stavljano u udubljenja na ploči za rtPCR. U svako udubljenje je zatim dodavano po 11 µl rastvora (Realtime Mastermix) za određenu informacionu RNK čiju smo kvantifikaciju želeli da odredimo. Za pripremanje Realtime Mastermix za svaki od ispitivanih informacionih RNK za citokine, upotrebljavani su sledeći prajmeri: CCL2 („sense“: 3'-ggctcagcccagatgcagttaa-5'; „antisense“: 3'-cctactcattgggatcatcttgct-5'), hemokinski ligand 3 sa CC motivom (CCL3) („sense“: 3'-tgaaccagcagcctttgct-5'; „antisense“: 3'-gatctgccggtttctcttagtca-5'), CCL5 („sense“: 3'- gcaagtgtccaatcttgca-5'; „antisense“: 3'-cctctctgggttgacacaca-5'), CXCL10 („sense“: 3'- gccgtcattttctgctcat-5'; „antisense“: 3'-tgcagcggaccgtcctt-5'), TNF-α („sense“: 3'-aaatggcctcctctcatcagt-5'; „antisense“: 3'-gcttgctcactcgaatttgagaag-5'), IL-1β („sense“: 3'-cctccagatgaggacatga-5'; „antisense“: 3'-tcatccatgagtcacagaggat-5'), IL-10 („sense“: 3'-gctgaggactgccttcag-5'; „antisense“: 3'-

aggagtcggtagcagtagttgttc-5'), TGF- β („sense“: 3'- cgaagcggactactatgctaaaagag-5'; „antisense“: 3'-gttttctcatagatggcggtgttg-5'), CXCR3 („sense“:3'-tcacacaatcctgaaccaacgt-5' ; „antisense“:3'-tgaatgggtattgaaacgacgacc-5'), iNOS („sense“: 3'-gctgttctcagcccaacaat-5'; „antisense“: 3'-ttctgtgctgtcccagtgag-5') i 18S prajmeri („sense“: 3'-cacggccggtacagtgaaac5'; „antisense“: 3'-agaggagcgagcgacacaaa-5').

Ploče su zatim prekrivane sterilnom folijom i centrifugirane 30 s na 1000 G, a zatim stavljane u mašinu (AbiPrism NN8650) uz aktiviranje programa u trajanju od 2 h i 30 min. Relativna kvantifikacija genske ekspresije izračunavana je primenom $\Delta\Delta CT$ metode.

3.11. Western blot

Pre izvođenja elektroforeze određivana je koncentracija proteina spektrofotometrijski po modifikovanoj metodi Lowry-ja. Pripremljen je rastvor goveđeg serumskog albumina (Sigma) u koncentracijama 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml i 0,625 mg/ml. U posebna udubljenja na ploči sipano je po 5 μ l standardnih uzoraka i uzoraka čiju proteinsku koncentraciju smo određivali, a zatim je u svako udubljenje dodavano po 25 μ l rastvora LB-A/S (Bio-Rad) i 200 μ l LB-B (Bio-Rad) koji su već fabrički pripremljeni. Ploča sa uzorcima je inkubirana 15 min u mraku a zatim je merena apsorpcija na 550 nm u „ELISA čitaču“, nakon prethodnog određivanja standardizovane krive proteinskih koncentracija.

Za izvođenje Western blot procedure prethodno su pripremljeni rastvori za koje su sve korišćene supstance dobavljene od proizvođača Sigma, osim CDP-Star i NitroBlock-II (Invitrogen). Rastvori potrebni za izviđenje Western blota su:

1. 10XTBS (1 l)

- 80 g NaCl
- 24,2 g Tris
- upotrebiti 25% HCl radi postizanja pH-7,6

2. Transfer pufer (1 l)

- Tris 3g
- Glicin 15g
- Metanol

3. TBS-T (1 l)

- 100 ml 10XTBS
- 1 ml Tween
- dopuniti dejonizovanom vodom do 1 l

4. Blokirajući pufer

- 5% rastvor mleka u prahu u TBS-T

5. Esej pufer (200 ml)

- 1 ml 1 M Tris/HCl pH 9,5
- 4 ml 5 M NaCl
- 10 ml 1 M MgCl₂

6. Rastvor za detekciju

- 0,5 ml CDP-Star
- 25 µl NitroBlock-II

Eksperimentalna procedura

Uzeta je izračunata zapremina uzorka u kojoj se nalazi 50 µg proteina i dodata joj je određena zapremina pufera B ili pufera A u zavisnosti od toga da li je određivan protein iz nuklearne ili citoplazmatske frakcije, tako da ukupna zapremina bude 16 µl. U svaki uzeti uzorak je zatim dodato po 8 µl pufera (NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), Invitrogen) u cilju optimalne pripreme proteinskih uzoraka za elektroforezu koja zahteva denaturaciju proteina i redukciju disulfidnih veza. Ukupna zapremina uzorka bila je 24 µl. Tako spremljeni uzorci su zagrevani 10 min na 95° C u bloku za grejanje. Dok su uzorci zagrevani pripreman je gel za elektroforezu. Komercijalni gel, 10%-ni poliakrilamidni gel (NuPAGE, Novex, Invitrogen), stavljen je u pripremljeno ležište u kadu za elektroforezu u koje je zatim sipano 400 ml pufera za elektroforezu koji je pripremljen od 20 ml koncentrovanog rastvora za elektroforezu koji sadrži 3-(N-morfolin) propansulfonsku kiselinu (MOPS) i natrijum dodecil sulfat (SDS) (NuPAGE MOPS SDS „Running buffer“, Invitrogen) i 380 ml dejonizovane vode.

Uzorci su pojedinačno nanošeni upotrebom specijalnih nastavaka za pipete. U prvu kolonu je nanešeno 4 µl markera koji predstavlja smesu različitih peptida koji na

kraju elektroforeze ostavljaju vizuelnu identifikaciju separacije (AmershamTM RainbowTM Marker, GE Healthcare Life Science). Elektroforeza je sprovedena na 200 V približno 40 min. Nakon završene elektroforeze, pristupilo se „blotovanju“ tj. transferu razdvojenih proteina sa gela na membranu. Pažljivo je izvađen gel iz ležišta i stavljen na tri Whatmanova papira dimenzija 9X9 cm koji su prethodno bili natopljeni u Transfer puferu i zatim stavljeni u aparat za transfer, vodeći računa da nema mehurića vazduha. Na gel je stavljena poliviniliden difluorid-na membrana (Immobilon-P PVDF, Merck Millipore) dimenzija 8X8 cm koja je prethodno aktivirana ispiranjem 10 s u metanolu (Sigma) a zatim 5 min u Transfer puferu. Na kraju je na postavljenu membranu stavljeno još 6 Whatmanovih papira dobro natoplejnih u Transfer puferu. Transfer je obavljen tokom 90 min pri jačini struje od 80 mA.

Nakon transfera, membrane su blokirane 2-3 h u blokirajućem puferu na sobnoj temperaturi. Blokirajući pufer je odliven i dodat je rastvor primarnih antitela u blokirajućem puferu u razblaženjima u zavisnosti od proizvođača antitela: 1:500 (Santa Cruz), 1:1000 (Cell Signaling i Assay Designs) i 1:3000 (Sigma). Membrana u rastvoru primarnog antitela je ostavljena na 4° C preko noći na platformi sa podešenim blagim rotirajućim pokretima. Primarna antitela korišćena u ovom istraživanju su: antitelo za p65 (Cell Signaling), antitelo za fosfo-p65(Ser⁵³⁶) (Cell Signaling), antitelo za IκBα (Cell Signaling), antitelo za fosfo- IκBα(Ser^{32/36}) (Cell Signaling), antitelo za RelB (Santa Cruz), antitelo za hem-oksigenazu 1 (HO-1) (Assay Designs), antitelo za β-aktin (Sigma).

Sledećeg dana rastvor primarnog antitela u blokirajućem puferu je odliven i čuvan na t od -20°C (dozvoljena je njegova primena još četiri puta). Membrana je zatim ispirana na sobnoj t dva puta po 10 min u rastvoru TBS-T. Zatim je dodavano sekundarno antitelo rastvoreno u blokirajućem puferu u koncentraciji od 1:5000. Membrana je u ovom rastvoru inkubira 1 h na sobnoj t, a zatim je rastvor sekundarnog antitela odliven i membrane su ispirane u rastvoru TBS-T tri puta po pola sata. Membrana je zatim ispirana dva puta po 5 min u esej puferu.

Na kraju se pristupilo detekciji tako što je na membranu koja je prethodno stavljena na plastičnu foliju, dodat rastvor za detekciju i zatim je prekrivena plastičnim filmom, vodeći računa da se izbegne stvaranje mehurića između membrane i plastičnog

filma. Izlaganje membrane rastvoru za detekciju je trajalo 5 min. Višak rastvora za detekciju je uklonjen Whatmanovim papirom natopljenim u esej puferu. Membrana je uvijena u providnu plastičnu foliju i izložena rendgen filmu (x-OMAT AR Film; Kodak) od 5 do 7 min, koji je zatim razvijan upotrebom ECL SuperSignal (Pierce) detekcionog sistema. Densitometrijska analiza je vršena upotrebom softverskog programa Adobe Photoshop CS2.

3.12. „*Electrophoretic Mobility Shift Assay*“ (EMSA)

Metoda se zasniva na elektroforezi proteinskog materijala i DNK koji je obeležen radioaktivnim obeleživačem što predstavlja osnov kasnije detekcije. Traženi kompleksi koji se sastoje od proteinske komponente (transkripcionog faktora) vezanog za specifični promoterski region DNK se u toku elektroforeze najsporije kreću.

Oligonukleotidne sekvence za NF- κ B (DNK sekvenca koja predstavlja mesto vezivanja NF- κ B) se moraju pre započinjanja eksperimenta obeležiti radiokativnim fosforom {32-P}- γ dATP. U tom cilju se priprema mastermiks u zapremini od 20 μ l koji se sastoji od: 6 μ l NF- κ B konsenzus oligonukleotida (Promega), 2 μ l 10 X T4-Polinukleotidkinaze pufera (New England BioLabs), 1 μ l T4-Polinukleotidkinaze (New England BioLabs), 8.5 μ l H₂O, 2.5 μ l {32-P}- γ dATP (radioaktivnost rastvora iznosi 0.925 MBq). Pripremljeni rastvor je inkubiran 30 min u vodenom kupatilu na 37° C, a zatim u cilju toplotne inaktivacije enzima inkubiran je 10 min u vodenom kupatilu na 70° C. U rastvor je zatim dodato 30 μ l vode koja se koristi i za kvantitativni PCR. Kolona za centrifugiranje je pripremljena tako što je skinut poklopac i odlomljen vrh, a zatim je centrifugirana 1 min na 3000 rpm. U tako pripremljenu kolonu sipan je mastermiks u količini od 50 μ l i kolona je stavljena u epruvetu od 2 ml i centrifugirana 2 min na 3000 rpm. Kolona je odbačena u za to specijalno pripremljen kontejner za radioaktivni otpad dok je radiokativna tečnost koja je centrifugirana u koloni i sakupljena u epruveti čuvana na 4° C u specijalnoj olovnoj bočici.

Pre izvođenja EMSA procedure neophodno je da se pripremi aparatura od stativa i držača sa strane. Transparentni poliesterski film na kojem će stajati akrilamidni gel (Gelbond^R PAG film, Lonza) je stavljen na veće staklo i zalepljen po donjoj ivici

selotejp trakom. Na tako pripremljeno staklo su sa strane zalepljene silikonskim lepkom trake na čijim je drugim stranama stavljena manja količina silikonskog lepka preko kojeg je stavljeno manje staklo, čime je formirana kapilarna šupljina između zadnje površine manjeg stakla i filma u koju će se sipati gel za elektroforezu. Pripremljena stakla su stavljena u držače i stativ u vertikalni položaj. Pre pravljena gela napravljen je rastvor 10X TBE koji u 5 l sadrži 540 g Tris baze (Sigma), 275 borne kiseline (Sigma) i 200 ml 0,5M EDTA (Sigma). Pripremljena je smeša za poliakrilamidni gel koja se sastoji od 2,21 g glicerola (Sigma), 51,3 ml destilovane vode, 7 ml 10X TBE, 9,33 ml 30% (w/v) Akrilamid-Bis (29:1) (Sigma), 525 µl 10%-nog amonijum persulfata (Sigma) i 58,3 µl TEMED (Bio-Rad) i sipana je u već pripremljeni kapilarni prostor između manjeg stakla i filma postavljenog na većem staklu. Posle 3-4 h koliko je potrebno da se gel stegne i postane suv, pristupilo se elektroforezi.

Dok se gel sušio određivana je koncentracija proteina u uzorcima spektrofotometrijski po Lowry-ju kako je već opisano i iz svakog uzorka je odmereno 30 µg proteina. Tečnost u komori za elektroforezu je prvo ohlađena na 8°C. U komori za elektroforezu je fiksiran gel za elektroforezu i sipano 2 l pufera 1XTBE (200 ml 10XTBE i 1800 ml dejonizovane vode). Prethodno je izmerena radioaktivnost pripremljenog mastermiksa tako što je odmerenih 1 µl pripremljenog mastermiksa sa radioaktivnim obeleživačem stavljeno u „Rotiszint“ bočicu zapremine 3 ml koja je zatim postavljena u kontejner β-brojača. Posle izmerene radiokativnosti odmerenih 30 µg proteina iz svakog uzorka je pomešno sa 2 µl poly(dI-dC) (Affymetrix), 4 µl vezujućeg pufera koji se sastoji od 90 mM HEPES pH-7,9 (Sigma), 1 mM EDTA pH-8 (Sigma), 0,5 mM EGTA pH-8 (Sigma), 200 mM NaCl (Sigma), 1 mM DTT (Sigma), 0,5 mM PMSF (Sigma), 15%-ni glycerol (Sigma), zapreminom mastermiksa koja ima izmerenu radioaktivnost od 100000 cpm, 1 µl „loading“ pufera koji se sastoji od 10mM Tris-HCl pH-7,6 (Sigma), 0,03% plavog bromfenola (Sigma), 0,03% ksilen cianola FF (Sigma), 60% glicerola (Sigma), 60mM EDTA (Sigma). Smeša se dopuni destilovanom vodom do zapremine od 17 µl. Dobijen rastvor predstavlja probu koja je nanošena na gel u jednu kolonu nakon inkubacije na sobnoj temperature u trajanju od 30 min.

U toku inkubacije uzoraka na sobnoj t, urađeno je kondicioniranje tj. aktiviranje gela na 200 V u trajanju od 30 min, nakon čega su nanošeni uzorci a zatim je

sprovedena elektroforeza 30 min na 200 V, a zatim 120 min na 250 V. Nakon završene elektroforeze, gel je sušen preko noći i zatim stavljan na film (Kodak) u olovnu kasetu u kojoj je ekspozicija trajala najmanje sedam dana na -80° C. Posle ekspozicije razvijan je film koristeći ECL SuperSignal (Pierce) detekcioni sistem. Densitometrijska analiza je vršena upotrebom softverskog programa Adobe Photoshop CS2.

3.13. Metoda optičke mikroskopije i imunohistohemijsko bojenje

3.13.1. „Periodic acid-Schiff“ (PAS) protokol bojenja tkiva

PAS metoda se zasniva na detekciji glikogena u tkivu koje je prethodno fiksirano u formalinu i ukalupljeno u parafinu. Glikogen se boji u ljubičasto, a jedra u plavo. Isečci bubrežnog tkiva miševa su fiksirani u 4%-nom rastvoru formalina, a zatim su kalupljeni u parafinu.

Za bojenje su korišćeni parafinski isečci debljine 5 µm.

0.5% PAS rastvor:

PAS (Sigma) ----- 0.5 g

Destilovana voda ----- 100 ml

3.13.2. Imunohistohemijsko bojenje

Posle deparafinizacije u ksilenu i etanolu u različitim koncentracijama, pločice su sa isečcima tkiva inkubirane 20 min na 95°C u citratnom puferu pH 6,0. Pločice su zatim čuvane u 3%-nom vodonik-peroksidu rastvorenom u 70%-nom etanolu 10 min da bi se blokirala endogena peroksidaza. Nakon toga preparati su inkubirani 30 min u rastvoru primarnih pacovskih antimišjih F4/80 antitela u razblaženju od 1:400 (klon A3:1, # AM19001PU-N, Acris Antibodies). Posle inkubacije sa primarnim antitelom učinjena je inkubacija sa sekundarnim antitelom primenom zečjeg antipacovskog IgG (H+L) (# 312-005-045, Dianova) u razblaženju od 1:200. Potom su pločice inkubirane sa polimerom konjugovanim sa peroksidazom koji služi kao detekcioni sistem

(ZytochemPlus HRP Polymer kit, POLHRP-006, Zytomed Systems) 30 min. Vezano antitelo je vizualizovano u braon boji sa DAB supstrat kompletom (DAB057, ZytomedSystems). Inkubaciono vreme je bilo 10 min. Imunoperoksidazno bojenje na CD3 rađeno je u BOND III automatizovanom aparatu za bojenje (Leica Microsystems) upotrebom BOND Polimera Refine detekcionog kompleta (Leica Microsystems). Zečje poliklonsko anti-CD3 antitelo (ab5690, abcam) korišćeno je kao primarno antitelo u razblaženju od 1:100.

Za svaki uzorak bubrega od svake životinje i svako bojenje, četiri mikrofotografije su urađene na uvećanju od 200 puta. Na njima je rađeno prebrojavanje F4/80 i CD3 pozitivnih ćelija i grafički je predstavljan prosečan broj ćelija. Svaka fotografija je bila površine 326589 μm^2 .

3.14. Metode za određivanje aktivnosti enzima antioksidacione zaštite iz tkiva bubrega

Homogenizovanje tkiva bubrega je rađeno po metodi Rossi-ja, DeWaziersa i Albrechta (138, 139). Posle homogenizacije urađena je sonifikacija uzoraka po metodi Takade i saradnika (140). Za određivanje količine glutationa iz sonifikata vršeno je taloženje proteina sulfosalicilnom kiselinom uz centrifugiranje 10 min na 5000 rpm. Preostali sonifikat je centrifugiran 90 min u ultracentrifugi na 37500 rpm na 4°C. Iz izdvojenog supernatanta određivana je koncentracija proteina i enzimska aktivnost SOD, CAT, GPX, GR. Koncentracija proteina u tkivima određivana je po metodi Lowry-ja (141),

3.14.1. Određivanje aktivnosti supeoksid dismutaze (SOD)

Metoda koju smo koristili u našem radu pripada grupi metoda „negativnog“ tipa, jer se prati smanjenje brzine autooksidacije adrenalina u alkalnoj sredini, koja je zavisna od O_2^- . Ovu metodu su postavili Misra i Fridovich, 1972. godine (142). Prisutna SOD uklanja O_2^- i pri tome inhibira reakciju autooksidacije adrenalina. Brzina autooksidacije adrenalina prati se spektrofotometrijski preko promene apsorbance na 480 nm. Porast apsorbance na 480 nm potiče od akumulacije adrenohroma. Brzina autooksidacije adrenalina jednaka je

nagibu linearnog dela porasta apsorbicije. Procenat inhibicije koristi se kao mera katalitičke aktivnosti enzima.

Brzina autooksidacije adrenalina u odsustvu enzima uzima se kao referentna (kontrolna), a brzina autooksidacije u prisustvu SOD, odnosno proteina u citosolu predstavlja deo referentne vrednosti.

Rastvori:

1. Adrenalin (Sigma) 3×10^{-4} M u 0,1 M HCl (Sigma) (rastvor se priprema neposredno pre merenja)
2. Karbonatni pufer, pH-10,2 koji se sastoji od 0,05 M Na_2CO_3 (Sigma) i 1×10^{-4} EDTA (Sigma)

Eksperimentalni postupak:

U 3,2 ml reakcione smeše koju čine: 3ml karbonatnog pufera, pH 10,2 i 0,1 ml rastvora adrenalina, dodavano je 0,01 ml ranije pripremljenog supernatanta. Autooksidacija adrenalina praćena je u toku četiri minuta na 480 nm. Reakcija je stabilna u temperaturnom opsegu od 26-30°C. Uporedo je rađena i kontrolna reakcija. Procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u prisustvu SOD iz uzorka, u odnosu na kontrolnu reakciju autooksidacije adrenalina korišćen je za izračunavanje SOD aktivnosti. Količina SOD izražena je u jedinicama SOD aktivnosti po mg proteina. Jedinica SOD aktivnosti definisana je kao zapremina, odnosno količina proteina koja uzrokuje 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu porasta apsorbicije. Izračunavanje je urađeno po sledećoj jednačini:

$$SOD - 1 = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{V \times L_{aw} \times \Delta K}$$

- ΔK – promena apsorbicije kontrolne reakcije u minuti
- ΔA – promena apsorbicije reakcije sa uzorkom u minuti
- V – zapremina uzorka koji se sipa u reakcionu smešu (ml)
- L_{aw} – količina proteina (mg / ml lizata)
- R – razblaženje

3.14.2. *Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)*

Aktivnost katalaze u sonifikatu određivana je po metodi Beutler-a iz 1982. god (143). Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom paraćenju brzine razgradnje vodonik-peroksida u prisustvu katalaze na 230 nm. Na toj talasnoj dužini vodonik-peroksid apsorbuje svetlost.

Rastvori:

1. Pufer, pH-8,0 koji sadrži 1 M Tris HCl (Sigma) i 5 mM EDTA (Sigma)
2. 10 mM H₂O₂ (Sigma)

Tačna koncentracija vodonik-peroksida određivana je na sledeći način: u odnosu na apsorpciju razblaženog rastvora pufera (1:10), kao nula, očitavana je apsorpcija rastvora sastavljenog od 0,9 ml razblaženog pufera i 0,1 ml razblaženog 30%-nog rastvora H₂O₂ (1:100). Koncentracija vodonik-peroksida izračunavana je na osnovu ekstinkcionog koeficijenta, koji je za H₂O₂ na 230 nm 0,071, po formuli:

$$C = \Delta A / 0,071$$

Dobijena koncentracija je potom razblaživana do 10 mM.

Eksperimentalni postupak:

U kvarcnu kivetu u kojoj se nalazi 50 µl pufera dodavano je između 5 i 50 µl uzorka (zavisno od aktivnosti katalaze). Reakcija počinje dodatkom 1ml 10 mM-nog rastvora vodonik-peroksida. Pad apsorbanace praćen je na 230 nm u toku 3 minuta. Aktivnost je izražavana u jedinica po mg (jed/mg proteina) odnosno jed/g vlažne mase, a jedinica je definisana kao količina redukovano H₂O₂, izražena u µM, u minuti. Izračunavanje je vršeno prema sledećoj jednačini:

$$CAT = (\Delta A \times R) / (0,071 \times Low \times V)$$

* ΔA – promena apsorbanace u minuti

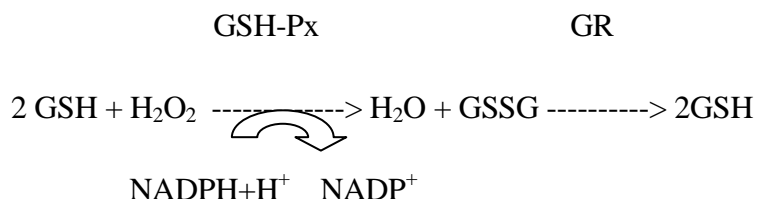
* R – razblaženje

* V – zapremina uzorka (ml)

* Low – količina proteina (mg/ml sonifikata)

3.14.3. Određivanje aktivnosti glutatióń peroksidaze (GSH-Px)

Aktivnost GSH-Px određivana je po metodi Tamure i saradnika iz 1982. god (144). Metoda se zasniva na sledećoj reakciji:



Ovom metodom se prati potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH uz glutation reduktazu (GR) na 340 nm. Ova indirektna metoda koja meri promenu proizvoda reakcije pokazala se veoma reproduktivnom u poređenju sa drugim metodama određivanja GSH-Px aktivnosti.

Rastvori potrebni za ovu proceduru su:

-0,5M fosfatni pufer pH-7,0, 1mM EDTA, 0,2mM NADPH u 1% NaHCO₃, 0,03M t-butilhidroperoksid, 1 mM GSH, GR (TYPE II spec. akt. 105 IU/mg proteina), 1mM NaN₃

Eksperimentalni postupak:

U staklenu kivetu spektrofotometra dodaje se 1.5ml vode, 0,3 ml rastvora GSH (Sigma), 0,6 ml rastvora NADPH (Sigma), 0,1 ml NaN₃ (Sigma), 0,1 ml EDTA (Sigma), 0,3 ml fosfatnog pufera, 0,1 ml t-butilhidroperoksida (Sigma) i oko 0,05 ml uzorka. Reakcija otpočinje dodatkom 105 IU/mg proteina GR (oko 5µl). Reakcija se odvija na temperaturi 37°C. Absorpcija se očitava na 340 nm, a reakcija traje 150 sekundi. Uporedo se radi i kontrolna reakcija. U kiveti kontrolne reakcije nalaze se svi reagensi osim uzorka. Aktivnost GSH-Px se izračunava na sledeći način:

$$\text{GSH-Px} = [(\Delta A - \Delta B) \times 3 \times 10^3] / (6,22 \times V \times \text{Low})$$

* ΔA – promena apsorbance/min za uzorak

* ΔB – promena apsorbance/min za kontrolnu reakciju.

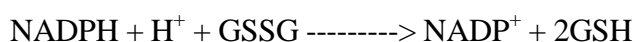
* V – zapremina uzorka u ml

* Low – koncentracija proteina u mg/ml

Rezultati su izraženi u nmol NADPH/min/mg proteina, odnosno nmol NADPH/min/g vlažne mase.

3.14.4. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR)

Određivanje aktivnosti GR rađeno je po metodi Glatzle-a i saradnika iz 1974. god (145). Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovanog u redukovani glutation.



Oksidacija NADPH se prati merenjem promene apsorbance na 340nm.

Rastvori:

1. Fosfatni pufer pH 7,4.....0,5 M
2. EDTA.....0,5 mM
3. GSSG.....2 mM
4. NADPH.....0,1 mM.

Eksperimentalni postupak:

U spektrofotometrijsku kivetu sipa se 0,6 ml fosfatnog pufera, 0,1 ml GSSG, 0,1 ml uzorka i vode do 3 ml. Reakcija otpočinje dodatkom 0,1 ml NADPH. Optimalna temperatura reakcije je 37°C. Prati se promena apsorbance u toku 3 minuta, a aktivnost izračunava pomoću jednačine:

$$\text{GR} = [(\Delta A - \Delta B) \times 3 \times 10^3] / (6,22 \times V \times \text{Low})$$

- * ΔA – promena apsorbance/minuti u uzorku
- * ΔB – promena apsorbance/minuti u kontrolnom uzorku
- * V – zapremina uzorka (ml)
- * Low – količina proteina (mg/ml sonifikata)

Aktivnost je izražena u nmol NADPH/min/mg proteina, odn. nmol NADPH/min/g vlažne mase.

3.15. Statistička obrada podataka

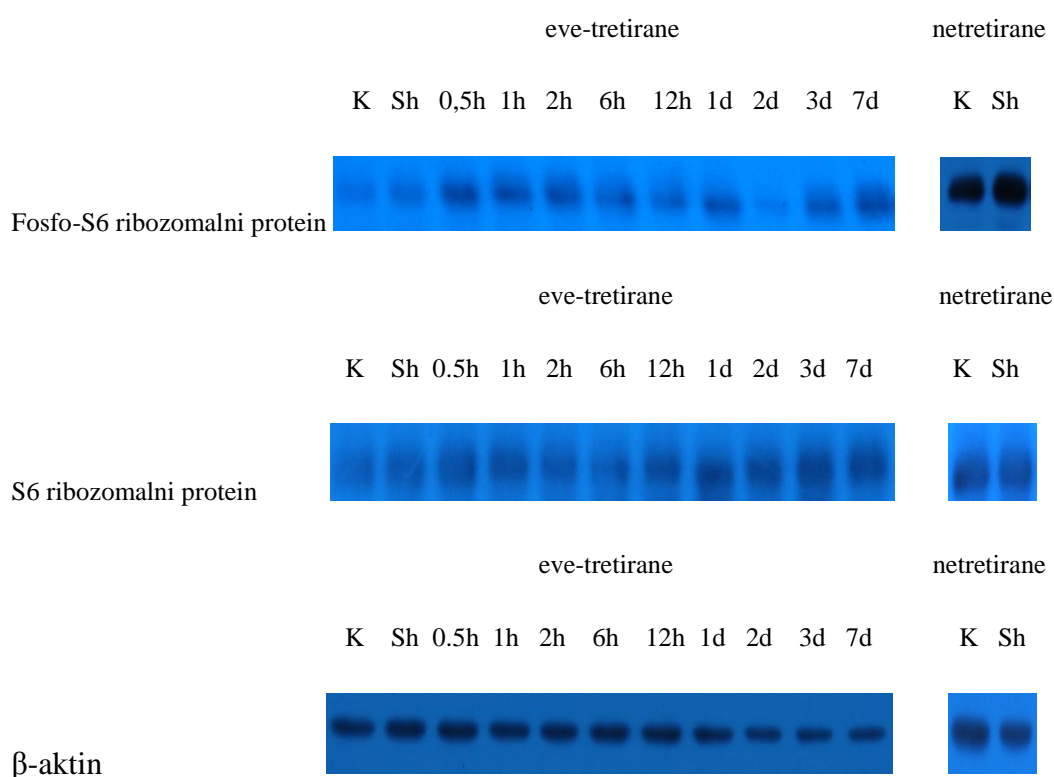
Izračunavanje dovoljnog broja eksperimentalnih životinja u istraživanju sprovedeno je na osnovu preliminarnog eksperimenta sa 14 životinja: 7 iz grupe podvrgnute samo I/R oštećenju i 7 iz grupe podvrgnute I/R oštećenju I tretirane everolimusom. Pri analizi podataka primenjene su osnovne metode deskriptivne statistike: srednja vrednost (\bar{X}) sa merama disperzije standardnom greškom (SE), standardnom devijacijom (SD), rasponom varijacije Min-Max i vrednostima medijane (Med) i moda (Mod). Normalnost raspodele testirana je Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testom. Za testiranje statističke značajnosti i proveru hipoteza korišćeni su sledeći statistički testovi: Studentov t-test (parametrijski test), Mann-Whitney U-test (neparametrijski test), Kruskal-Wallis H test i jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa pratećom *a priori* Boniferonijevom t procedurom i *post hoc* Tuckey HSD, Dunnett T3, Tamhane T2 i Games-Howell testovima za višestruka poređenja među grupama. Kvantifikacija povezanosti između varijabli utvrđivana je Pirsonovom linearnom korelacijom.

Baza podataka i analiza rezultata izvršena je pomoću softverskog paketa SPSS 10.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, SAD).

4. REZULTATI

4.1. mTOR inhibicija

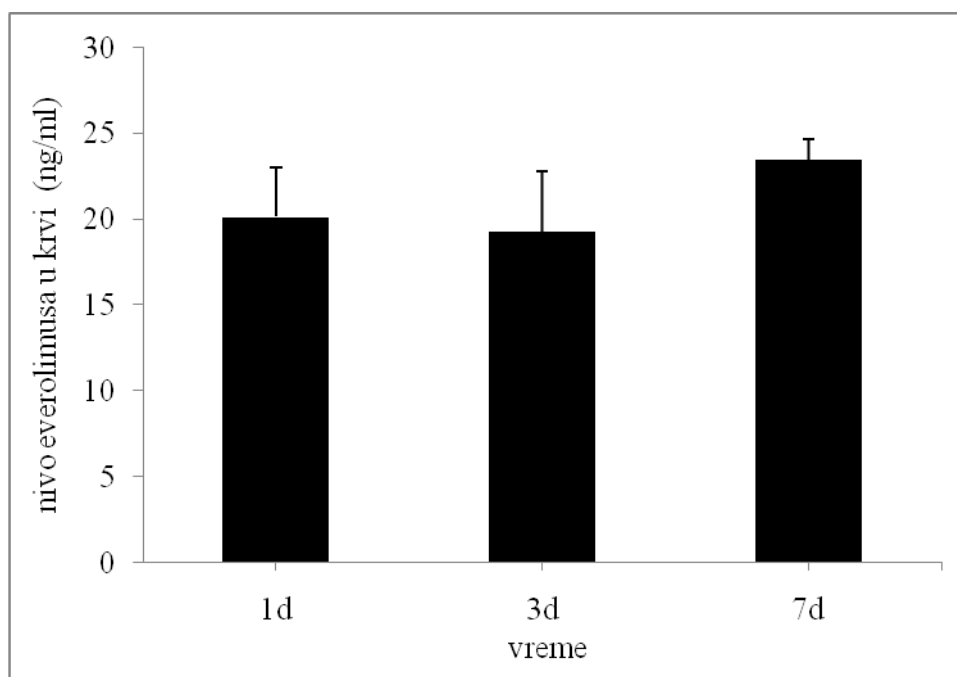
Da bi se proverila efikasnost mTOR inhibicije, određena je ekspresija S6 ribozomalnog proteina i fosfo-S6 ribozomalnog proteina (Ser 235/236). Ukoliko je aktiviran mTOR očekuje se povećan nivo ekspresije fosfo-S6 ribozomalnog proteina (Ser 235/236). U poređenju sa „Sham“-operisanim životinjama koje nisu bile tretirane everolimusom nađen je niži nivo ekspresije fosfo-S6 ribozomalnog proteina (Ser 235/236) kod životinja tretiranih everolimusom u svim vremenskim tačkama (Slika 5). Nije bilo promena u ekspresiji S6 ribozomalnog proteina.



Slika 5. Ekspresija fosfo-S6 ribozomalnog proteina (Ser235/236) kao dokaz mTOR inhibicije. (K – intaktna kontrola; Sh – „Sham“-operisane; eve – everolimus; d – dan)

4.2. Nivo everolimusa u krvi

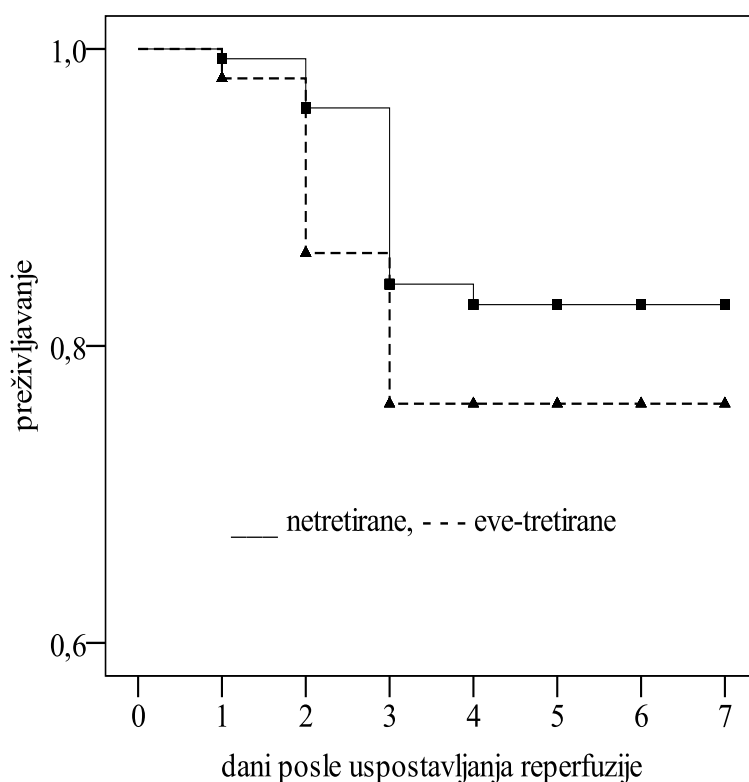
Nivo everolimusa određivan je u punoj krvi životinja spektrofotometrijski jedan dan, tri dana i sedam dana nakon početka aplikacije leka, a pre davanja sledeće doze. Vrednosti koncentracija su se kretale oko 20 ng/ml što je i bio željeni ciljni nivo (Slika 6).



Slika 6. **Nivo everolimusa u krvi životinja.** Nivo leka je određivan 1 dan, 3 dana i 7 dana nakon početke aplikacije leka. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SE. (d – dan).

4.3. Analiza preživljavanja u I/R oštećenju bubrega

Životinje su praćene sedam dana. Većina smrtnih ishoda se dogodila drugog i trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja. Zabeležen je samo jedan smrtni ishod u grupi netretiranih životinja četvrtog dana nakon indukcije I/R oštećenja. Sve životinje koje su preživele do četvrtog dana praćenja, bile su žive i sedmog dana nakon izazivanja I/R oštećenja. Na Slici 7 prikazan je grafik preživljavanja urađen Kaplan-Mayer-ovom analizom. Životinje tretirane everolimusom imale su ukupno veći mortalitet u poređenju sa netretiranim životinjama (62,96% prema 51,52%), ali nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju.



Slika 7. Uticaj treatmana everolimusom na preživljavanje posle indukcije I/R oštećenja bubrega u miševa. Životinje su praćene sedam dana. (eve – everolimus)

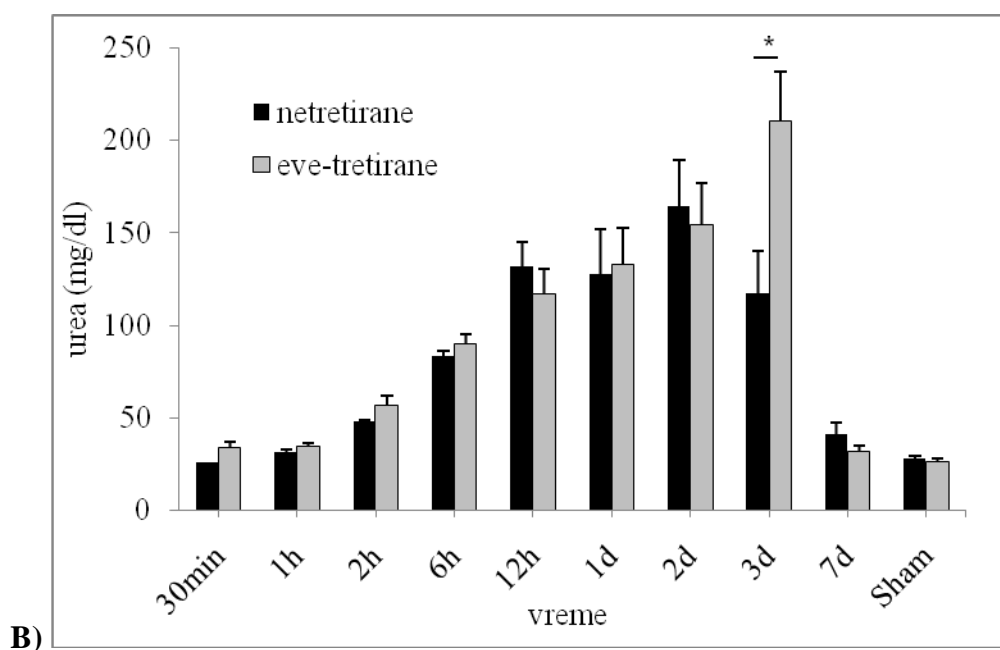
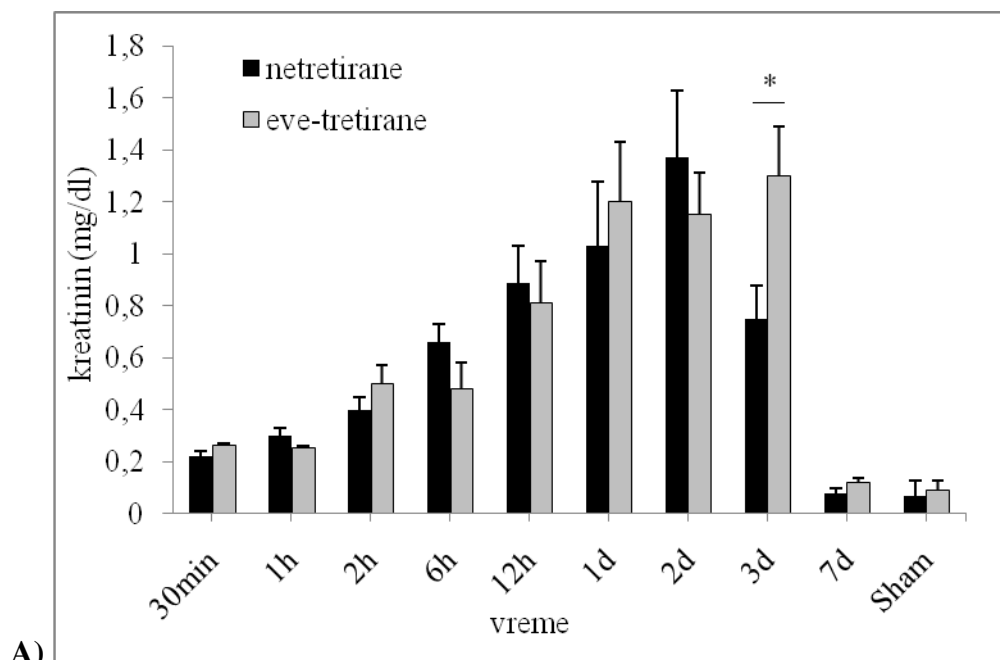
4.4. Bubrežna funkcija posle indukcije I/R oštećenja

Već 2 h posle izazivanja I/R oštećenja u obe grupe miševa, tretiranih everolimusom i netretiranih, zabeležen je porast kreatinina (Slika 8A). Porast vrednosti serumskog kreatinina se održavao 2 dana posle izazivanja I/R oštećenja bez značajne statističke razlike među grupama. Trećeg dana posle izazivanja I/R oštećenja u grupi miševa tretiranih everolimusom uočava se i dalje porast kreatinina ($1,33 \pm 0,19$ mg/dl), dok se u grupi netretiranih miševa beleži pad serumskog kreatinina ($0,75 \pm 0,13$ mg/dl), što između ove dve grupe čini statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) (Slika 8A).

Do sedmog dana nakon izazivanja I/R oštećenja, nivo serumskog kreatinina je u obe eksperimentalne grupe bio skoro isti u poređenju sa kontrolnom grupom i „*Sham*“-operisanim životinjama.

Sličan trend se uočava i kod serumske uree (Slika 8B). Do drugog dana nakon indukcije I/R oštećenja primetan je ravnomerni porast uree u obe eksperimentalne grupe. Trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja, analogno kinetici izmerenih vrednosti kreatinina, u grupi životinja tretiranih everolimusom uočava se dalji rast serumske uree, dok se u grupi netretiranih životinja primećuje početak oporavka bubrežne funkcije mereno padom vrednosti uree u serumu koja je statistički značajno manja od vrednost izmerene u grupi netretiranih životinja ($p < 0,05$) (Slika 8B).

Vrednosti uree između netretiranih i životinja tretiranih everolimusom izmerene sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja se ne razlikuju međusobno kao ni u odnosu na vrednosti kod „*Sham*“-operisanih životinja. Vrednosti kreatinina i uree kod intaktnih kontrola bile su redom $0,087 \pm 0,01$ mg/dl i $26,36 \pm 1,27$ mg/dl i nisu se značajno razlikovale od vrednosti izmerenih kod „*Sham*“-operisanih životinja, te nisu predstavljene na graficima.



Slika 8. Uticaj tretmana everolimusom na bubrežnu funkciju merene vrednostima (A) kreatinina i (B) uree u I/R oštećenju bubrega kod miševa. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,05$).

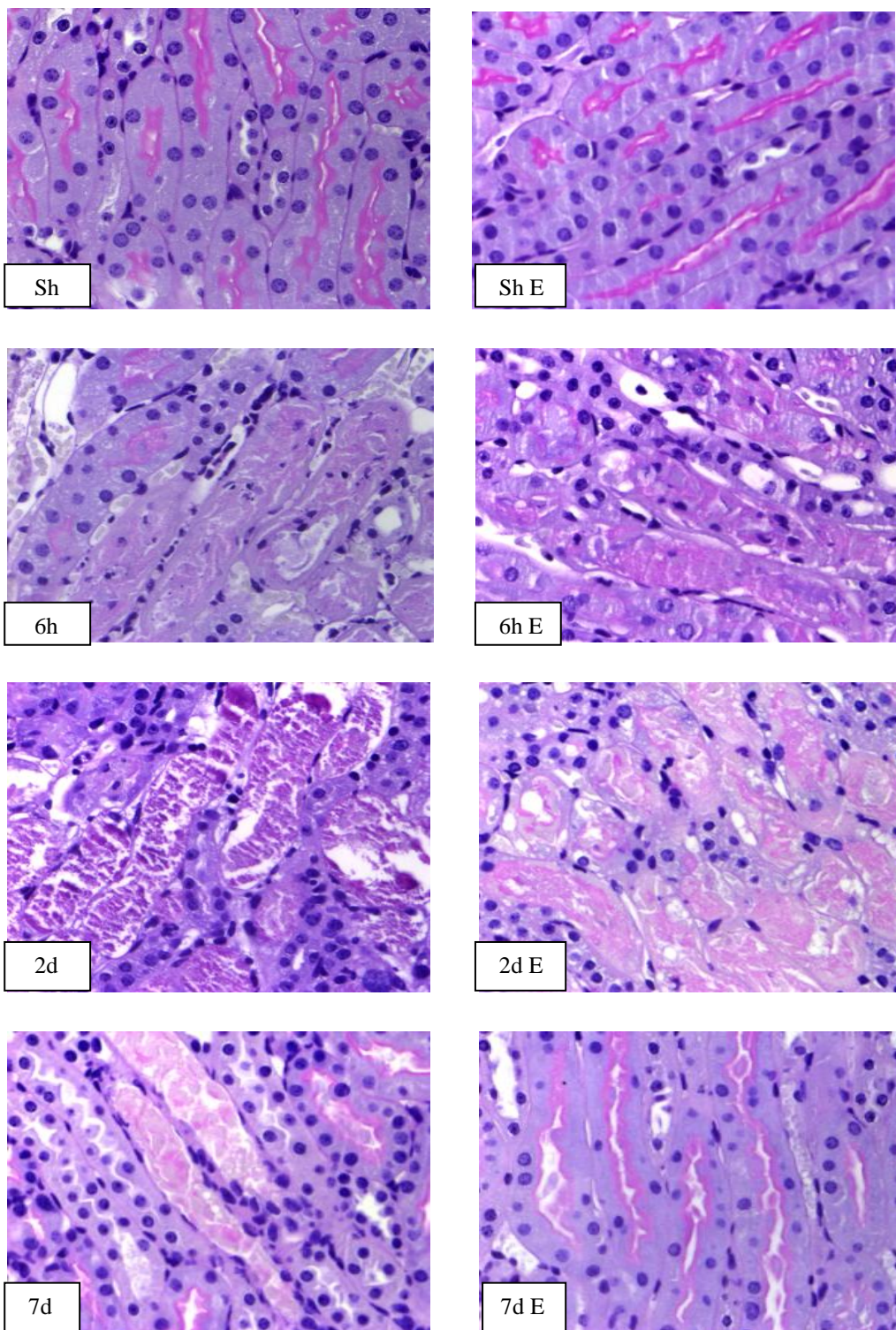
4.5. Indeks tubulointersticijskog oštećenja

Uzorci tkiva bubrega su bojeni PAS tehnikom. Na Slici 9 prikazani su reprezentativni uzorci urađeni u različitim vremenskim intervalima nakon indukcije I/R oštećenja. Histopatološke promene uzrokovane I/R oštećenjem tkiva bubrega u miševa gradirane su određivanjem indeksa tubulointersticijskog oštećenja, na osnovu intenziteta promena u tkivu bubrega koje su stepenovane od 0 do 3. Promene koje su stepenovane su vakuolizacija, stanjivanje tubularnog epitela, gubitak četkastog pokrova, prisustvo nekroze/apoptoze i detritus.

Izražena polja nekroze uočavaju se u obe grupe životinja već šestog sata reperfuzije, a najizraženija su drugog dana nakon indukcije I/R oštećenja. Sedam dana posle indukcije I/R oštećenja u grupi netretiranih životinja se i dalje uočavaju manja polja nekroze, stanjivanje epitela sa vakuolizacijom i gubitkom četkastog pokrova, za razliku od everolimusom tretiranih životinja u kojih se uočava samo hipocelularnost sa mestimičnim stanjivanjem epitela.

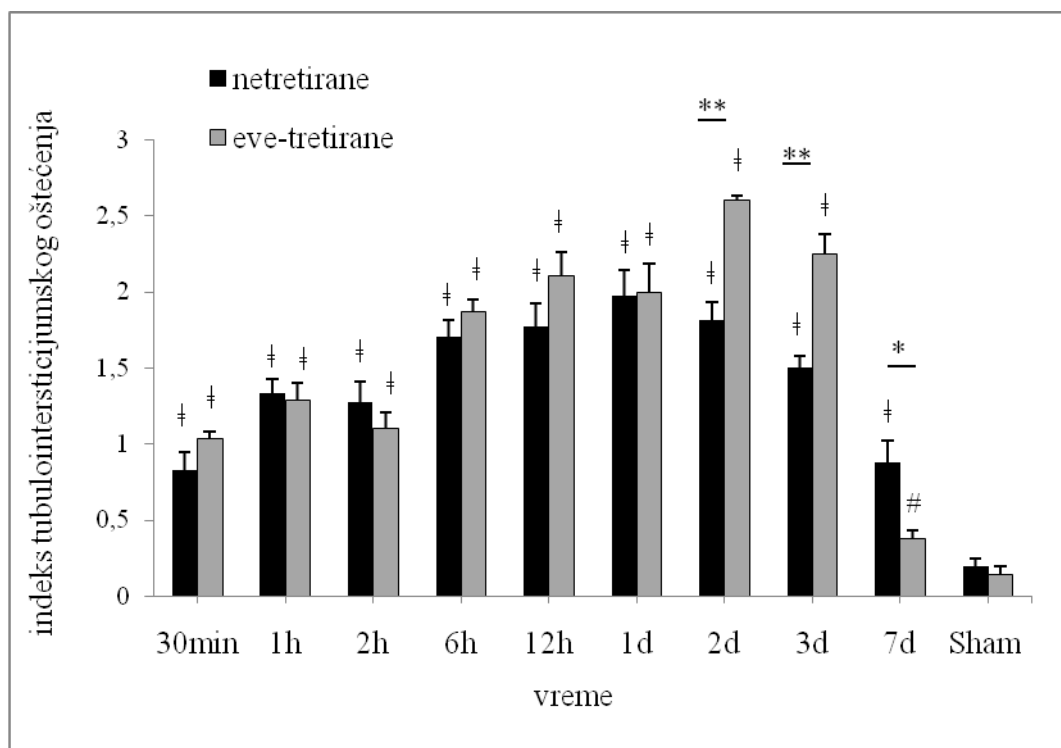
Semikvantitativna analiza je pokazala pojavu znakova tkivnog oštećenja već 30 min nakon indukcije I/R oštećenja. Šest sati nakon indukcije I/R oštećenja u obe eksperimentalne grupe registruje se značajan porast vrednosti indeksa tubulointersticijskog oštećenja koji se održava do trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja s tim da životinje tretirane everolimusom imaju značajno veći indeks tkivnog oštećenja u poređenju sa netretiranim životinjama drugog dana posle indukcije I/R oštećenja ($2,6 \pm 0,03$ prema $1,81 \pm 0,12$; $p < 0,01$) i trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja ($2,25 \pm 0,13$ prema $1,5 \pm 0,08$; $p < 0,01$) (Slika 10).

Sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja netretirane životinje pokazuju i dalje značajno tubulointersticijsko oštećenje čiji je indeks značajno veći ne samo u poređenju sa „Sham“-operisanim životinjama ($p < 0,01$), već i u poređenju sa životinjama tretiranim everolimusom ($p < 0,05$) (Slika 10). Međusobno poređenje vrednosti indeksa tubulointersticijskog oštećenja kod životinja tretiranih everolimusom sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja i „Sham“-operisanih životinja pokazuje takođe značajnu razliku ($p < 0,05$).



Slika 9. Reprezentativne fotografije tkiva bubrega miševa nakon I/R oštećenja.
 PAS bojenje, 400X. (E – everolimus; d – dan; Sh – „Sham“- operisane životinje)

Vrednosti indeksa tubulointersticijskog oštećenja kod intaktnih životinja nisu se značajno razlikovale od vrednosti nađenih kod „Sham“-operisanih životinja, kako netretiranih tako i tretiranih everolimusom.



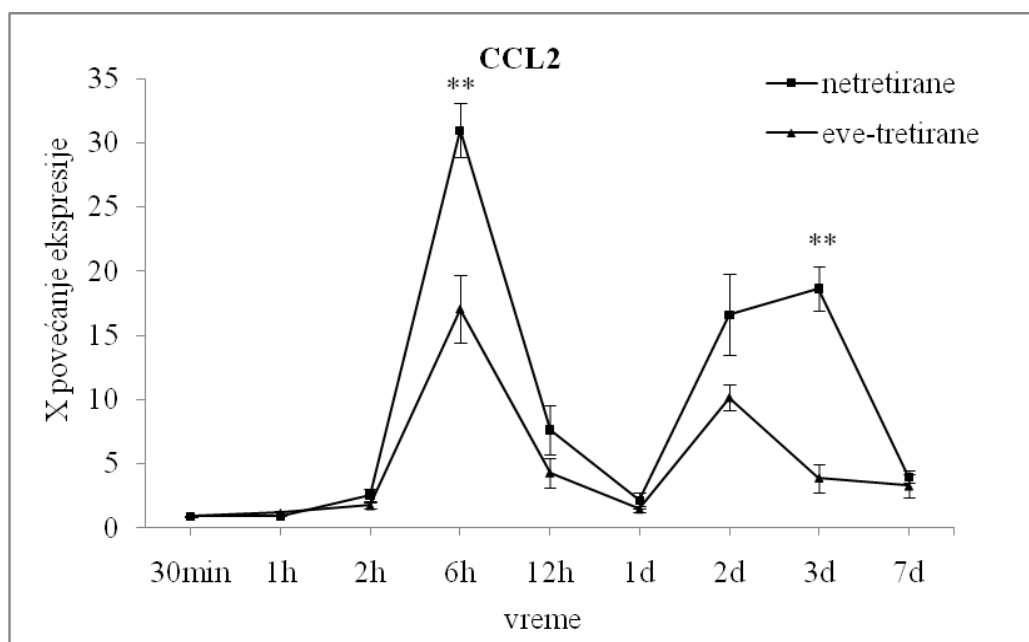
Slika 10. Uticaj everolimusa u I/R oštećenju bubrega na indeks tubularnog oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; # $p < 0,05$ u poređenju sa „Sham“ grupom; ‡ $p < 0,01$ u poređenju sa „Sham“ grupom; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$).

4.6. Ekspresija iRNK za hemokine i proinflamatorne citokine u tkivu bubrega posle indukcije I/R oštećenja

Uzimajući u obzir da I/R oštećenje indukuje snažnu ekspresiju proinflamatornih citokina i hemokina koja može biti promenjena antiinflamatornim dejstvom mTOR inhibitora, ispitali smo hemokinski i citokinski odgovor pod mTOR inhibicijom koristeći se metodom kvantitativnog PCR-a u analizi ekspresije iRNK u tkivu bubrega.

4.6.1. Ekspresija hemokina

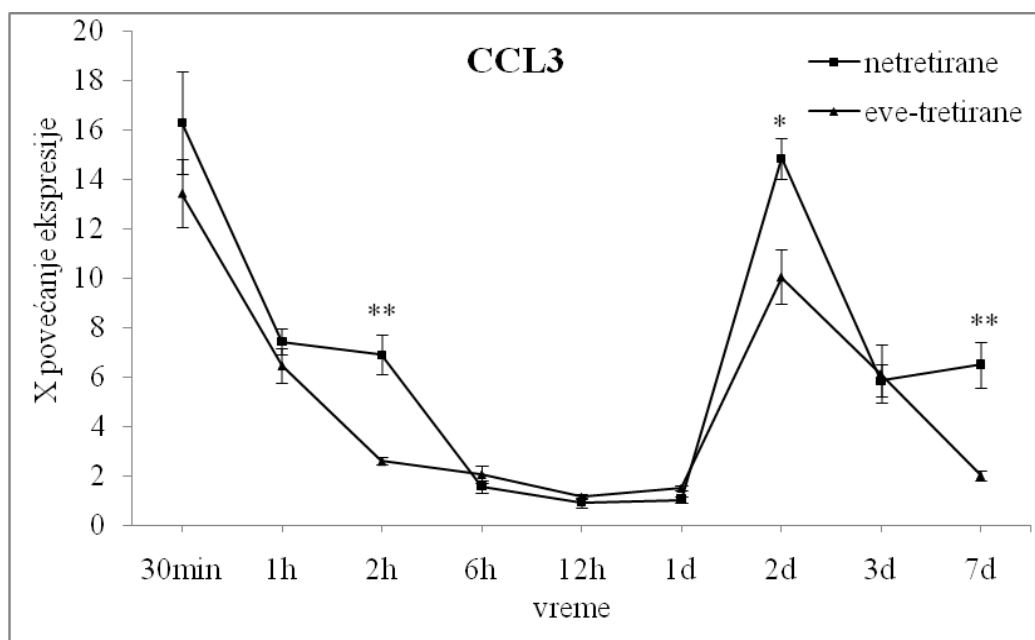
Uočava se bimodalna ekspresija iRNK za hemokine koja se karakteriše pojavom maksimalnih vrednosti („pikova“) ekspresije kako u ranoj inflamatornoj fazi I/R oštećenja, tako i u reparacionoj fazi I/R oštećenja. Prvi „pik“ ekspresije iRNK za CCL2 uočen je u obe eksperimentalne grupe 6 h nakon indukcije I/R oštećenja uz veći porast ekspresije kod netretiranih životinja ($p < 0,01$) (Slika 11). Tokom prvog dana nakon indukcije I/R oštećenja, ekspresija CCL2 snažno opada u obe grupe vraćajući se skoro na normalne vrednosti tj. na vrednosti uočene kod „Sham“-operisanih životinja i intaktnih kontrola. Drugog i trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja ekspresija iRNK za CCL2 ponovo raste, dostižući značajno veće vrednosti kod netretiranih životinja trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja ($p < 0,01$), nakon čega sledi pad ekspresije CCL2.



Slika 11. Produkcija iRNK za CCL2 u tkivu bubrega miševa posle indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; ** $p < 0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$)

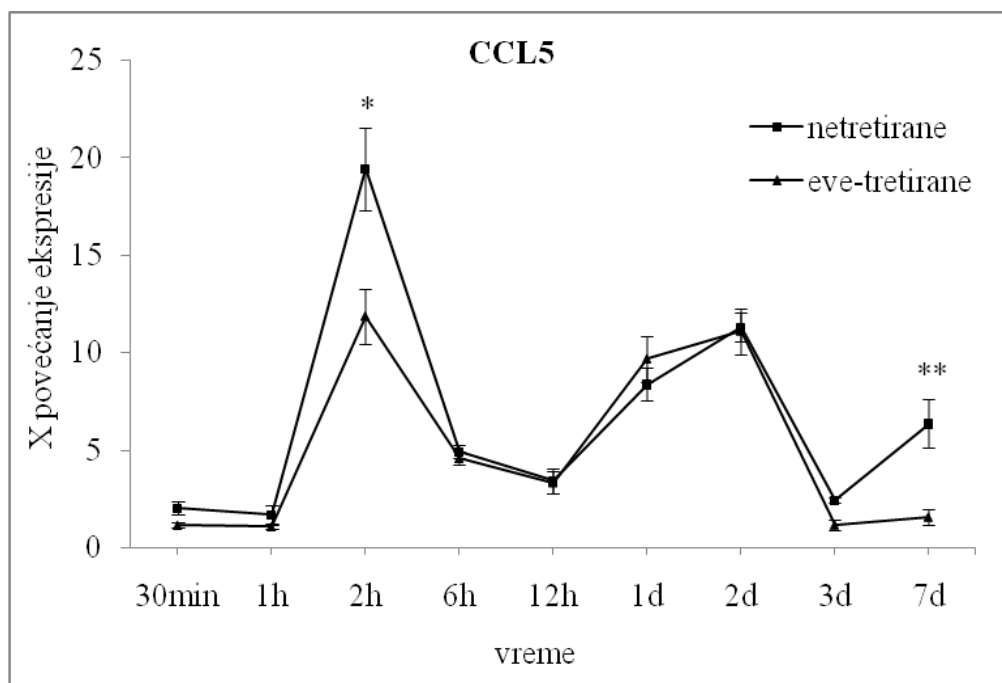
Povećana ekspresija iRNK za CCL3 detektuje se već posle 30 min reperfuzije u obe grupe, nakon čega sledi pad u ekspresiji, koji je kod životinja tretiranih everolimusom brži što rezultuje značajno manjom vrednošću drugog sata reperfuzije u odnosu na vrednost izmerenu kod netretiranih životinja ($p<0,01$) (Slika 12). Sledeće povećanje ekspresije iRNK za CCL3 uočava se u obe grupe drugog dana posle indukcije I/R oštećenja i značajno je veće u grupi netretiranih životinja ($p<0,05$).

Kod životinja tretiranih everolimusom ekspresija pada do kraja perioda posmatranja, dok se kod netretiranih životinja registruje stagnacija ekspresije iRNK za CCL3 sedmog dana nakon indukcije I/R oštećenja, tako da razlika između tretiranih i netretiranih životinja postaje značajna ($p<0,01$).



Slika 12. Produkcija iRNK za CCL3 u tkivu bubrega miševa posle indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p<0,05$, ** $p<0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$)

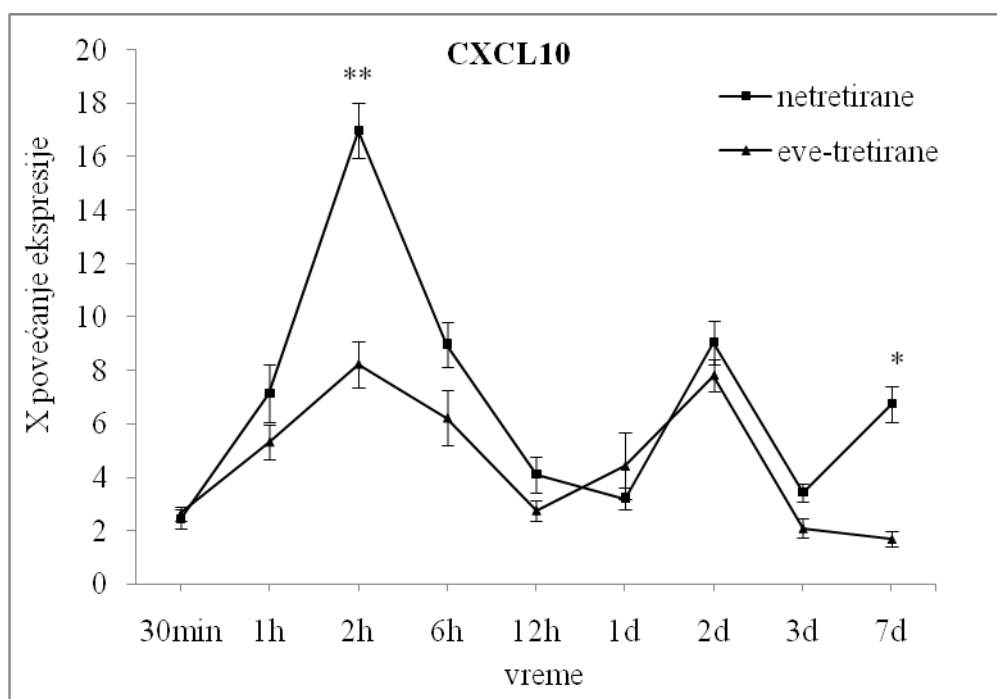
Ekspresija iRNK za CCL5 pokazuje u obe eksperimentalne grupe prvi porast 2 h posle indukcije I/R oštećenja, i drugi porast drugog dana posle indukcije I/R oštećenja (Slika 13). Ekspresije CCL5 je 2h nakon indukcije I/R oštećenja značajno niža u grupi miševa koji su bili tretirani everolimusom ($p<0,05$). Kod netretiranih životinja uočava se nov porast ekspresije iRNK za CCL5 sedmog dana nakon indukcije I/R oštećenja, značajno veći nego kod životinja tretiranih everolimusom ($p<0,01$).



Slika 13. Produkcija iRNK za CCL5 u tkivu bubrega miševa posle indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p<0,05$, ** $p<0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$)

Slična distribucija izmerenih nivoa ekspresije uočena je i za iRNK za CXCL10 uz veći porast ekspresije 2 h nakon indukcije I/R oštećenja kod netretiranih miševa u odnosu na miševe tretirane everolimusom ($p<0,01$) (Slika 14). Drugo povećanje ekspresije iRNK za CXCL10 javlja se u obe eksperimentalne grupe drugog dana posle

indukcije I/R oštećenja, ali bez statistički značajne razlike. Sedam dana nakon indukcije I/R oštećenja registruje se nov porast ekspresije iRNK za CXCL10 kod netretiranih životinja, statistički značajno veći nego vrednost izmerena u grupi tretiranih životinja ($p < 0.05$).

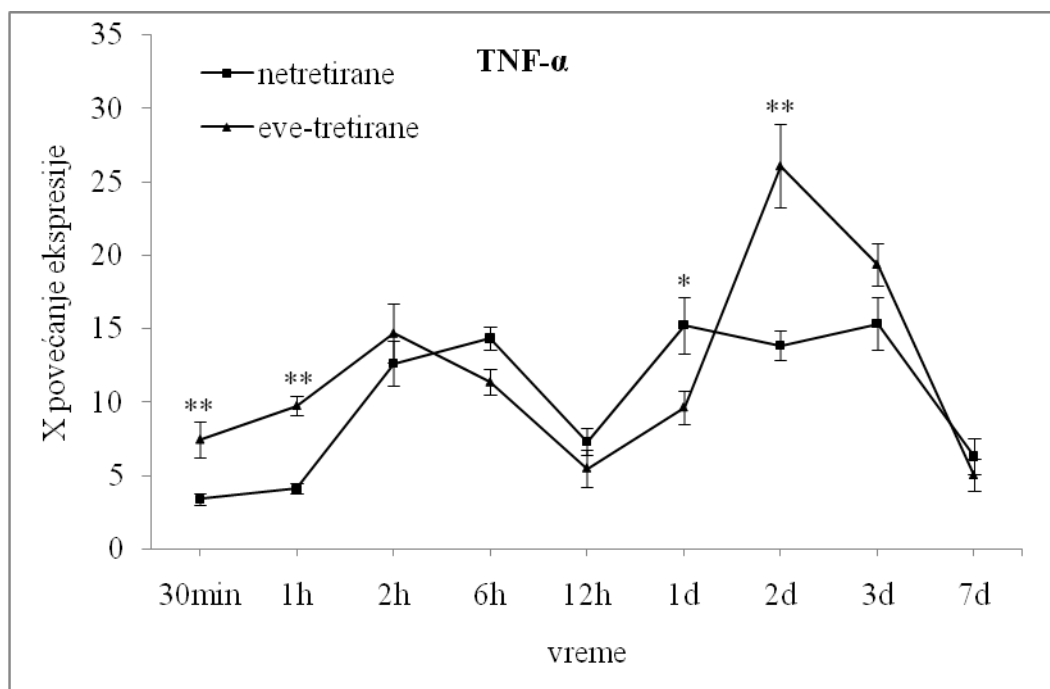


Slika 14. Produkcija iRNK za CXCL10 u tkivu bubrega miševa posle indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$)

4.6.2. Ekspresija TNF- α i IL-1 β

Tokom celog perioda ispitivanja uočena su u obe eksperimentalne grupe dva perioda povećane ekspresije iRNK za TNF- α ; prvi do šestog sata reperfuzije i drugi od prvog do trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja (Slika 15). U prvom satu reperfuzije

životinje tretirane everolimusom pokazuju značajno veću ekspresiju iRNK za TNF- α u odnosu na netretirane životinje ($p < 0,01$).

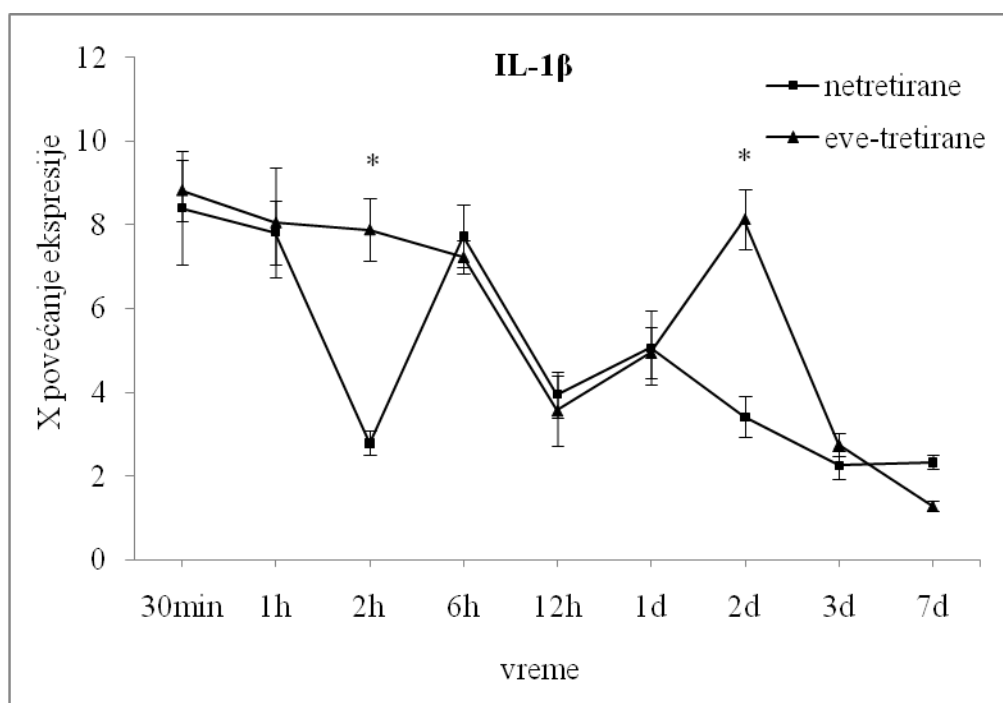


Sl 15. Kinetika produkcije iRNK za TNF- α u tkivu bubrega miševa nakon indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$)

Prvog dana nakon indukcije I/R oštećenja ekspresija iRNK za TNF- α je značajno veća kod netretiranih životinja ($p < 0,05$), ali se drugog dana nakon indukcije I/R oštećenja uočava značajan porast ekspresije iRNK za TNF- α kod životinja tretiranih everolimusom u odnosu na netretirane ($p < 0,01$).

Povećana ekspresija iRNK za IL-1 β beleži se već 30 min posle indukcije I/R oštećenja u obe eksperimentalne grupe održavajući plato povećane ekspresije u grupi životinja tretiranih everolimusom prvih 6 sati reperfuzije (Slika 16). Za razliku od njih, netretirane životinje pokazuju pad u ekspresiji iRNK za IL-1 β 2 h nakon indukcije I/R

oštećenja koji je značajan u poređenju sa životinjama tretiranim everolimusom ($p < 0.05$). Ponovan porast ekspresije iRNK za IL-1 β registruje se drugog dana nakon indukcije I/R oštećenja, i on se statistički značajno razlikuje u odnosu na vrednosti registrovane kod netretiranih životinja ($p < 0,05$) (Slika 16).

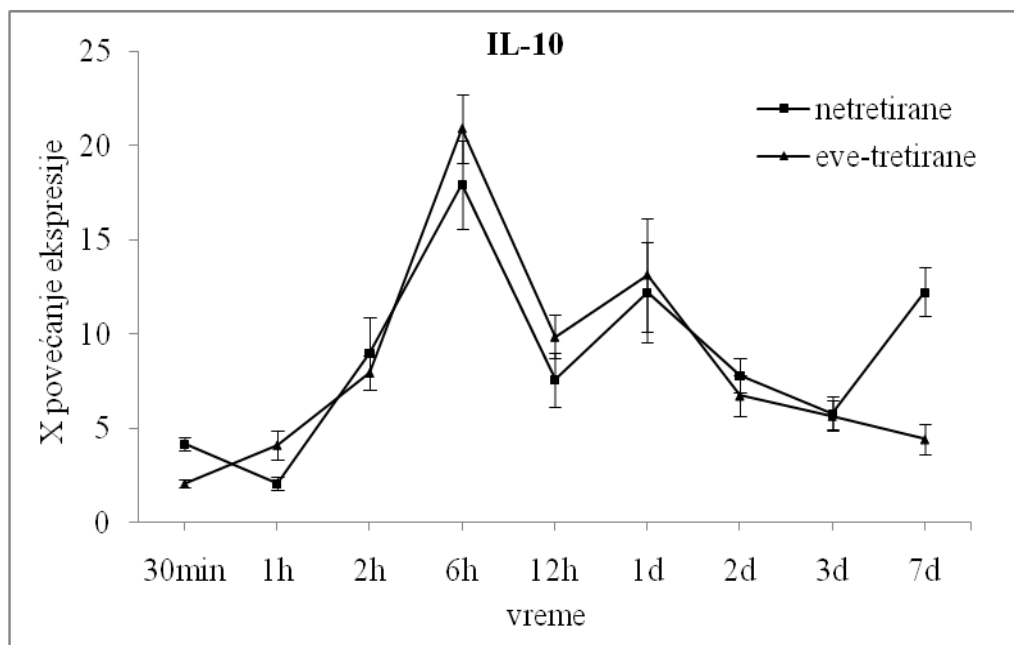


Slika 16. Ekspresija iRNK za IL-1 β u tkivu bubrega miševa nakon indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0.05$, netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$)

4.7. Ekspresija iRNK za antiinflamatorne citokine u I/R oštećenju bubrega

Fiziološki odgovor na povećanu produkciju proinflamatornih medijatora je povećana produkcija citokina sa antiinflamatornim svojstvima kao što su IL-10 i TGF- β . U obe eksperimentalne grupe registrovana je slična kinetika ekspresije iRNK za IL-10,

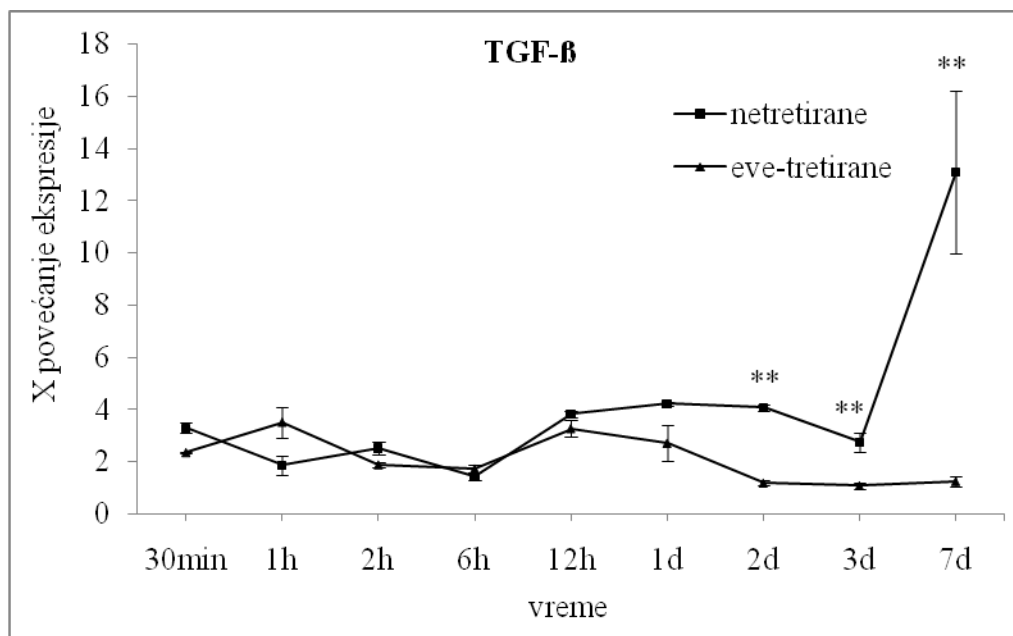
pri čemu su najveće vrednosti registrovane 6 h posle indukcije I/R oštećenja (Slika 17). Povećana ekspresija iRNK za IL-10 se održava i sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja koja je kod netretirane životinje veća, ali bez statističke značajnosti u poređenju sa životinjama tretiranim everolimusom.



Slika 17. Kinetika produkcije iRNK za IL-10 u tkivu bubrega miševa nakon indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; n=7)

Neznatan porast ekspresije iRNK za TGF- β je uočiv u prvim satima reperfuzije u obe eksperimentalne grupe bez značajnih međusobnih razlika (Slika 18). Posle dvanaestog sata reperfuzije zapaža se nov porast ekspresije iRNK za TGF- β , koji se kod životinja tretiranih everolimusom drugog dana posle indukcije I/R oštećenja normalizuje na vrednosti koje se uočavaju kod Sham-operisanih i intaktnih životinja i kao takve ostaju do kraja perioda ispitivanja (Sl. 18). Za razliku od životinja tretiranih everolimusom, netretirane životinje pokazuju drugog i trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja umereno povećanu ekspresiju iRNK za TGF- β koja je u poređenju sa

vrednostima registrovanim u tom periodu kod životinja tretiranih everolimusom značajno veća ($p < 0,01$) (Slika 18). Sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja ekspresija iRNK za TGF- β značajno raste u grupi netretiranih životinja i dostiže najveće vrednosti izmerene u celom period ispitivanja ($p < 0,01$ u odnosu na životinje tretirane everolimusom).

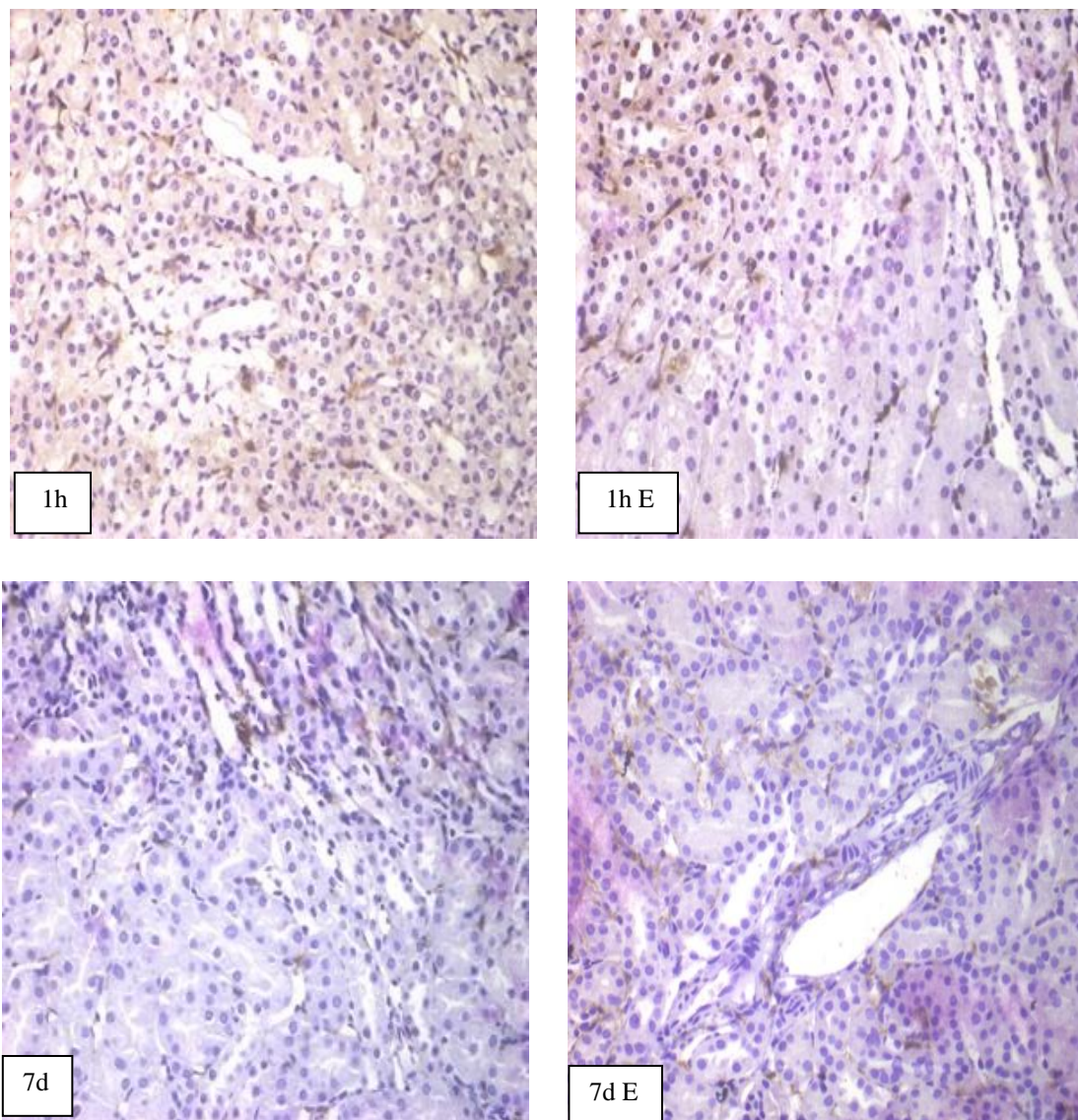


Slika 18. Ekspresija iRNK za TGF- β u tkivu bubrega miševa nakon indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; ** $p < 0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$)

4.8. Dejstvo everolimusa na prisustvo F4/80 pozitivnih ćelija u I/R oštećenju bubrega miševa

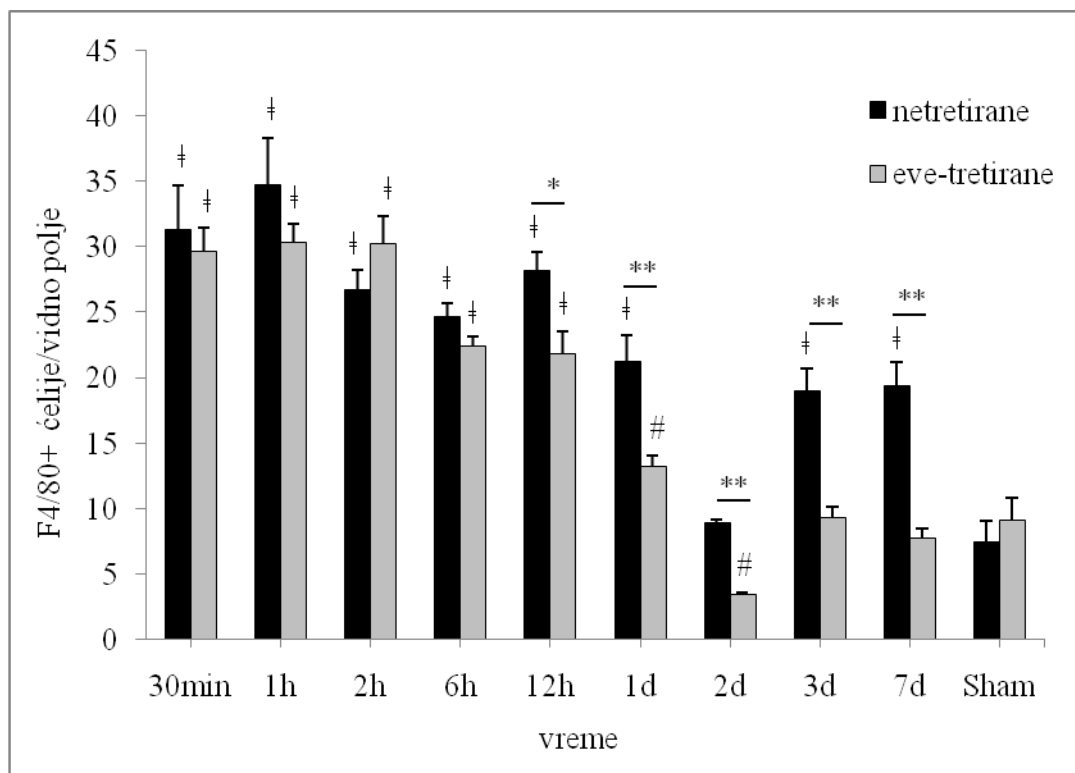
Na Slici 19 prikazane su mikrofotografije bubrežnog tkiva u I/R oštećenju posle bojenja na F4/80, koji predstavlja specifični marker mononuklearnih fagocita kod miševa. Značajno veće prisustvo F4/80 pozitivnih ćelija se uočava u obe eksperimentalne grupe već u prvom satu reperfuzije u poređenju sa „Sham“-operisanim

životinjama. Sedam dana nakon indukcije I/R oštećenja kod miševa tretiranih everolimusom uočava se manje prisustvo F4/80 pozitivnih ćelija u odnosu na netretirane životinje.



Slika 19. Reprezentativne fotografije F4/80 pozitivnih ćelija u tkivu bubrega miševa nakon indukcije I/R oštećenja. Imunohistohemijsko bojenje na F4/80, 200X. (E – everolimus; d – dan).

Preciznijom procenom, prebrojavanjem ćelija pozitivnih na F4/80 marker, uočava se da se njihovo značajno povećano prisustvo u odnosu na „Sham“-operisane životinje održava počev od prvog sata reperfuzije ($p < 0,01$) pa sve do drugog dana posle indukcije I/R oštećenja kada je broj F4/80 pozitivnih ćelija najmanji u obe eksperimentalne grupe (Slika 20).



Slika 20. Prikaz infiltracije F4/80⁺ ćelija u tkivu bubrega miševa nakon indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti broja F4/80⁺ pozitivnih ćelija izbrojanih u vidnom polju \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; # $p < 0,05$ u poređenju sa „Sham“-operisanim životinjama; † $p < 0,01$ u poređenju sa „Sham“-operisanim životinjama; * $p < 0,05$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; ** $p < 0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$).

Drugog dana posle indukcije I/R oštećenja broj F4/80 pozitivnih ćelija kod netretiranih životinja se ne razlikuje značajno od broja uočenog kod „*Sham*“-operisanih životinja, dok je broj F4/80 pozitivnih ćelija kod životinja tretiranih everolimusom čak manji nego što je broj kod „*Sham*“-operisanih životinja ($p < 0,05$).

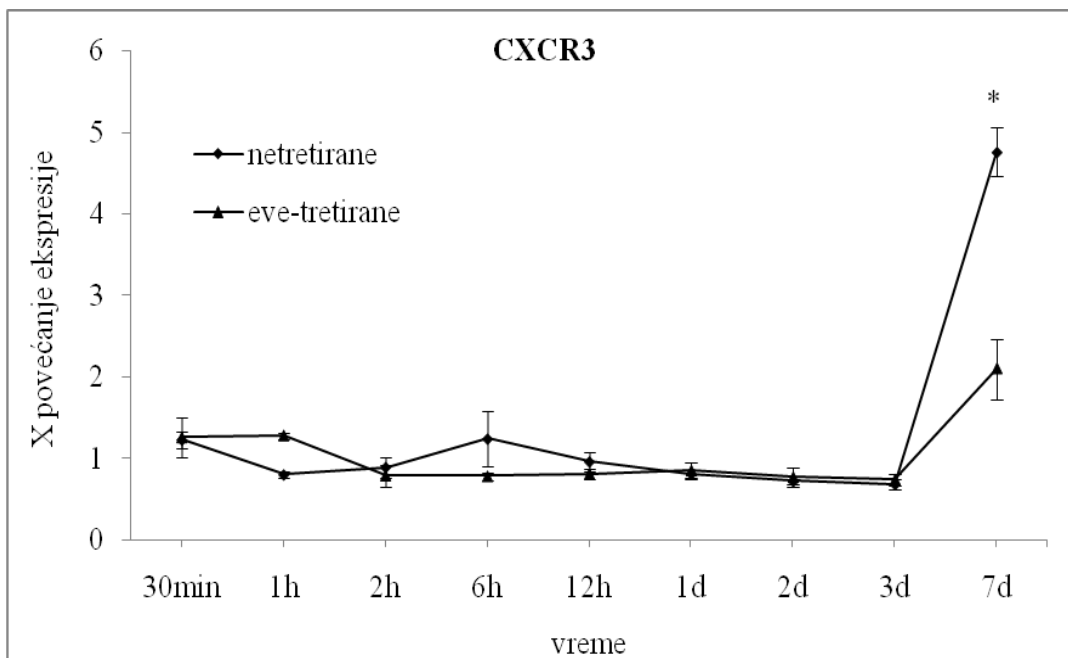
Počev od trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja broj F4/80 pozitivnih ćelija se ponovo povećava u grupi netretiranih životinja i postaje značajno veći u odnosu na broj F4/80 pozitivnih ćelija kod „*Sham*“-operisanih životinja sa održavanjem statističke značajnosti i sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja ($p < 0,01$).

Povećanje broja F4/80 pozitivnih ćelija uočava se i kod životinja tretiranih everolimusom u periodu od trećeg do sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja, ali se on ne razlikuje značajno od broja uočenog kod „*Sham*“-operisanih životinja.

Uočava se da u periodu od 12 h posle indukcije I/R oštećenja pa sve do kraja ispitivanja, netretirane životinje pokazuju značajno veći broj F4/80 pozitivnih ćelija u odnosu na životinje tretirane everolimusom ($p < 0,05$ 12 h posle indukcije I/R oštećenja; $p < 0,01$ u periodu od prvog do sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja) (Slika 20).

4.10. Ekspresija iRNK za CXCR3 u bubregu posle indukcije I/R oštećenja

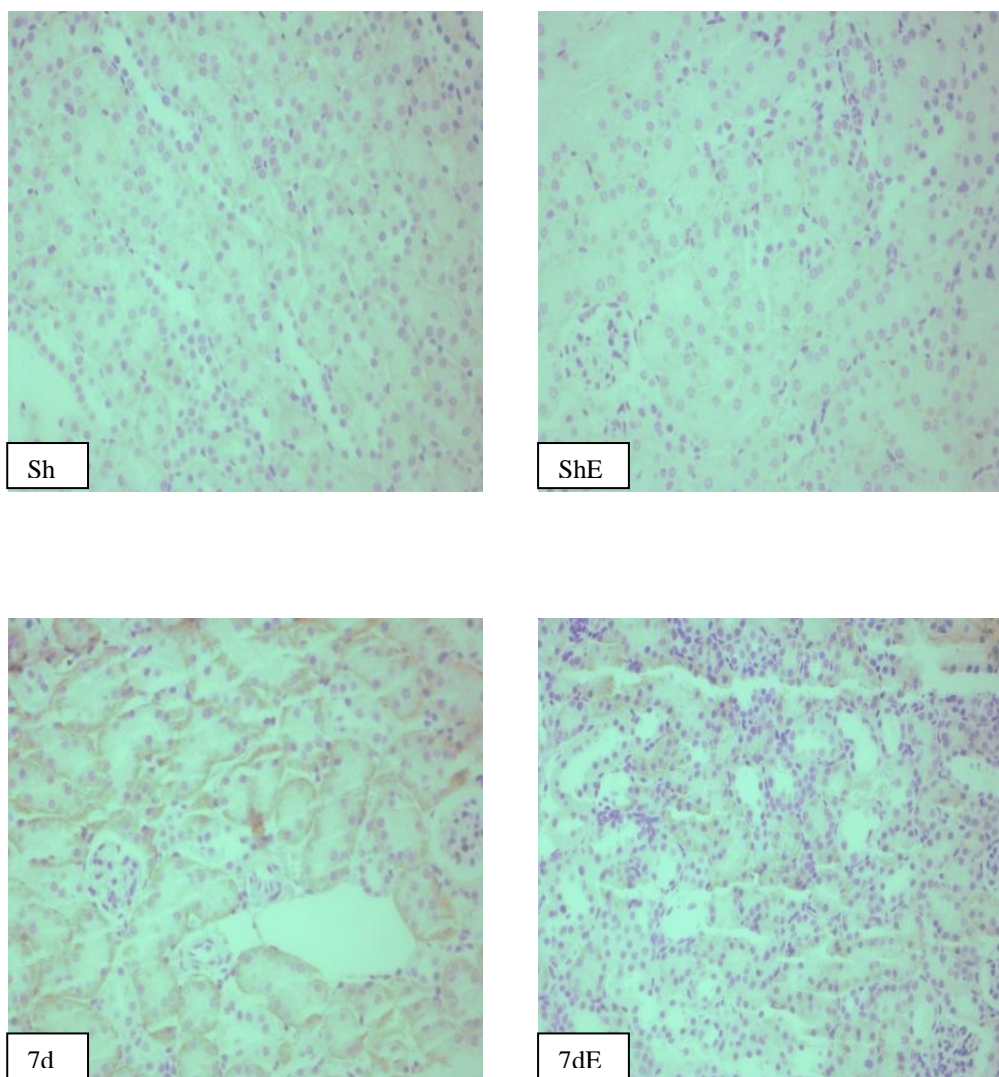
CXCR3 predstavlja receptor za hemokin CXCL10 i eksprimiran je skoro isključivo na aktiviranim T limfocitima, ali se može naći i na određenoj populaciji aktiviranih makrofaga. Korišćenjem metode kvantitativnog PCR-a nađena je značajno povećana ekspresija iRNK za CXCR3 tek sedmog dana reperfuzije u grupi netretiranih životinja u odnosu na životinje tretirane everolimusom ($p < 0,01$) (Slika 21). U svim ostalim vremenskim tačkama ispitivanja nije zabeležen porast ekspresije iRNK za CXCR3 ni u jednoj eksperimentalnoj grupi.



Slika 21. Ekspresija iRNK za CXCR3 u bubregu miševa nakon indukcije I/R oštećenja. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$)

4.9. Infiltracija T-limfocita u tkivu bubrega posle indukcije I/R oštećenja

Imunohistohemijsko bojenje na CD3, specifičan marker T-ćelija, nije pokazalo značajnu infiltraciju T-limfocita u tkivu bubrega, kako netretiranih, tako i životinja tretiranih everolimusom u poređenju sa „Sham“-operisanom grupom mereno u svim vremenskim tačkama ispitivanja. Sedmog dana nakon indukcije I/R oštećenja nalaze se pojedinačne CD3⁺ pozitivne ćelije, ali nedovoljno za kvantifikaciju (Slika 22).



Slika 22. Reprezentativne fotografije tkiva bubrega nakon uradenog imunohistohemijskog bojenja na CD3 marker. 200X. (E – everolimus; d – dan; Sh – „Sham“ - operisane životinje).

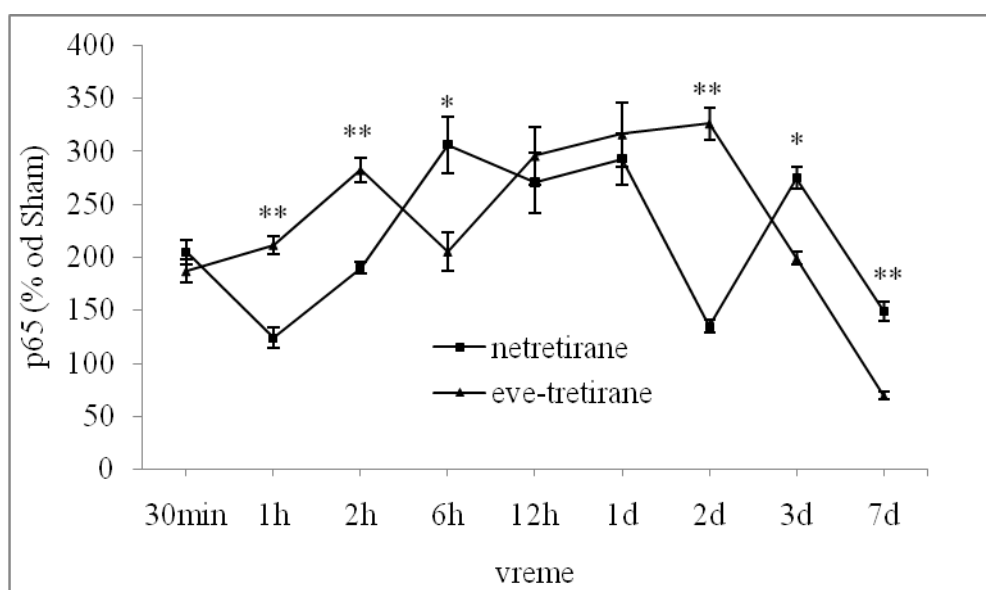
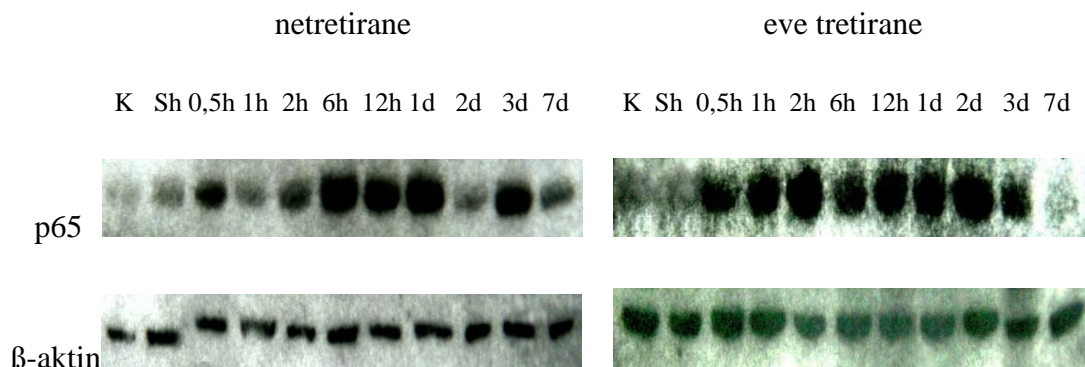
4.11. Nuklearna translokacija p65 i fosfo-Ser536-p65 u I/R oštećenju bubrega

S obzirom na aktivaciju p65 u I/R oštećenju korišćenjem Western blota analizirana je ekspresija p65 kao i fosfo-p65 u nuklearnoj proteinskoj frakciji tkiva bubrega nakon indukcije I/R oštećenja. Denzitometrijska analiza p65 i fosfo-p65 urađena je na odvojenim nuklearnim frakcijama 4 životinje za svaku vremensku tačku ispitivanja. Na Slici 23A prikazani su reprezentativni imunoblotovi za p65 u obe eksperimentalne grupe.

Denzitometrijska analiza je pokazala inicijalno povećanu nuklearnu ekspresiju p65 u obe grupe. U grupi životinja tretiranih everolimusom se potom beleži dalji rast nuklearne ekspresije p65 u periodu između 1 h i 2 h posle indukcije I/R oštećenja dostižući drugi „pik“ ekspresije drugog dana posle indukcije I/R oštećenja, statistički značajno veći u odnosu na izmerenu ekspresiju p65 istog dana u grupi netretiranih životinja ($p < 0,01$) (Sl. 23B).

Posle 6 h reperfuzije, netretirane životinje dostižu maksimum nuklearne ekspresije p65 koja značajno veća nego vrednost ekspresije p65 kod životinja tretiranih everolimusom ($p < 0,05$). Plato povećane ekspresije p65 u grupi netretiranih životinja se održava zaključno sa prvim danom nakon indukcije I/R oštećenja, da bi se drugog dana posle indukcije I/R oštećenja detektovao značajan pad u nuklearnoj ekspresiji. Važno je istaći povećanu translokaciju p65 u jedro kod netrtetiranih životinja ne samo trećeg ($p < 0,05$) već i sedmog dana nakon indukcije I/R oštećenja ($p < 0,01$) u poređenju sa životinjama tretiranim everolimusom (Sl. 23B).

A)

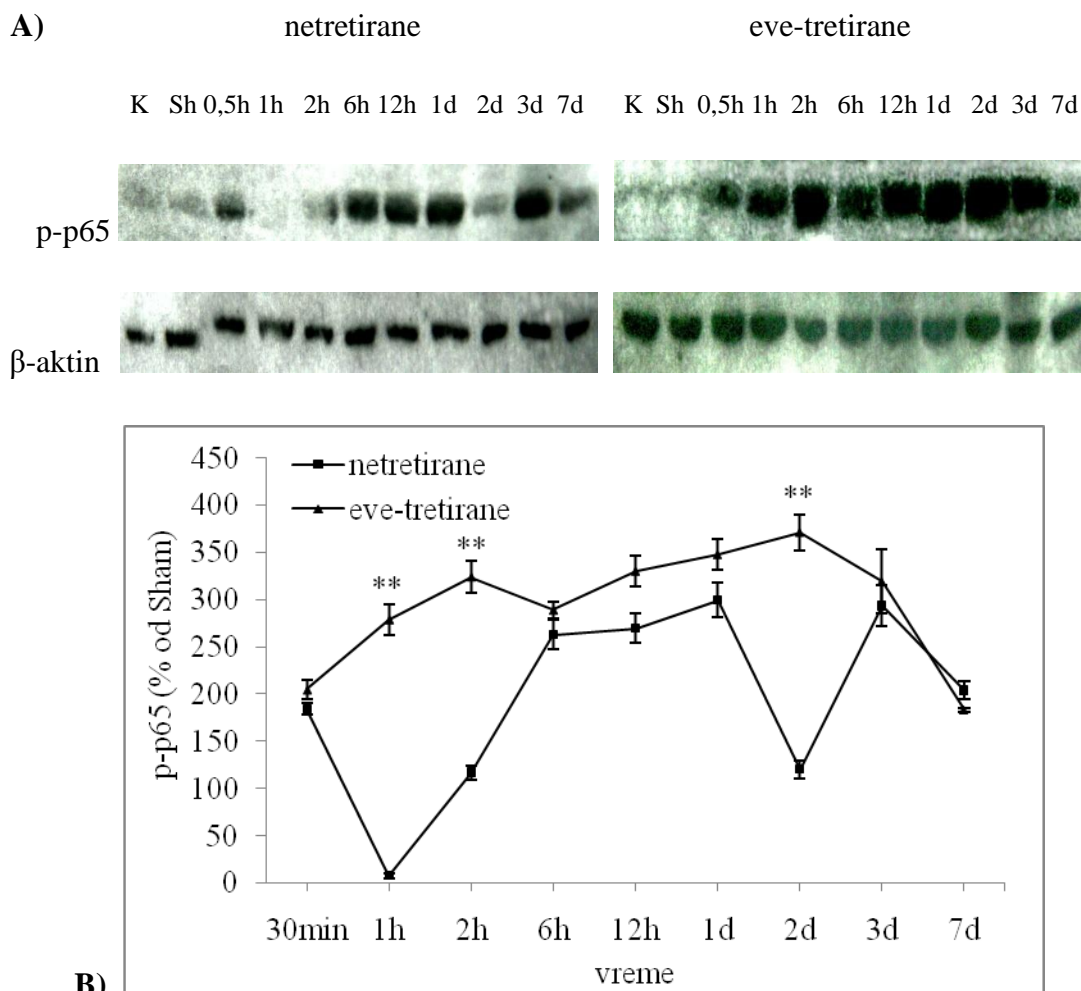


B)

Slika 23. Ekspresija p65 u I/R oštećenju bubrega. (A) Reprerentivni imunoblotovi ukupnog p65 određenih u nuklearnom proteinskom izolatu. Kao kontrola služio je β -aktin. (B) Denzitometrijska analiza ekspresije p65 urađena je na 4 imunoblota i vrednosti su prikazane kao procenat od izmerene ekspresije kod „Sham“-operisanih životinja. (K – intaktna kontrola; Sh – „Sham“-operisane; eve – everolimus; d – dan; *p<0,05; **p<0,01 netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom).

Ekspresija fosforilisane forme p65 (fosfo-Ser536-p65) pokazuje sličnu vremensku raspodelu kao i p65 u obe eksperimentalne grupe (Slika 24A i 24B). Uočava

se tokom celog perioda praćenja povećana ekspresija fosforilisane forme p65 (fosfo-Ser536-p65) kod životinja tretiranih everolimusom bez značajnijih „pikova“ koji se izdvajaju, za razliku od netretiranih životinja koje pokazuju sličan oblik krive kao i nuklearna ekspresija p65 sa „pikovima“ ekspresije registrovanim 30 min posle indukcije I/R oštećenja, u periodu između 6 h i jednog dana posle indukcije I/R oštećenja i trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja (Slika 24B).



Slika 24. Ekspresija fosforilisane forme p65 (fosfo-Ser536-p65) u I/R oštećenju bubrega. (A) Reprezentativni imunoblotovi fosfo-p65 određenih u nuklearnom proteinskom izolatu tkiva bubrega nakon indukcije I/R oštećenja. Kao kontrola služio je β-aktin. (B) Denzitometrijska analiza ekspresije fosfo-p65 urađena je na 4 imunoblota. Vrednosti su prikazane kao procenat od izmerene ekspresije kod „Sham“-operisanih životinja. (K – intaktna kontrola; Sh – „Sham“-operisane; eve – everolimus; d – dan; **p<0.01 eve-tretirane u odnosu na netretirane).

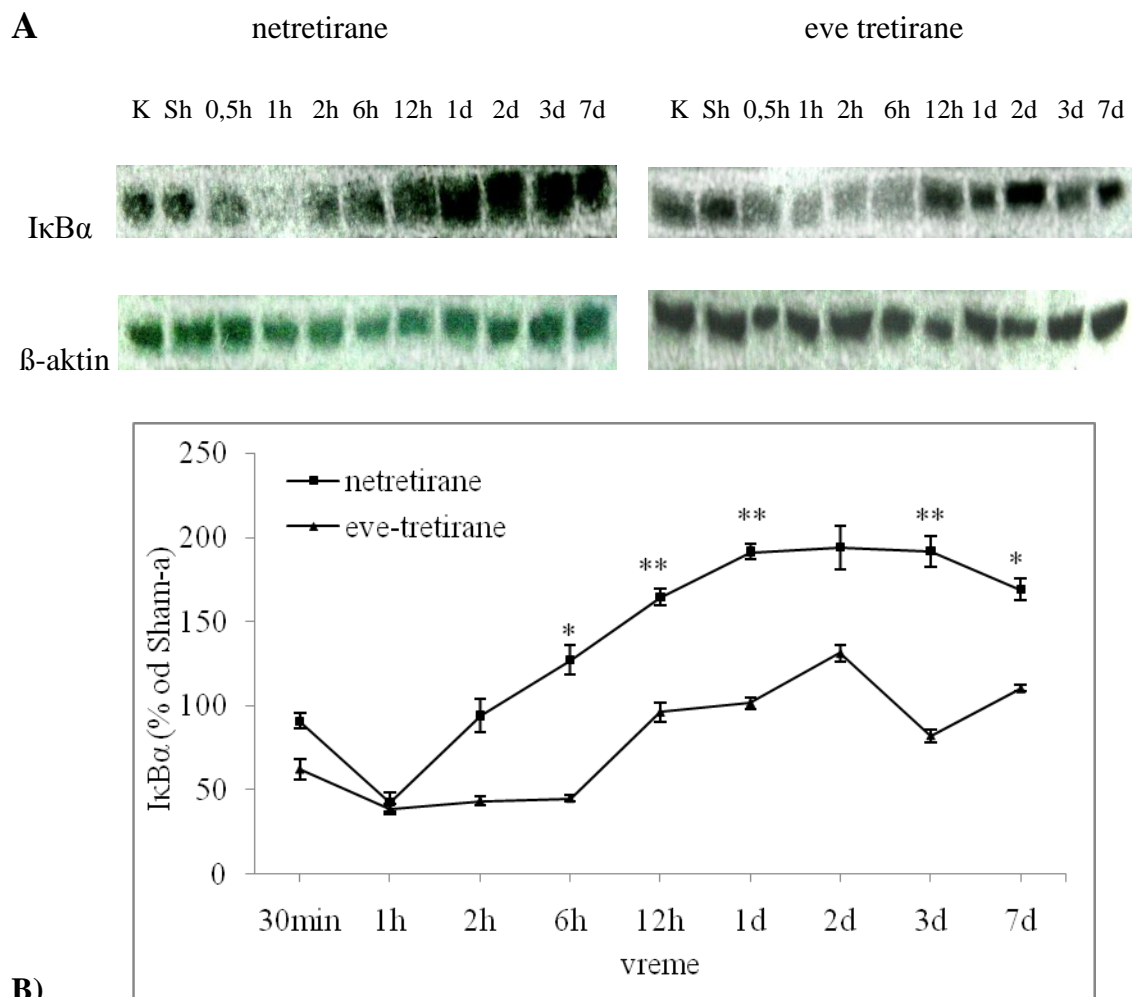
Životinje tretirane everolimusom pokazuju značajno veću ekspresiju fosfo-Ser536-p65 prvog i drugog sata kao i drugog dana nakon indukcije I/R oštećenja u odnosu na netretirane životinje ($p < 0,01$). U kasnoj, reparacionoj fazi I/R oštećenja, trećeg i sedmog dana nakon indukcije I/R oštećenja, nema značajnih razlika u ekspresiji fosfo-Ser536-p65 između netretiranih životinja i životinja tretiranih everolimusom (Sl. 24B).

4.12. Određivanje ekspresije I κ B α i fosfo-(Ser32/Ser36)-I κ B α u bubrežima posle indukcije I/R oštećenja

Da bi ispitali i odredili značaj aktivacije NF- κ B kanoničkim putem u patogenezi I/R oštećenja bubrega, analizirana je ekspresija I κ B α i fosfo-(Ser32/Ser36)-I κ B α u citoplazmatskoj proteinskoj frakciji Western blot tehnikom. Imunoblotna kvantifikacija je urađena na odvojenim citoplazmatskim frakcijama proteina bubrega 4 životinje po svakoj vremenskoj tački. U poređenju sa intaktnim i Sham-operisanim životinjama, povećana ekspresija fosfo-I κ B α bila je detektovana u obe eksperimentalne grupe u svim vremenskim tačkama (Slika 25A).

U toku celog perioda ispitivanja u obe grupe se uočava slična kinetika ekspresije fosfo-I κ B α , sa izdvajanjem dva značajna „pika“ ekspresije prvog i trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja, ali se u ranom period posle indukcije I/R oštećenja beleži veća ekspresija u grupi netretiranih životinja. U odnosu na životinje tretirane everolimusom, netretirane životinje pokazuju značajno veću ekspresiju fosfo-I κ B α posle 30 min reperfuzije ($p < 0,01$) i 12 h reperfuzije ($p < 0,01$) (Slika 25B). Za razliku od netretiranih životinja, životinje tretirane everolimusom pokazuju inicijalni porast ekspresije fosfo-I κ B α 1 h nakon indukcije I/R oštećenja i sledeća dva „pika“ ekspresije 1 dan i 3 dana nakon indukcije I/R oštećenja (Slika 25B).

Uparedo sa rastom ekspresije fosfo-I κ B α u ranim satima reperfuzije uočava se pad ekspresije I κ B α u obe eksperimentalne grupe (Slika 26A). Densitometrijska analiza je pokazala da u grupi netretiranih životinja ekspresija I κ B α dostiže vrednosti kao kod



Slika 26. Ekspresija I κ B α u I/R oštećenju bubrega. (A) Reprezentativni imunoblotovi I κ B α određenih u citoplazmatskom proteinskom izolatu tkiva bubrega nakon indukcije I/R oštećenja. Kao kontrola služio je β -aktin. (B) Densitometrijska analiza ekspresije I κ B α urađena je na 4 imunoblota i vrednosti su prikazane kao procenat od izmerene ekspresije kod „Sham“-operisanih životinja. (K – intaktna kontrola; Sh – „Sham“-operisane; eve – everolimus; d – dan; * p <0,05, ** p <0.01 netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom).

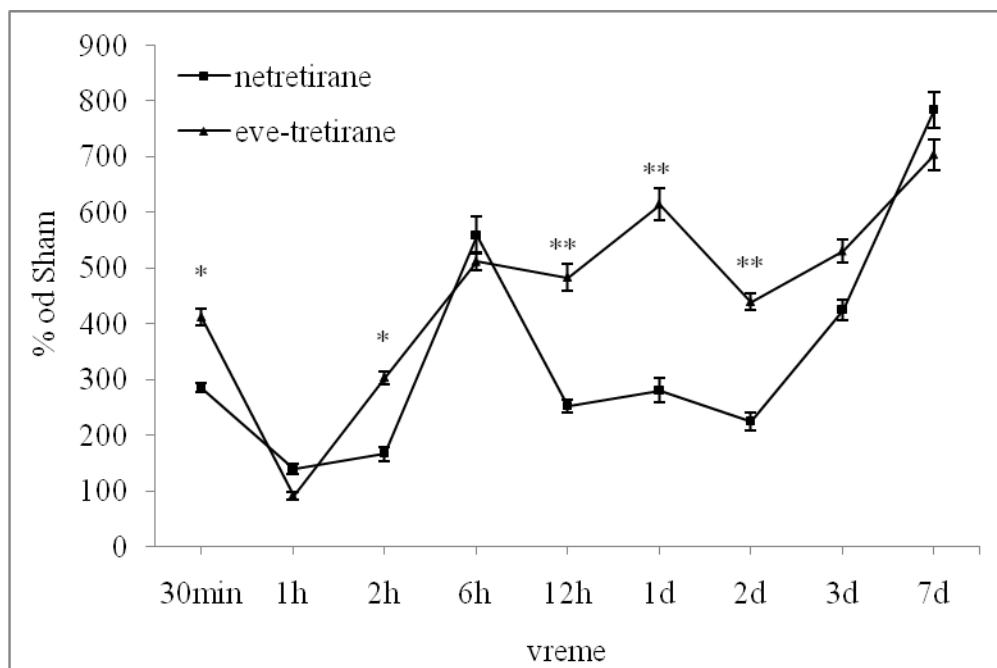
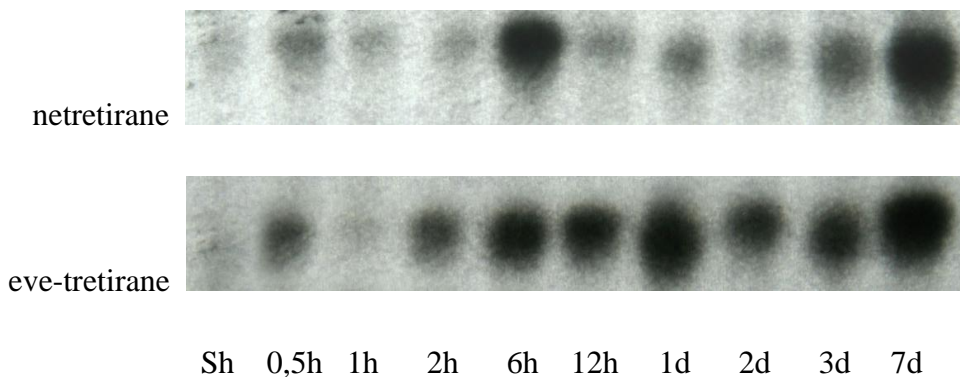
„Sham“-operisanih životinja ili intaktnih kontrola već 2 h posle indukcije I/R oštećenja, da bi posle 6 h reperfuzije ona bila značajno veća nego ekspresija I κ B α kod životinja tretiranih everolimusom ($p < 0,05$), ostajući do kraja perioda posmatranja značajno veća (Slika 26B). Normalizacija vrednosti ekspresije I κ B α kod životinja tretiranih everolimusom uočava se tek u period između 12 h i jednog dana nakon indukcije I/R oštećenja (Slika 26B).

4.13. Everolimus menja kinetiku vezivanja NF- κ B za DNK u I/R oštećenju bubrega

EMSA metod je urađen u cilju određivanja kinetike vezivanja NF- κ B za DNK. Netretirane životinje pokazuju cikličnu aktivnost NF- κ B sa „pikovima“ aktivnosti tj. vezivanja NF- κ B za DNK 30 min, 6 h, 3 dana i 7 dana nakon indukcije I/R oštećenja i između njih manju aktivnost vezivanja. Životinje tretirane everolimusom pokazuju povećano vezivanje NF- κ B za DNK u skoro svim vremenskim tačkama perioda observacije, pokazujući kontinuiranu aktivnost NF- κ B (Slika 27A i 27B). Kod životinja tretiranih everolimusom nakon inicijalnog porasta 30 min posle indukcije I/R oštećenja i pada aktivnosti vezivanja NF- κ B za DNK posle prvog sata reperfuzije, sledi dalji porast u aktivnosti vezivanja koji se održava između 6 h i 3 dana posle indukcije I/R oštećenja i nastavlja se i sedmog dana praćenja.

Životinje tretirane everolimusom pokazuju značajno veću aktivnost vezivanja NF- κ B za DNK 30 min i 2 h posle indukcije I/R oštećenja ($p < 0,05$), kao i u periodu od 12 h do 2 dana posle indukcije I/R oštećenja ($p < 0,01$) (Slika 27B).

A

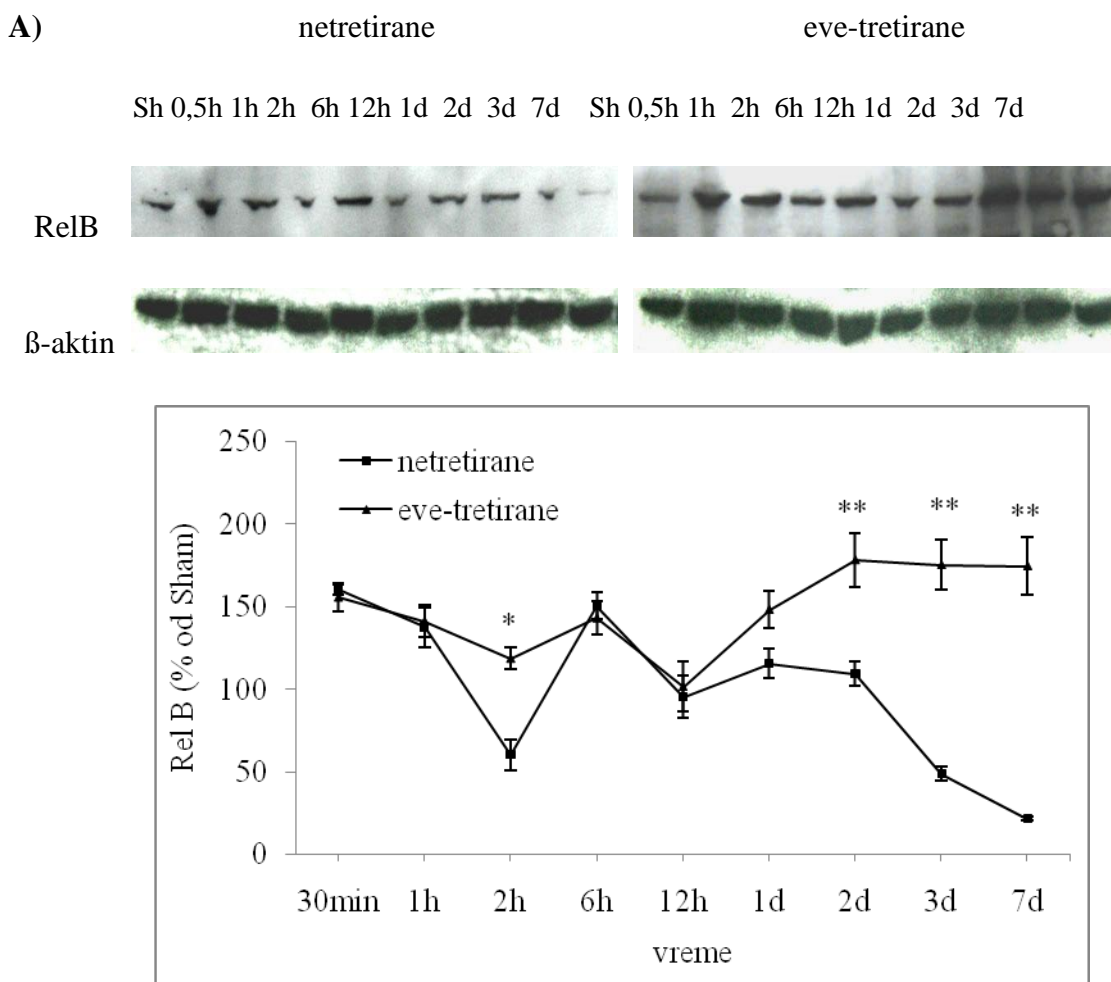


B

Slika 27. Aktivnost vezivanja NF- κ B za DNK u I/R oštećenju bubrega. (A) Reprezentativne autografije vezivanja NF- κ B za DNK određenog putem metoda EMSA u nuklearnoj ptoteinskoj frakciji tkiva bubrega nakon indukcije I/R oštećenja. (B) Denzitometrijska analiza vezivanja NF- κ B za DNK određena na autografijama 4 posebnih životinja za svaku vremensku tačku ispitivanja. Vrednosti su prikazane kao procenti aktivnosti vezivanja NF- κ B za DNK u „Sham“ grupi. (Sh – „Sham“-operisane; eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom)

4.14. Nuklearna ekspresija RelB u I/R oštećenju bubrega

U cilju ispitivanja aktivacije NF- κ B alternativnim putem, ispitana je ekspresija RelB u nuklearnoj proteinskoj frakciji tkiva bubrega putem Western blota. Uočiva je veća ekspresija RelB kod životinja tretiranih everolimusom, naročito u kasnoj fazi I/R oštećenja (Slika 28A).

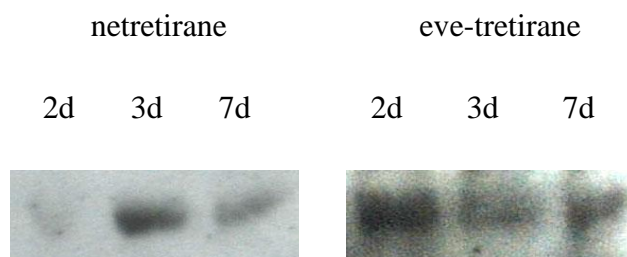


Slika 28. Ekspresija RelB u I/R oštećenju bubrega. (A) Reprezentativni imunoblotovi RelB određenih u nuklearnom proteinskom izolatu. Kao kontrola služio je β -aktin. (B) Densitometrijska analiza ekspresije RelB urađena je na 4 imunoblota i vrednosti su prikazane kao procenat od izmerene ekspresije kod „Sham“-operisanih životinja. (Sh – „Sham“-operisane; eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ netretirane u odnosu na tretirane everolimusom).

Denzitometrijska analiza pokazuje porast ekspresije RelB od prvog do sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja kod životinja tretiranih everolimusom, dok netretirane životinje pokazuju značajan pad nuklearne RelB ekspresije na skoro nedetektibilne nivoe sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja ($p < 0,01$) (Slika 28B). U ranom reperfuzionom periodu nije bilo značajnih razlika u ekspresiji RelB između eksperimentalnih grupa osim 2 h posle indukcije I/R oštećenja kada životinje tretirane everolimusom pokazuju značajno veću ekspresiju RelB ($p < 0,05$) (Slika 28B).

4.15. Nuklearna ekspresija p52 u I/R oštećenju bubrega

S obzirom da je p52 konstituent RelB/p52 heterodimera te da se može vezivati za DNK i u homodimernom obliku kada ostvaruje inhibiciju prethodnog transkripcionog dejstva NF- κ B, urađena je nuklearna ekspresija p52 počev od drugog dana posle indukcije I/R oštećenja ispitujući u kasnijim vremenskim tačkama reparacionu fazu I/R oštećenja. Uočava se konstantno prisutna ekspresija p52 kod životinja tretiranih everolimusom i skoro potpuno inhibirana ekspresija drugog dana posle indukcije I/R oštećenja kod netretiranih životinja (Slika 29).



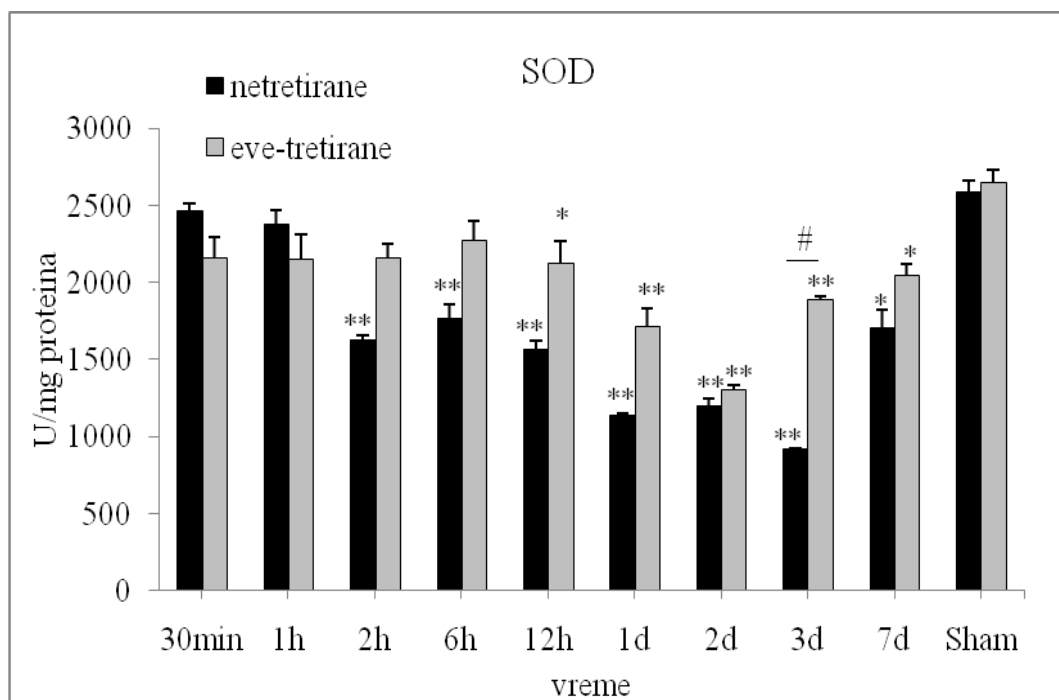
Slika 29. Reprezentativni imunoblotovi p52 određenih u nuklearnom proteinskom izolatu bubrega. (eve – everolimus; d – dan;).

4.16. Uticaj everolimusa na aktivnost enzima antioksidacione zaštite u I/R oštećenju bubrega

Merenjem aktivnosti enzima antioksidacione zaštite, koji su aktivirani u I/R oštećenju u cilju neutralizacije dejstva slobodnih kiseoničnih radikala, posredno dobijamo uvid u intenzitet oksidativnog stresa. Promene aktivnosti enzima antioksidantne zaštite pod uticajem everolimusa prikazane su na slikama 30 i 31.

4.16.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) i katalaze (CAT)

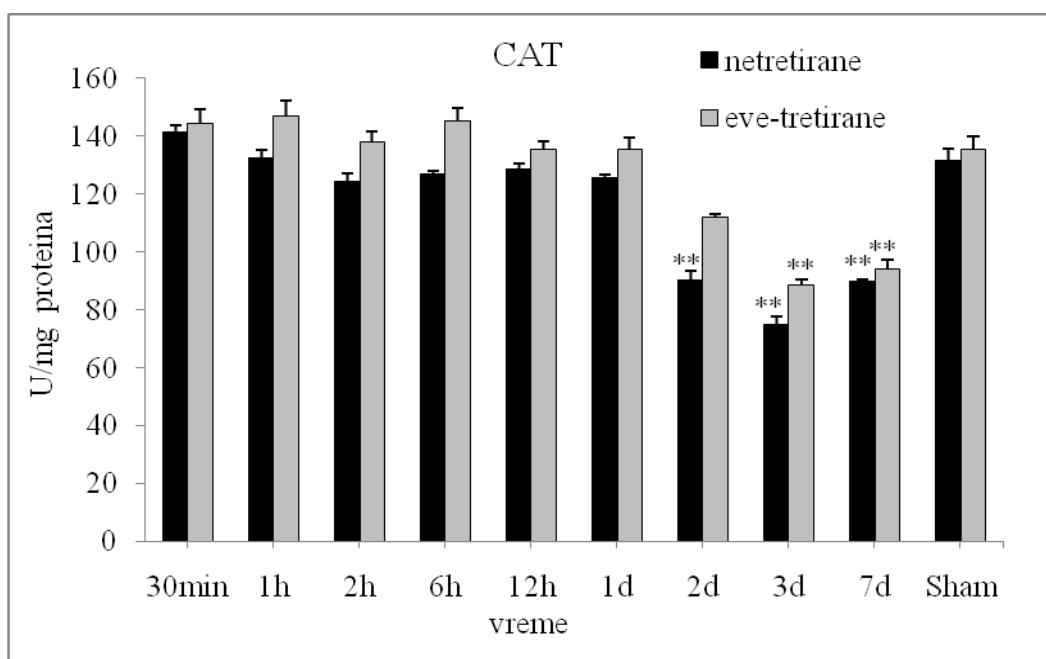
Netretirane životinje pokazuju raniji i izraženiji pad u SOD aktivnosti u odnosu na životinje tretirane everolimusom (Slika 28A).



Slika 30. Uticaj tretmana everolimusom na aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u I/R oštećenju bubrega miševa. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u odnosu na „Sham“ grupu; # $p < 0,01$, netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$).

Trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja netretirane životinje pokazuju najmanju SOD aktivnost koja je značajno manja od SOD aktivnosti izmerene tog dana u grupi životinja tretiranih everolimusom ($p < 0,01$). Značajan pad u aktivnosti SOD kod životinja tretiranih everolimusom u poređenju sa vrednostima izmerenim kod „Sham“-operisanih životinja detektuje se tek prvog dana posle indukcije I/R oštećenja i dostiže najmanje vrednosti drugog dana nakon indukcije I/R oštećenja ($p < 0,01$) (Slika 30).

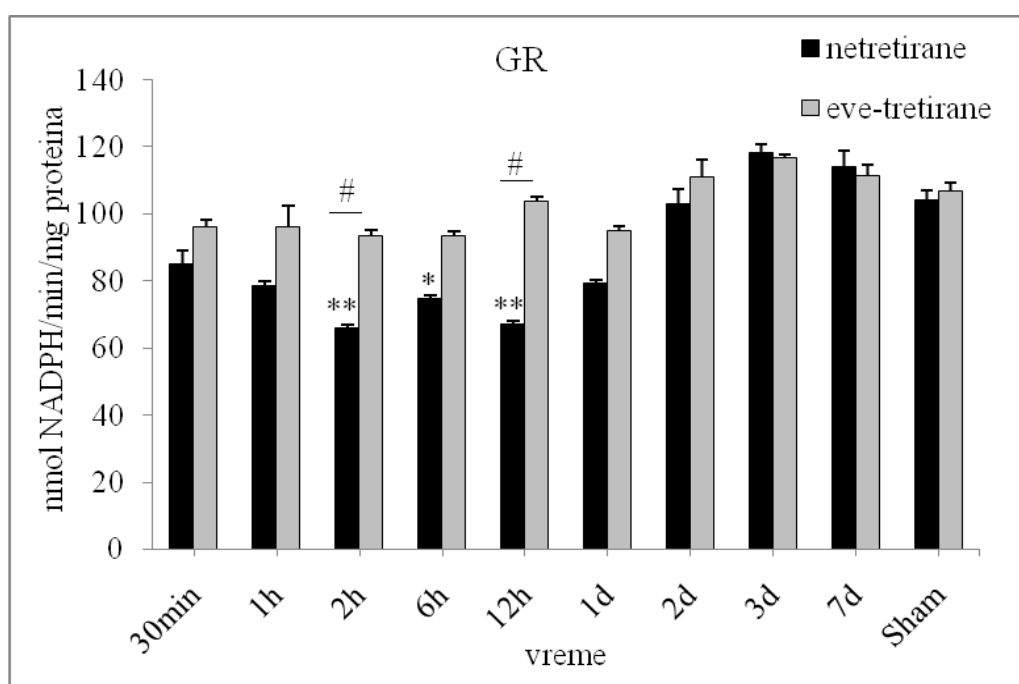
Smanjenje aktivnosti CAT, statistički značajno u poređenju sa „Sham“-operisanim životinjama, registruje se tek drugog dana posle indukcije I/R oštećenja ($p < 0,01$ za netretirane i $p < 0,05$ za životinje tretirane everolimusom) (Slika 31). Održavanje značajno smanjene aktivnosti uočava se do kraja opservacionog perioda ($p < 0,01$ za obe eksperimentalne grupe) bez značajnih razlika između eksperimentalnih grupa.



Slika 31. Uticaj tretmana everolimusom na aktivnost katalaze (CAT) u I/R oštećenju bubrega miševa. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; $**p < 0,01$ u odnosu na „Sham“ grupu; $n=7$).

4.15.2. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) i glutation peroksidaze (GSH-Px)

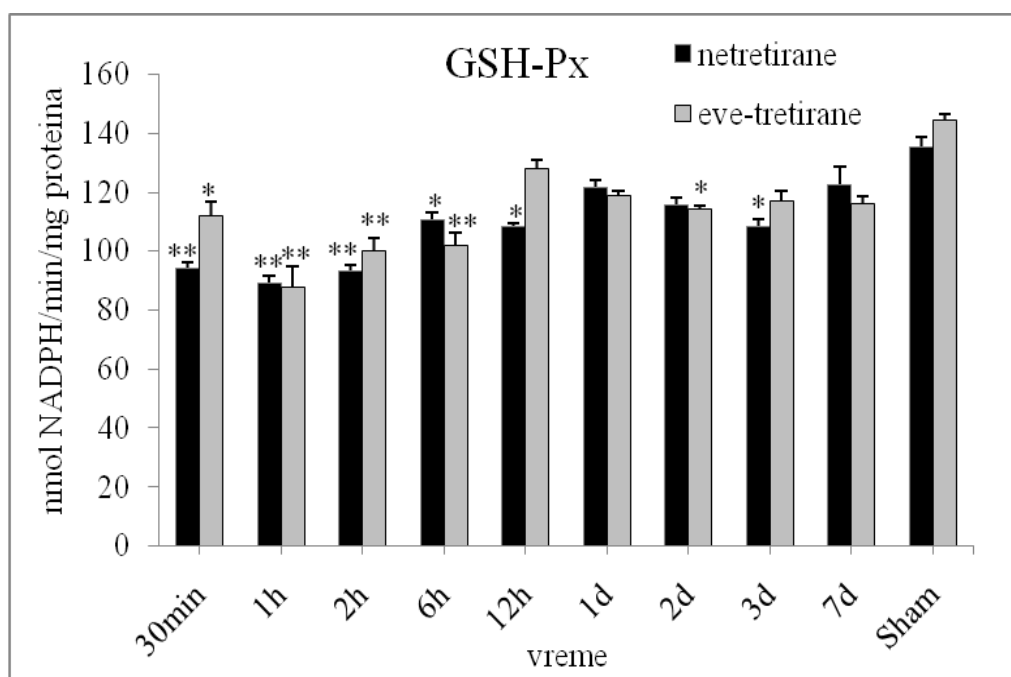
U poređenju sa „Sham“-operisanim životinjama značajan pad aktivnosti GR detektuje se u grupi netretiranih životinja počev od 2 h ($p < 0,01$) pa sve do 12 h posle indukcije I/R oštećenja (Slika 32). U navedenim vremenskim tačkama aktivnost GR je značajno niža i od aktivnosti GR detektovane u grupi životinja tretiranih everolimusom ($p < 0,01$). Tokom celog perioda ispitivanja nije uočen značajan pad aktivnosti GR u grupi životinja tretiranih everolimusom.



Slika 32. Uticaj tretmana everolimusom na aktivnost glutation-reduktaze (GR) u I/R oštećenju bubrega miševa. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u odnosu na „Sham“ grupu; # $p < 0,01$, netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$).

S obzirom da GR prevodi oksidovanu formu glutationa (GSSG) nastalog dejstvom GSH-Px u njegov redukovani oblik (GSH), to se pad aktivnosti ovog enzima očekuje nešto kasnije u odnosu na pad aktivnosti GSH-Px. Zaista, GSH-Px pokazuje

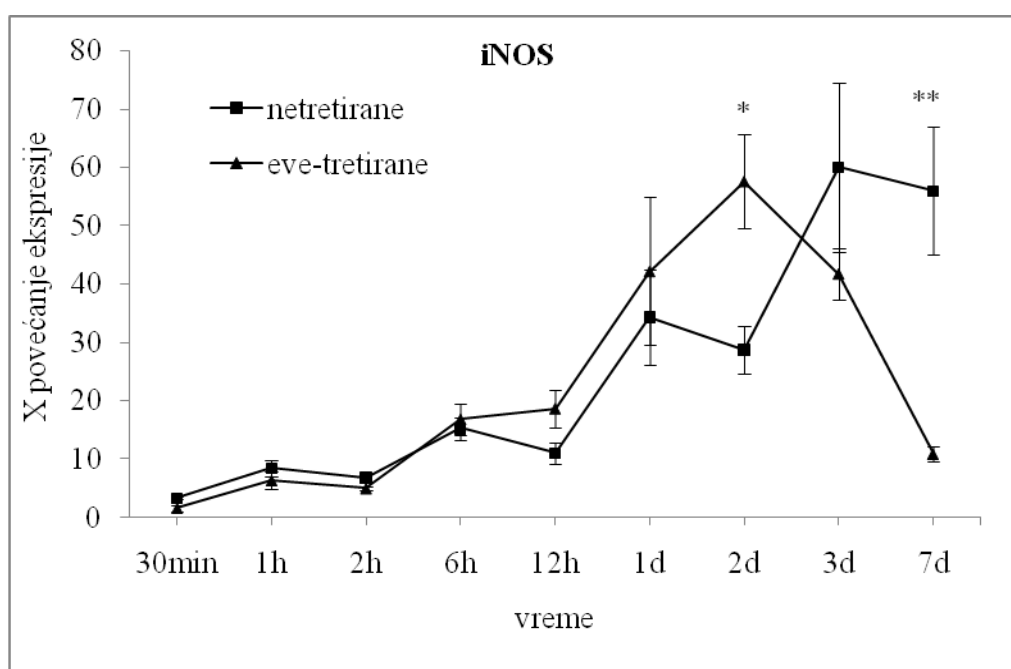
pad aktivnosti u obe eksperimentalne grupe u poređenju sa aktivnošću merenom u grupi Sham-operisanih životinja već 30 min posle indukcije I/R oštećenja ($p < 0,01$ za netretirane i $p < 0,05$ za životinje tretirane everolimusom) (Slika 33). Smanjena GSH-Px aktivnost održava se prvih 12 h reperfuzije u grupi netretiranih životinja i 6 h posle indukcije I/R oštećenja u grupi životinja tretiranih everolimusom. Posle početnog perioda sniženja aktivnosti GSH-Px sledi porast njegove aktivnosti u obe eksperimentalne grupe, a zatim ponovni pad aktivnosti u poređenju sa Sham-operisanim životinjama drugog dana posle indukcije I/R oštećenja kod životinja tretiranih everolimusom ($p < 0,05$) i trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja kod netretiranih životinja ($p < 0,05$).



Slika 33. Uticaj tretmana everolimusom na aktivnost glutacion-peroksidaze (GSH-Px) u I/R oštećenju bubrega miševa. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ u odnosu na „Sham“ grupu; $n=7$).

4.16. Produkcija iRNK za iNOS u I/R oštećenju bubrega

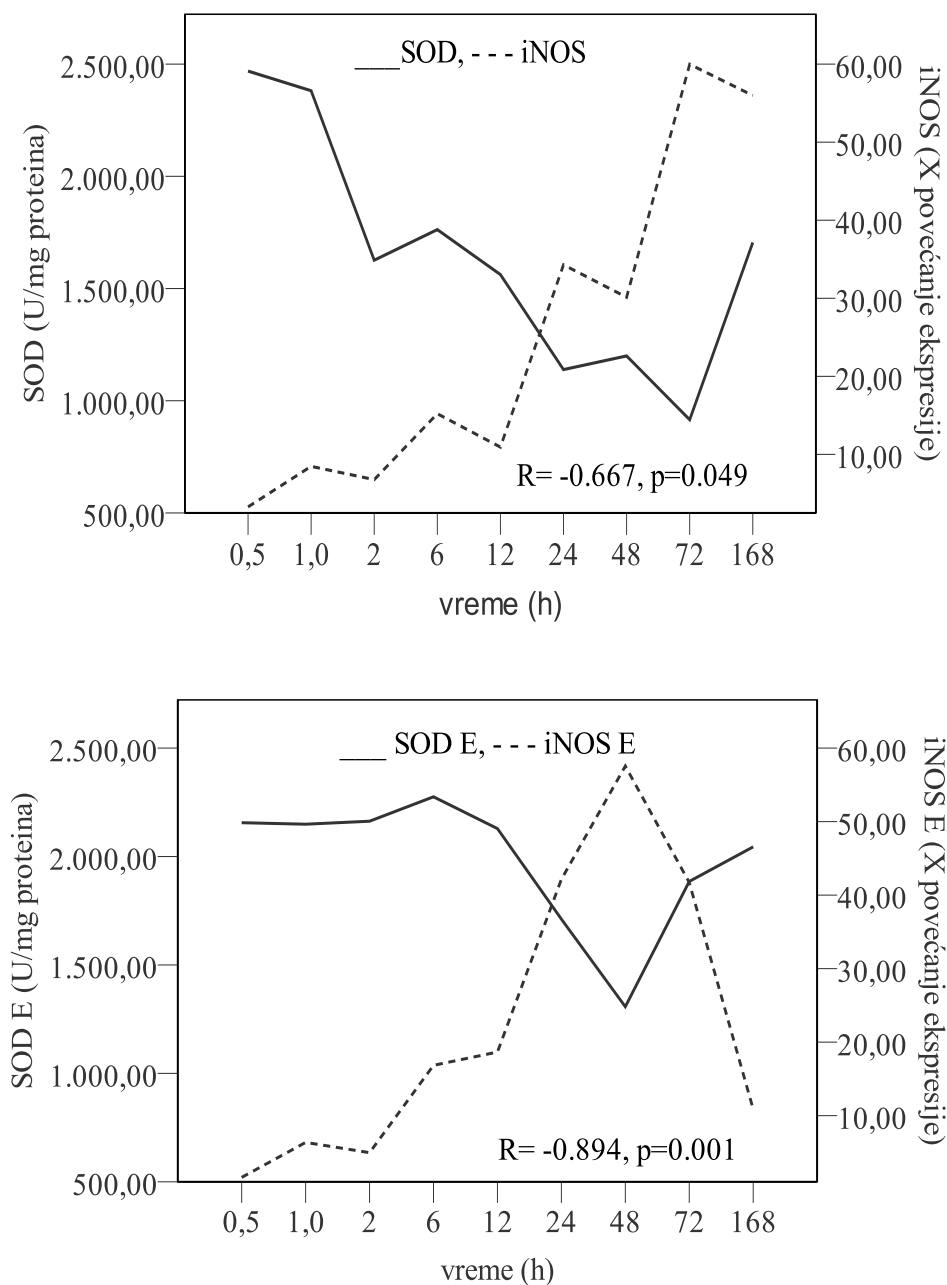
Putem metode kvantitativnog PCR-a kvantifikovana je ekspresija iRNK za iNOS u tkivu bubrega miševa s obzirom da prooksidativni intracelularni milje dovodi do povećane ekspresije inducibilne NO-sintaze (iNOS). Netretirane životinje pokazuju konstantan porast ekspresije iRNK za iNOS do kraja perioda ispitivanja (Slika 34). Životinje tretirane everolimusom pokazuju sličan trend u porastu ekspresije iRNK za iNOS do drugog dana posle indukcije I/R oštećenja, kada dostiže značajno veću vrednost u poređenju sa netretiranim životinjama ($p < 0,05$). (Slika 34).



Slika 34. Ekspresija iRNK za iNOS u I/R oštećenju bubrega miševa. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti povećanja ekspresije merene u odnosu na nivo ekspresije iRNK u „Sham“ grupi \pm SE. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ netretirane u poređenju sa tretiranim everolimusom; $n=7$)

Sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja ekspresija iRNK za iNOS kod životinja tretiranih everolimusom pokazuje skoro normalizovane vrednosti, značajno manje u odnosu na vrednosti detektovane u grupi netretiranih životinja ($p < 0,01$) (Slika

34). Negativna korelacija između ekspresije iRNK za iNOS i aktivnosti SOD nađena je u obe eksperimentalne grupe ($p < 0,05$, $R = -0,667$, za netretirane životinje; $p < 0,01$, $R = -0,894$ za životinje tretirane everolimusom) (Slika 35).



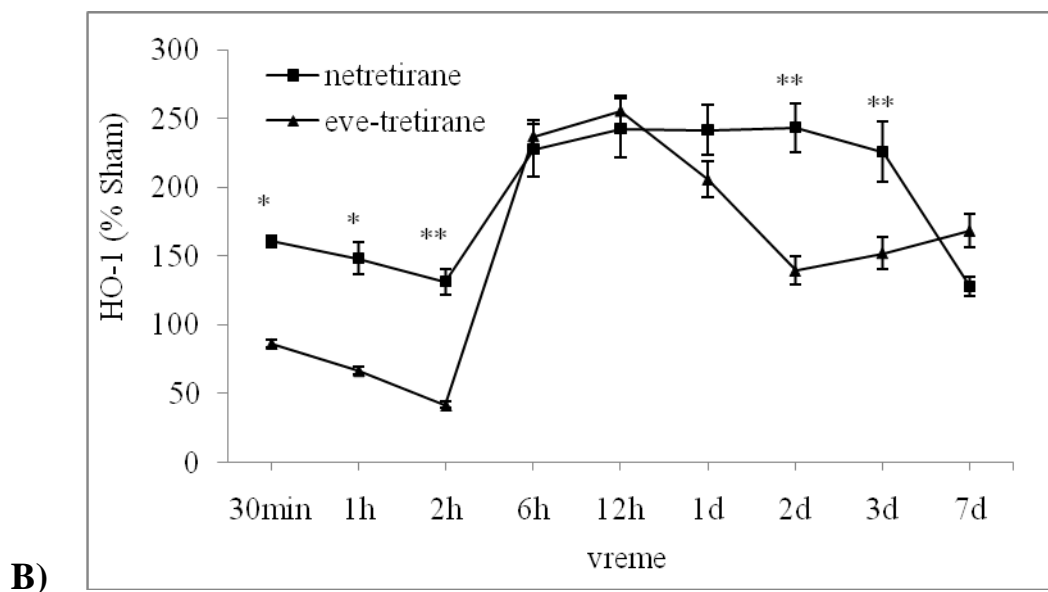
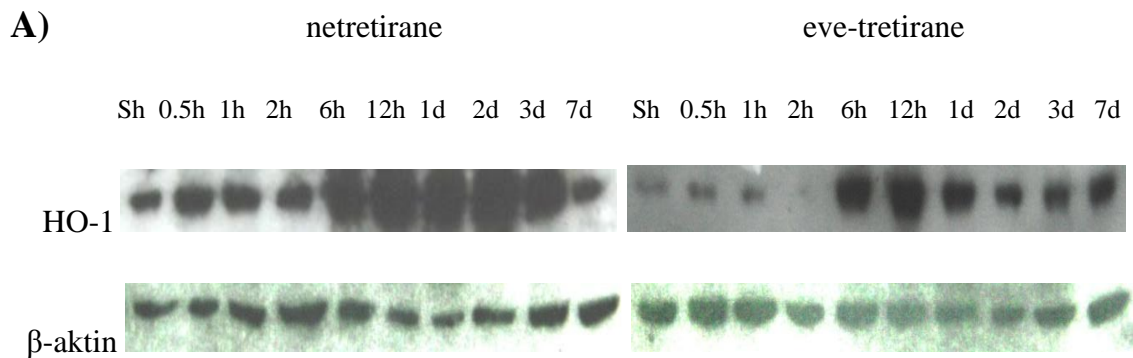
Slika 35. Uporedni prikaz aktivnosti SOD i ekspresije iRNK za iNOS kao i međusobne negativne korelacije. (E – everolimus).

4.17. Ekspresija hem oksigenaze-1 (HO-1) u I/R oštećenju bubrega

Važnu citoprotektivnu ulogu u I/R oštećenju igra hem oksigenaza-1 (HO-1), koja sem svojstva da smanji produkciju superoksidnog anjona, pokazuje i antiinflamatorno i antiapoptotsko dejstvo (146). Putem degradacije hema, HO-1 dovodi do produkcije CO koji utiče na očuvanje tkivne cirkulacije u toku reperfuzije (146). Uzevši u obzir citoprotektivno dejstvo HO-1, određena je ekspresija HO-1 u citoplazmatskoj frakciji proteina tkiva bubrega putem Western blota.

U grupi netretiranih životinja ekspresija HO-1 je umereno povećana u prvim reperfuzionim satima, da bi 6 h posle indukcije I/R oštećenja ekspresija HO-1 pokazala nagli porast i nastavila da raste kontinuirano do trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja (Slika 36A). Životinje tretirane everolimusom pokazuju smanjenje ekspresije HO-1 u ranim reperfuzionim satima ali već 6 sati posle indukcije I/R oštećenja, kao i kod netretiranih životinja, porast ekspresije HO-1 se detektuje sve do kraja perioda observacije (Slika 36A).

Denzitometrijska analiza pokazuje značajno veću ekspresiju HO-1 u grupi netretiranih životinja u poređenju sa nalazom HO-1 ekspresije kod životinja tretiranih everolimusom u prvom satu reperfuzije ($p < 0,05$), 2 h posle indukovanog I/R oštećenja ($p < 0,01$) i drugog i trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja ($p < 0,01$) (Slika 36B). Sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja životinje tretirane everolimusom pokazuju veću ekspresiju HO-1 u poređenju sa netretiranim životinjama, ali ta razlika nije statistički značajna.



Slika 36. Ekspresiju hem-oksigenaze 1 (HO-1) u I/R oštećenju bubrega u miševa.

(A) Prikaz reprezentativnih imunoblotova HO-1 netretiranih i životinja tretiranih everolimusom. (B) Denzitometrijska analiza imunoblotova HO-1 urađena je na odvojenim citoplazmatskim frakcijama 4 životinje za svaku vremensku tačku ispitivanja. Vrednosti ekspresije su prikazane u procentima u odnosu na vrednosti izmerene „Sham“ grupi. (eve – everolimus; d – dan; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, netretirane životinje u poređenju sa tretiranim everolimusom).

5. DISKUSIJA

U našem radu je uočeno da primena imunosupresiva mTOR inhibitora everolimusa utiče značajno na razvoj, tok i ishod inflamacije u bubrezima eksperimentalnih životinja nakon indukcije I/R oštećenja. Posledično, dolazi i do promena funkcije bubrega mereno vrednošću uree i kreatinina.

Eksperimentalni model I/R oštećenja pokazuje značajno smanjenje bubrežne funkcije kako kod netretiranih životinja, tako i kod životinja tretiranih everolimusom, ali kod životinja tretiranih everolimusom oporavak bubrežne funkcije kasni. Sedam dana posle indukcije I/R oštećenja vrednosti bubrežne funkcije kod životinja tretiranih everolimusom se ne razlikuju značajno od vrednosti izmerenih kako kod netretiranih životinja, tako i kod intaktnih kontrola i „Sham“-operisanih životinja. S obzirom da oporavak bubrežne funkcije kasni kod životinja tretiranih everolimusom, može se zaključiti da se posle trećeg dana oporavak bubrežne funkcije razvija brže nego kod netretiranih životinja. Uporedna analiza bubrežne funkcije i preživljavanja pokazuje da se sedmodnevni period može podeliti na dva perioda: prvi koji obuhvata period do prva 2-3 dana i drugi period do kraja praćenja. Ovakva podela je primenjiva i kada se prati patohistološki nalaz tkiva bubrega posle I/R oštećenja gde se u prva 2-3 dana vidi najveća nekroza tkiva sa inflamatornom reakcijom, nakon čega započinju regenerativne i reparativne promene uz mogućí razvoj fibroze (147). Najveća smrtnost se u obe grupe registruje drugog i trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja kada se uočavaju i najveće vrednosti uree i kreatinina i najveće oštećenje tkiva na patohistologiji. Životinje tretirane everolimusom imale su veću ukupnu smrtnost, ali se uporednom analizom preživljavanja nije našla značajna razlika. Ukoliko se izuzme jedan smrtni ishod uočen četvrtog dana posle indukcije I/R oštećenja samo u grupi netretiranih životinja, posle trećeg dana nije viđen nijedan smrtni ishod u obe eksperimentalne grupe. Može se zaključiti da je nešto nepovoljniji uticaj everolimusa uočen samo u ranoj, inflamatornoj fazi I/R oštećenja dok se u reparacionoj fazi očituje povoljan efekat everolimusa.

Analizirajući moguće uzroke ovakvog efekta, uočena je bifazna ekspresija iRNK za hemokine, kako u grupi netretiranih, tako i u grupi životinja tretiranih mTOR inhibitorom everolimusom, uz nalaz veće ekspresije iRNK za CCL3, CCL5 i CXCL10 u reparacionoj fazi kod netretiranih životinja. Tretman everolimusom nije promenio

značajno oblike ekspresije iRNK za hemokine CCL2, CCL3, CCL5 i CXCL10, ali je smanjio intenzitet njihove ekspresije.

Prvi „pik“ ekspresije iRNK za hemokine predstavlja sam početak rane faze koja se karakteriše zapaljenskom reakcijom u tkivu bubrega, i koja je u našem eksperimentalnom modelu pre svega reprezentovana značajnim prisustvom F4/80 pozitivnih ćelija i povećanom ekspresijom iRNK za proinflamatorne citokine. Drugi „pik“ ekspresije korelira sa krajem rane, inflamatorne faze i početkom faze reparacije oštećenog tkiva što daje jedno novo svetlo funkciji hemokina. U ranijim studijama uloga zapaljenja u I/R oštećenju je uglavnom ispitivana u prvih 24 do 72 h, potencirajući ne samo ulogu hemokina već i proinflamatornih citokina i ćelija zapaljenskog infiltrata (14, 68, 69, 76, 85, 86, 148, 149). Manji je broj radova koji prikazuje ulogu određenih hemokina i ćelija, naročito makrofaga, u patogenezi I/R oštećenju bubrega 7 i 14 dana nakon izazvane ishemije (75, 150). Ukoliko se ispitivanje hemokinske ekspresije obavi u kasnijoj fazi, tj. nakon prvih 48 h reperfuzije može se uočiti da postoji drugi „pik“ ekspresije hemokina. U našem radu je pokazano ponovno povećanje broja F4/80 pozitivnih ćelija trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja kojem delimično prethodi povećanje ekspresije iRNK za CCL3, a jednim delom i koincidira sa drugim „pikom“ ekspresije iRNK za CCL2. Postavlja se pitanje porekla F4/80 pozitivnih ćelija. Ranije se smatralo da je to bio marker makrofaga, ali je jasno pokazano da se on nalazi i na dendritskim ćelijama koje su inače prisutne u tkivu zdravog bubrega (151). Fenotipska determinacija ćelija mononuklearno/fagocitnog sistema je prilično komplikovana i za sada nedovoljno jasna ukazujući na prisustvo heterogenih populacija. Monociti u krvi predstavljaju heterogenu grupu ćelija koje su prekursori tkivnih makrofaga i dendritskih ćelija. Mikrookolina unutar tkiva igra ključnu ulogu u određivanju fenotipa t.j. polarizacije ka makrofagima ili dendritskim ćelijama i promenama njihovog fenotipa u zavisnosti od promena uslova mikrookoline kao što je na primer prisustvo inflamacije i menjanje njenog toka i intenziteta (152). S obzirom da je značajno povećanje broja F4/80 pozitivnih ćelija u tkivu bubrega već u prvim satima nakon indukcije I/R oštećenja asocirano sa povećanom ekspresijom iRNK za CCL2 i CCL3, te da je migracija monocita/makrofaga u inflamirano tkivo delom posredovana preko CCR2, receptora za CCL2 (152), može se indirektno zaključiti da značajno povećan broj F4/80 pozitivnih ćelija koji je uočen predstavlja makrofage. Veća

ekspresija CCL2 i CCL3 u ranim satima reperfuzije kod netretiranih životinja je asocirana i sa većim brojem makrofaga u odnosu na životinje tretirane everolimusom. Veći broj F4/80 pozitivnih ćelija u tkivu bubrega u grupi netretiranih životinja u odnosu na životinje tretirane everolimusom se održava do kraja ispitivanja tj. sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja, ali broj F4/80 pozitivnih ćelija kod životinja tretiranih everolimusom se ne razlikuje značajno od broja F4/80 pozitivnih ćelija uočenog kod „Sham“-operisanih životinja. U radu Stroo i saradnika pokazano je takođe u mišjem modelu I/R oštećenja da postoji bifazna ekspresiju hemokina sa značajnom infiltracijom makrofaga sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja (153).

Za makrofage se veruje da igraju dvostruku ulogu u I/R oštećenju bubrega, kako proinflamatornu, tako i reparatornu. U ranoj fazi I/R oštećenja bubrega njihova infiltracija je uglavnom posredovana putem receptora CCR1, CCR2 i CX3CR1. Makrofagi u toj fazi učestvuju u zapaljenskom procesu i oštećenju tkiva produkujući proinflamatorne citokine kao što su TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-12, favorizujući Th1 profil imunskog odgovora. Miševi kojima je genetskom manipulacijom uklonjen gen za CCR2 („*knock-out*“ za CCR2) imaju manji broj infiltrišućih F4/80 pozitivnih ćelija i značajno manji stepen akutne tubulske nekroze (76, 148). Davanje u ranoj fazi I/R oštećenja bubrega antagonista za CCL2 koji predstavlja jedan od najpotentnijih hemokina za monocitno/makrofagnu liniju, u ranijoj nomenklaturi nazivan monocitno hemotaktički protein-1 („*monocyte chemotactic protein-1*“ – MCP-1), pokazalo se uspešnim u terapiji I/R oštećenja bubrega a rezultiralo je smanjenom infiltracijom CCR2 pozitivnih makrofaga (148). Za razliku od CCR2, miševi koji su „*knock-out*“ za CCR1 pokazuju značajno manju infiltraciju makrofaga u I/R oštećenju bubrega miševa, ali se to nije odrazilo i na značajno bolju funkciju bubrega niti na značajno manji stepen tubulske nekroze. Pokazano je da preko aktivacije CCR1 makrofagi produkuju CCL3 i CCL5 što amplifikuje nov influks makrofaga u tkivo, ukazujući na pozitivnu povratnu spregu CCR1 zavisne infiltracije makrofaga u oštećeno tkivo bubrega (75).

Prvi „pik“ ekspresije iRNK za hemokine je bio između drugog i šestog sata reperfuzije sa izuzetkom CCL3, liganda za CCR1, kod koga je „pik“ uočen već 30 min nakon indukcije I/R oštećenja. Šest sati kasnije ekspresija iRNK za hemokine značajno pada i održava se niskom sve do drugog i trećeg dana reperfuzije kada ponovo raste u

obe eksperimentalne grupe, što korelira sa novim influksom makrofaga. Drugog i trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja beleži se i porast ekspresije iRNK za ostale ispitivane hemokine uz napomenu da je ta ekspresija samo za CCL2 značajno veća kod netretiranih životinja u odnosu na životinje tretirane everolimusom. Treći „pik“ ekspresije iRNK za CCL3, CCL5 i CXCL10 se u grupi netretiranih životinja javlja u jasno definisanoj reparacionoj fazi, sedmog dana nakon indukcije I/R oštećenja. Održavanje značajno veće ekspresije iRNK za CCL3, CCL5 i CXCL10 u kasnoj, reparacionoj fazi I/R oštećenja samo u grupi netretiranih životinja korelira sa održavanjem povećanog broja makrofaga u tkivu bubrega koje mogu biti izvor produkcije navedenih hemokina.

CXCL10 mogu da produkuju monociti/makrofagi, endotelne ćelije, fibroblasti. Pokazano je da CXCL10 kojeg produkuju makrofagi učestvuje u procesima reparacije tako što suprimira ekscesivnu proliferaciju tubularnih epitelnih ćelija (154). CXCL10 pored hemotaktičkog dejstva na T-limfocite i makrofage, pokazuje i angiostatski efekat (155, 156). Pokazano je da CXCL10 ispoljava suprotan efekat angiogenom dejstvu TGF- β , učestvujući tako u efikasnoj regeneraciji i utičući na process remodeliranja srčanog tkiva nakon ishemijskog oštećenja (157). Receptor za CXCL10 je CXCR3 i može se naći kako na aktiviranim Th1 ćelijama, tako i na makrofagima i manjim delom na endotelnim ćelijama, a njegovom aktivacijom se podstiče zapaljenska reakcija i razvoj Th1 odgovora (158, 159). Već je pokazano da su „*knock-out*“ miševi za CXCR3 koji su podvrgnuti I/R oštećenju bubrega imali u poređenju sa divljim tipom miševa bolje preživljavanje, manji porast serumskog kreatinina, manji zapaljenski infiltrat i manji stepen tubulske nekroze (149). U obe grupe životinja nije uočena povećana ekspresija CXCR3 sve do sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja kada se uočava porast ekspresije iRNK za CXCR3 koji je značajno veći u grupi netretiranih životinja.

S obzirom da u našem eksperimentalnom modelu imunohistohemijsko bojenje na CD3 marker nije pokazalo značajno prisustvo T-limfocita u tkivu bubrega tokom celog perioda ispitivanja, može se indirektno zaključiti da uočena povećana ekspresija CXCR3 sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja pripada makrofagima i delom endotelnim ćelijama. Uočen fenomen verovatno predstavlja homeostazni mehanizam u reparaciji tkiva u kojem makrofagi imaju značajnu ulogu implicirajući različite uloge

makrofaga i fenotipske polarizacije u zavisnosti od lokalne sredine (160, 161). Na osnovu fenotipskih markera do sada je diferencirano tri tipa makrofaga, M1, M2, M3, od kojih je M1 tip proinflammatory, M2 tip antiinflammatory dok M3 tip učestvuje u procesima reparacije i remodelovanja tkiva, ali su mogući i međutipovi (162, 163).

U kasnoj, reparacionoj fazi I/R oštećenja makrofagi mogu dodatno štetno ili pozitivno uticati na krajnji ishod učestvujući kako u razvoju fibroze i značajnoj produkciji ekstracelularnog matriksa sa tkivnim remodelovanjem, tako i u produkciji određenih faktora rasta. Pokazano je da je adoptivni transfer makrofaga u regenerativnoj fazi I/R oštećenja uticao ne samo na bolje očuvanje tkiva već i na povećanje stepena regeneracije (164). Sprovođenje različitih procedura u ranoj fazi I/R oštećenja ima za cilj promenu broja i funkcije makrofaga u reparacionoj fazi I/R oštećenja. Ukoliko se nakon indukcije I/R oštećenja da liposomalni klodronat, supstanca koja dovodi do deplecije makrofaga, dolazi do znatno sporijeg oporavka funkcije bubrega i dužeg trajanja procesa reparacije oštećenog tkiva (165). Suprotan efekat tj. povoljan uticaj smanjenog broja makrofaga na ishod I/R oštećenja pokazan je kod životinja kojima je u ranoj fazi I/R oštećenja divan antagonist za CCL2 (166) .

Makrofagi koji se uočavaju u reparacionoj fazi imaju antiinflammatory fenotip (M2) a funkcionalno se karakterišu time da nakon aktivacije proizvode ekstracelularni matriks i antiinflammatory citokine kao što su IL-10 i TGF- β . Isto tako TGF- β utiče da se makrofagi diferenciraju u tip M2. Povećana produkcija TGF- β i faktora rasta kojeg proizvode trombociti („platelet derived growth factor“ – PDGF) podstiče fibrozu što u krajnjem ishodu dovodi do smanjenja funkcije organa. Furuichi i koautori su pokazali da je blokada CX3CR1, receptora za fraktalkin CX3CL1, dovela ne samo do smanjenja infiltracije makrofaga već i do smanjenja fibroze tkiva bubrega (150). Ekspresija iRNK za TGF- β u našem eksperimentalnom modelu značajno raste u reparacionoj fazi I/R oštećenja u grupi netretiranih životinja, za razliku od životinja tretiranih everolimusom kod kojih je skoro potpuno inhibirana njena ekspresija.

TGF- β je citokin kojeg mogu sintetisati skoro svi tipovi ćelija i osim svog profibrotskog efekta pokazuje i proapoptozna svojstva, ali može i da stimuliše epitelno-mezenhimalnu tranziciju (167). Pokazana je povećana ekspresija TGF- β kao i receptora za TGF- β u regenerišućim tubularnim epitelnim ćelijama nakon I/R oštećenja (168,

169). To bi moglo značiti da izvor TGF- β u našem eksperimentalnom modelu sem makrofaga mogu biti i regenerišuće tubularne epitelne ćelije. Ukoliko su infiltrišući makrofagi glavni izvor produkovanog TGF- β sedmog dana reperfuzije u našem eksperimentalnom modelu, može se indirektno zaključiti da se različita makrofagna polarizacija odigrava kod netretiranih u odnosu na životinje tretirane everolimusom, te da je moguć i kasniji razvoj fibroze kod netretiranih životinja. Obrnuto, ukoliko su regenerišuće tubularne epitelne ćelije glavni izvor produkcije TGF- β , onda je smanjeni stepen regeneracije tubularnih epitelnih ćelija koji se očekuje u grupi životinja tretiranih everolimusom na osnovu prethodno iznetih podataka iz radova drugih autora, u korelaciji sa smanjenom ekspresijom TGF- β . Radi preciznijeg tumačenja neophodno je uraditi dodatna imunohistohemijska bojenja u cilju identifikacije izvora TGF- β , stepena fibroze i stepena proliferacije, odnosno regeneracije tubularnih epitelnih ćelija kao i dalju analizu ekspresije iRNK za TGF- β u kasnijem periodu nakon 2-4 nedelje.

Analiza ekspresije drugog antiinflamatornog citokina IL-10 pokazuje takođe dva „pika“ ekspresije u ranom periodu I/R oštećenja sa kasnijim održavanjem nešto veće ekspresije u grupi netretiranih životinja sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja, te se stiče utisak da je kriva ekspresije IL-10 odgovor na prethodnu produkciju i dejstvo proinflamatornih citokina. IL-10 inhibira ranu fazu inflamacije blokirajući produkciju brojnih hemokina, proinflamatornih citokina, ekspresiju adhezivnih molekula i aktivacije makrofaga i neutrofila. Luče ga T-limfociti i makrofagi. U radu Denga i autora pokazano je da egzogeno dodavanje IL-10 inhibira ekspresiju iRNK za ICAM-1, TNF- α i iNOS i smanjuje oštećenja bubrega u mišjem modelu I/R oštećenja i akutnog oštećenja bubrega uzrokovanog dejstvom cisplatina (170). U istom radu je pokazano da je IL-10 značajno smanjio i ekspresiju markera apoptoze dokazane imunohistohemijskim TUNEL bojenjem kao i markera progresije u ćelijskom ciklusu, nuklearnog antigena proliferišućih ćelija („*proliferating cell nuclear antigen*“ – PCNA). Miševi tretirani anti-IL10 antitelima u modelu I/R oštećenja pokazuju značajno veće oštećenje bubrežne funkcije izražene vrednošću uree u serumu u odnosu na kontrolnu grupu životinja podvrgnutih samo I/R oštećenju, dok se u njihovim bubrezima nalazi povećana ekspresija TNF- α , zapaljenska reakcija i indeks apoptoze (171). U istom radu je detektovana i povećana ekspresija iRNK za IL-10 u bubrezima miševa povrgnutih I/R oštećenju, što je pokazano i u našem radu.

Ukoliko se TNF- α shvati kao jedan od glavnih proinflamatornih citokina, onda je i povećana ekspresija iRNK za IL-10 logičan odgovor antiinflamatornih mehanizama. U reparatornoj fazi I/R oštećenja ekspresija iRNK za IL-10 nije takvog intenziteta kao u inflamatornoj fazi, ali je ipak veća u grupi netretiranih životinja, što može biti posledica makrofagne polarizacije u pravcu M2 tipa. Istovremeno, životinje tretirane everolimusom ne pokazuju povećanje produkcije iRNK za IL-10 što može biti posledica smanjene makrofagne produkcije IL-10 pod uticajem mTOR inhibicije, kako je već pokazano u radovima drugih autora (118, 172). Mišji i humani makrofagi pod uticajem mTOR inhibitora sirolimusa nakon stimulacije lipopolisaharidom (LPS) značajno smanjuju produkciju IL-10 a povećavaju produkciju IL-12 (117, 121). mTOR inhibicija štiti miševе od infekcije *Listeriom monocytogenes* tako što podstiče makrofage da produkuju IL-12, IL-23, TNF- α i IL-6 (118). Povećana makrofagna produkcija TNF- α pod dejstvom mTOR inhibitora sirolimusa se ostvaruje posredstvom povećane aktivnosti transkripcionog faktora NF- κ B, dok je smanjena produkcija IL-10 posledica smanjene aktivnosti STAT3 (118, 121).

U našem radu je uočena bimodalna ekspresija iRNK za TNF- α . Prvi „pik“ ekspresije javlja se u prvim reperfuzionim satima u obe grupe i značajno je veći u samom početku reperfuzije kod životinja tretiranih everolimusom. Ponovni porast iRNK za TNF- α se uočava prvog, drugog i trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja pri čemu drugog dana nakon indukcije I/R oštećenja on dostiže najveću vrednost u grupi životinja tretiranih everolimusom, što korelira sa značajno povećanim indeksom tubulointersticijskog oštećenja tj. stepenom nekroze/apoptoze. Netretirane životinje pokazuju značajno veću ekspresiju iRNK za TNF- α u odnosu na životinje tretirane everolimusom jedino prvog dana posle indukcije I/R oštećenja. Pokazano je da u uslovima ishemije tubularne epitelne ćelije povećavaju produkciju TNF- α što dovodi do TNF- α -zavisne apoptoze (171, 173), te se indirektno može zaključiti da su pored makrofaga i tubularne epitelne ćelije izvor TNF- α .

Slična situacija se može uočiti i kod ekspresije iRNK za IL-1 β . Životinje tretirane everolimusom pokazuju značajno veću ekspresiju iRNK za IL-1 β u ranim reperfuzionim satima, kao i drugog dana posle indukcije I/R oštećenja. Izvor produkcije IL-1 β mogu biti kako tubularne epitelne ćelije tako i infiltirajući makrofagi. Pokazano je

da se u uslovima mTOR inhibicije aktivira kaspaza-1 koja oslobađa IL-1 β (172). U našem radu nije određivana koncentracija bioaktivnog proteina IL-1 β već je dokazana povećana transkripcija tj. sinteza iRNK za IL-1 β u uslovima m-TOR inhibicije, što je moguće posledica dokazane povećane aktivnosti NF- κ B. Činjenica koja se ne može zanemariti je povećani stepen apoptoze/nekroze u grupi životinja tretiranih everolimusom koji korelira sa povećanom ekspresijom iRNK za TNF- α i IL-1 β . Zaista, ćelije u procesu umiranja mogu da aktiviraju urođenu imunost i sterilni inflamatorni odgovor aktivirajući Nlrp 3 inflamazome što rezultuje povećanim oslobađanjem IL-1 β (174). Međutim, kako je već naglašeno, drugog dana posle indukcije I/R oštećenja, nismo registrovali značajnu makrofagnu infiltraciju te se tubularne epitelne ćelije nameću kao glavni izvor povećane sinteze IL-1 β a ne makrofagi. To je i pokazano u radu Wu i koautora gde je uočeno da je aktivacija proinflamatornog fenotipa tubularnih epitelnih ćelija preko TLR-4 jedan od ključnih fenomena u razvoju I/R oštećenja u bubrezima (73). Tubularne epitelne ćelije se preko aktiviranih TLR-4 javljaju kao značajan izvor proinflamatornih citokina i hemokina a samim tim i regulatora inflamatornog odgovora u bubrezima u toku I/R oštećenja (73, 175). Tubularne epitelne ćelije kojima nedostaje TLR-4 su zaštićene i od procesa apoptoze, a miševi koji imaju kompetentne leukocite i tubularne epitelne ćelije bez TLR-4 pokazuju znatno manji stepen oštećenja bubrega u I/R oštećenju nego što to pokazuju miševi na čijim tubularnim epitelnim ćelijama se može naći TLR-4 ekspresija, ali na leukocitima nedostaju TLR-4 (73).

Prethodno navedene činjenice ukazuju na potencijal mTOR inhibicije u kreiranju proinflamatornog miljea koji se ogleda u sposobnosti aktivacije urođene imunosti, što je poželjan efekat u antitumorskoj odbrani. Sa druge strane mTOR inhibitori kočće sazrevanje dendritskih ćelija, važnih inicijatora stečenog imunskog odgovora. Moguće je i da je manji broj F4/80 pozitivnih ćelija u reparacionoj fazi I/R oštećenja bubrega kod životinja tretiranih everolimusom posledica smanjenog prisustva aktiviranih dendritskih ćelija, ali je neophodno specifično bojenje na CD11c marker u cilju preciznijeg određivanja broja dendritskih ćelija.

Imunosupresivne efekte mTOR inhibitori ostvaruju blokadom ili aktivacijom različitih sekundarnih glasnika, među kojim se nalazi i NF- κ B. U našem radu smo

definitivno pokazali u proteinskom nuklearnom izolatu tkiva bubrega miševa tretiranih everolimusom povećanu aktivnost NF- κ B koja u stvari znači povećano vezivanje NF- κ B za specifični, promoterski region genoma. Kriva aktivnosti pokazuje konstantan porast aktivnosti NF- κ B nakon drugog sata reperfuzije u grupi životinja tretiranih everolimusom, za razliku od životinja koje nisu bile tretirane everolimusom i kod kojih je takođe pokazano povećano vezivanje NF- κ B za genom, ali sa jasno izdvojenim „pikovima“, pokazujući cikličnu aktivnost. U brojnim radovima je pokazana povećana aktivnost NF- κ B u I/R oštećenju bubrega, kao i pozitivan uticaj blokade aktivnosti NF- κ B na ishod I/R oštećenja mereno oporavkom bubrežne funkcije, histopatološkim promenama i parametrima zapaljenske reakcije (36, 37, 43, 176, 177, 178). Kao što je već rečeno u uvodu, NF- κ B je jedan od ključnih transkripcionih faktora koji učestvuje u regulaciji zapaljenja i mogu ga aktivirati slobodni kiseonični radikali, endogeni ligandi za TLR, IL-1 β , TNF- α . Važi i obratno, tj. NF- κ B povećava transkripciju gena za TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL2, CCL5, iNOS, ICAM-1 itd.

Kao dokaz klasičnog puta aktivacije NF- κ B ispitivana je ekspresija fosfo-I κ B α u citoplazmatskoj proteinskoj frakciji. Denzitometrijskom analizom se nalazi slična kriva u obe eksperimentalne grupe sa dva izraženija „pika“ ekspresije; prvog dana i trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja. U periodu od 6 h do prvog dana nakon indukcije I/R oštećenja, beleži se konstantan porast u ekspresiji fosfo-I κ B α . Bez obzira što je u međusobnom poređenju nađena u određenim vremenskim tačkama statistički značajno veća ekspresija kod životinja koje nisu bile tretirane everolimusom, može se reći da su i životinje tretirane everolimusom imale značajno veću ekspresiju u odnosu na Sham-operisane životinje i intaktnu kontrolu. Mereno ekspresijom p65 u nuklearnoj proteinskoj frakciji životinje tretirane everolimusom pokazuju značajno veću translokaciju p65 u jedro u toku prva dva sata reperfuzije kao i drugog dana posle indukcij I/R oštećenja. Važno je napomenuti da značajno veća nuklearna ekspresije p65 i vezivanje NF- κ B za DNK kod životinja tretiranih everolimusom drugog dana nakon indukcije I/R oštećenja koincidira sa nalazom najvećeg tubulointercijumskog oštećenja i povećane ekspresije iRNK za TNF- α . Nasuprot njima, netretirane životinje ne pokazuju jasnu asociranost translokacije p65 u jedro sa povećanom ekspresijom iRNK za TNF- α s obzirom da se uočava povećana nuklearna ekspresija p65 i trećeg i sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja kada ekspresija iRNK za TNF- α značajno

pada. Moguće objašnjenje treba tražiti u složenoj dinamici i regulaciji aktivnosti transkripcionih faktora NF- κ B familije koja je dodatno modifikovana mTOR inhibicijom. Istovremenim praćenjem intenziteta aktivnosti vezivanja NF- κ B i nuklearne translokacije p65 ne nalazi se u svim vremenskim tačkama pozitivna korelacija, što ukazuje i na aktivnosti drugih komponenti NF- κ B. Diskrepanca se naročito uočava trećeg i sedmog dana nakon indukcije I/R oštećenja kada se kod životinja tretiranih everolimusom beleži pad u nuklearnoj ekspresiji p65 uz istovremeni porast aktivnosti vezivanja NF- κ B za DNK. Može se zaključiti da postoji i alternativni put aktivacije NF- κ B u našem eksperimentalnom modelu I/R oštećenja, koja je pokazana izmerenom povećanom ekspresijom RelB u nuklearnoj frakciji kod životinja tretiranih everolimusom u reparatornoj fazi I/R oštećenja.

Složena dinamika promena aktivnosti NF- κ B i njegovih specifičnih komponenti ukazuje na prilično kompleksnu ulogu NF- κ B. Većina dosadašnjih radova se bavila ispitivanjem aktivnosti NF- κ B i uticajem inhibicije aktivnosti NF- κ B na ishod I/R oštećenja bubrega merenjem ekspresije komponenti NF- κ B familije transkripcionih faktora, intenziteta vezivanja NF- κ B za DNK, stepena oštećenja tkiva i zapaljenja, ali uglavnom ispitujući prvi dan nakon indukcije I/R oštećenja (43, 176, 178). Zaključak u svim navedenim eksperimentalnim studijama je da inhibicija NF- κ B aktivnosti smanjuje intenzitet zapaljenja i tubularnog oštećenja.

U našem radu je praćen period od sedam dana, jasno pokazujući aktivaciju NF- κ B i translokaciju u jedro aktiviranjem i klasičnog i alternativnog puta, kako u ranoj tako i u kasnoj reparacionoj fazi. Talasi NF- κ B aktivnosti određuju različite vremenski kodirane molekularne profile sa različitim funkcijama. Kako je već naglašeno u uvodu rada, u različitim vremenskim tačkama aktivira se transkripcija različitih gena u zavisnosti od vrste i koncentracije hetero ili homodimera koji pripada NF- κ B familiji, dužini njegovog delovanja, prisutnih koaktivatora, korepresora, posttranslacione modifikacije koja obuhvata fosforilaciju i acetilaciju uglavnom p65 i hromatinske modifikacije koja određuje pristup specifičnim, prepoznatljivim κ B motivima u promoterskom regionu, kao i od prisutnosti drugih transkripcionih faktora koji su nastali u unakrsnom razgovoru drugih signalnih puteva aktiviranih stimulusom koji je aktivirao i NF- κ B (54). Rani geni koji su aktivirani dejstvom NF- κ B su negativni

regulatori NF- κ B aktivnosti (I κ B α , I κ B ϵ) i inflamatorni citokini kao što su IL-6, CCL2, IL-8, CXCL-10 (54, 179, 180). Transkripcija kasnih gena se odigrava kada aktivacija NF- κ B traje najmanje 1 h, i to su geni za određene ćelijske receptore, adhezivne molekule, signalne adaptore (181). Kasni talas genske transkripcije može zavisiti od alternativnog puta koji rezultuje ulaskom u jedro heterodimera RelB/p52 i aktiviranjem širokog spektra gena (182). Analiziranjem genske ekspresije unutar prvih nekoliko sati od aktivacije ustanovljava se da je većina gena regulisana heterodimerom p65/p50. Međutim, RelB/p52 heterodimer može u kasnijem period imati širi spektar u aktiviranju genske ekspresije, pošto se RelB/p52 heterodimeri osim vezivanja za klasične κ B motive, vezuju i za jedinstvenu klasu genskih sekvenci prisutnih u promoterskim regionima izvesnih hemokina koja sadrže κ B mesta različita od klasičnih κ B motiva, kao što su hemokinski ligand 19 sa CC motivom (CCL19) i hemokinski ligand 21 sa CC motivom (CCL21) (65, 182). TNF superfamilija citokina predstavlja jedan od najvažnijih aktivatora NF- κ B. Dva najznačajnija predstavnika ove familije su TNF- α i Tweak (183). TNF- α uglavnom aktivira kanonički NF- κ B put koji se karakteriše prisustvom p65 u heterodimernim kompleksima, dok Tweak aktivira kako kanonički put, tako i alternativni NF- κ B put koji se karakteriše prisustvom RelB/p52 u jedru (65, 184). Oba citokina dovode do povećane transkripcije gena za CCL2 i CCL5, ali samo Twak indukuje kasnu transkripciju CCL19 i CCL21, koja je posredovana aktivnošću NIK (65). Dokazana je uloga Tweak u eksperimentalnom modelu akutnog endotoksemijskog oštećenja bubrega (65).

U našem eksperimentalnom modelu porast vezivanja NF- κ B za DNK kod životinja tretiranih everolimusom bio je udružen sa konstantnim porastom u fosforilaciji p65, koja kulminira drugog dana reperfuzije i sa povećanom ekspresijom RelB u nuklearnoj proteinskoj frakciji koja se nastavlja i u kasnoj fazi I/R oštećenja. S obzirom da je povećano prisustvo RelB u jedru posledica aktivacije alternativnog puta u kojem NIK i IKK α igraju bitnu ulogu, može se zaključiti da aktivacija IKK α može biti asocirana sa povećanim vezivanjem NF- κ B za DNK kod životinja tretiranih everolimusom u eksperimentalnom modelu I/R oštećenja. Uloga RelB u finom moduliranju NF- κ B aktivnosti je još nedovoljno ispitana u eksperimentalnim modelima bubrežnog oštećenja, ali je u do sada sprovedenim studijama pokazana antiinflamatorna uloga RelB kao i regulatorna uloga RelB u tranziciji urođenog u stečeni imunski

odgovor (185, 186). Miševi koji su bili "knock-out" za RelB imali su multifokalnu inflamatornu bolest (187). Moguće je da je povećano prisustvo i dejstvo RelB u jedru u našem eksperimentalnom modelu kod životinja tretiranih everolimusom nastalo kao posledica izražene aktivacije urođenog imunskog odgovora merenog povećanom ekspresijom iRNK za IL-1 β i TNF- α , i da je dovelo do smanjene transkripcije gena za ispitivane hemokine u poređenju sa netretiranim životinjama.

Fosforilacija p65 na mestu Ser⁵³⁶ značajno povećeva transkripcionu aktivnost heterodimera p65/p50. Zbog toga je urađeno određivanje ekspresije fosfo-p65(Ser⁵³⁶) koja u obe grupe životinja pokazuje sličnu krivu ekspresije kao i ekspresija p65 u odgovarajućoj eksperimentalnoj grupi. Fosfo-p65(Ser⁵³⁶) ekspresija u grupi životinja tretiranih everolimusom pokazuje značajno veću ekspresiju u ranima satima (prvi i dugi sat reperfuzije), kao i drugog dana nakon indukcije I/R oštećenja kada korelira i sa značajno većim indeksom tubulointersticijskog oštećenja i sa većom ekspresijom iRNK za TNF- α i IL-1 β . Postoje dokazi da je nuklearna fosforilacija p65 na poziciji Ser⁵³⁶ posredovana dejstvom IKK β i kontrolisana funkcijom molekula zvanog Akt (188, 189, 190), mada se ne može zanemariti i uloga IKK α u fosforilaciji transaktivacionog domena p65 (191). TNF- α i IL-1 β mogu koristiti ovaj alternativni put u ostvarivanju svojih dejstava u ćeliji (189). Poznato je da mTOR inhibicija povratnim mehanizmom dovodi do smanjene fosforilacije Akta i samim tim njegove aktivacije (103, 192), te da je povećana translokacija Akta u jedro viđena u uzorcima biopsije transplantiranog bubrega kod pacijenata sa odloženom funkcijom grafta („*delayed graft function*“ – DGF) koji su bili lečeni rapamicinom, ali takođe i u svinjskom modelu I/R oštećenja bez tretmana m-TOR inhibitorima (193). Indirektno se može zaključiti da je u I/R oštećenju pod mTOR inhibicijom funkcija Akt-a povećana te je samim tim i fosforilacija p65 na poziciji Ser⁵³⁶ povećana pod mTOR inhibicijom, što dodatno modifikuje transkripcionu aktivnost NF- κ B. Navedeni podaci ukazuju na ulogu TNF- α i IL-1 β u povećanju transkripcione aktivnosti NF- κ B aktiviranjem IKK β koja sem ključne uloge u kanoničkom putu dodatno fosforiliše transaktivacioni domen p65 na poziciji Ser⁵³⁶. Povećana aktivnost IKK β merena povećanom ekspresijom fosfo-I κ B α (Ser^{32/36}) u citoplazmatskoj proteinskoj frakciji u obe grupe životinja uočena je tokom celog perioda praćenja, ali nije uočena direktna korelacija sa ekspresijom fosfo-p65(Ser⁵³⁶) u svim

vremenskim tačkama što ukazuje na dodatne mehanizme regulacije fosforilacije p65, moguće putem direktne fosforilacije posredovane aktivnošću IKK α .

Samoograničavanje prvobitne proinflamatorne uloge, NF- κ B postiže povećanom transkripcijom gena za I κ B α koji vezivanjem za NF- κ B heterodimer u citoplazmi dovodi do njegove inaktivacije kao i povećanim vezivanjem u jedru homodimera p50 i p52 koji vrše represiju κ B-zavisne transkripcije, ostvarujući na taj način antiinflamatorni efekat (44, 54). Do sada je uglavnom dokazivana antiinflamatorna uloga homodimera p50. U našim rezultatima pokazana je značajno veća ekspresija I κ B α kod netretiranih životinja u poređenju sa životinjama tretiranim everolimusom što se može tumačiti kao izraz kompenzatorne reakcije u cilju smanjenja intenziteta transkripcije proinflamatornih gena. S obzirom da je već pokazana povećana ekspresija RelB kod životinja tretiranih everolimusom i naglašena njegoova moguća antiinflamatorna uloga te da se RelB vezuje u jedru uglavnom preko heterodimera RelB/p52, urađena je nuklearna ekspresija p52 počev od drugog dana posle indukcije I/R oštećenja kada se uočava najznačajnije tubulointersticijumsko oštećenje, pa do kraja ispitivanja. Uočena je konstantno prisutna ekspresija p52 kod životinja tretiranih everolimusom. Za razliku od njih, netretirane životinje su imale skoro potpuno inhibiranu ekspresiju drugog dana i značajnu ekspresiju trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja. Uočena kinetika ekspresije nije bila u korelaciji sa nađenom ekspresijom RelB, te se indirektno može zaključiti da postoji nuklearno prisustvo p52 nezavisno od RelB. Radi preciznog utvrđivanja, neophodno je uraditi „superšift“ eseje upotrebom specifičnih antitela za određene komponente NF- κ B familije transkripcionih faktora.

Jedan od prvih činioca koji pokreće aktivnost NF- κ B su slobodni kiseonični radikali, čija produkcija zanačajno raste već u prvim minutima reperfuzije. Pokazano je da se I/R oštećenje karakteriše smanjenim sadržajem GSH i povećanim sadržajem GSSG (194), što uz smanjenje NADPH predstavlja markere izražene oksidacije i oksidativnog stresa koji dovodi do aktivacije brojnih puteva koji učestvuju u oštećenju ćelija u I/R fenomenu. Prooksidativni efekat everolimusa može biti povezan sa primarnom funkcijom mTOR inhibitora s obzirom da mTOR inhibitori predisponiraju ćeliju za smanjenu produkciju NADPH. Navedeno tvrđenje proističe iz činjenica da aktivacija mTORC1 stimuliše anaboličke procese i među njima pentozo-monofosfatni

put koji predstavlja jedan od glavnih izvora NADPH te da rapamicin blokira insulinom indukovanu ekspresiju glukoze-6-fosfat-dehidrogenaze, ključnog enzima pentozo-monofosfatnog puta (195, 196, 197).

Dodatno se prooksidativni efekat everolimusa ogleda i u tome što inhibicija mTOR rezultuje u inhibiranoj respiraciji u mitohondrijama koja podstiče produkciju superoksida (198, 199). Dakle, smanjujući potrošnju kiseonika, mitohondrijalne respiracije i preuzimanje nutrijenata, mTOR inhibitori smanjuju oksidativnu fosforilaciju i preusmeravaju metabolizam piruvata iz mitohondrija u citoplazmatski prostor sa porastom glikolitičkih intermedijarnih produkata i laktata.

Jedna studija je pokazala da je tretman životinja everolimusom podvrgnutih I/R oštećenju bubrega doveo do značajnijeg oštećenja bubrežne funkcije koja je merena 24 h nakon indukcije I/R oštećenja uz smanjenje lipidne peroksidacije (200). Ovde je važno napomenuti da nije superoksidni anjon direktno uključen u lipidnu peroksidaciju s obzirom da je negativno naelektrisan. Moguće je da everolimus dovodi do produkcije hidroksilnog radikala putem helacije gvožđa i posledične supresije Fentonove reakcije. Izmerena aktivnost antioksidantnih enzima u I/R oštećenju implicira da I/R oštećenje suprimira aktivnost SOD što čini prilično štetnu kombinaciju koja promovise prooksidativni milje, s obzirom da je smanjena efikasnost odbrane. Nasuprot tome, tretman everolimusom delimično sprečava navedene efekte I/R oštećenja s obzirom da istovremeno promovise oksidativni stres ali ne redukuje značajno aktivnost SOD. Slično je zapaženo i sa aktivnošću GR koja nije bila značajno snižena kod životinja tretiranih everolimusom. Efekti everolimusa na aktivnost GR može da predstavlja eho dejstva everolimusa na nivo GSH. Naime, deplecija GSH stimulisana everolimusom može aktivirati ćelijski odgovor koji se ogleda u održavanju povećane aktivnosti GR u cilju regeneracije GSH iz akumuliranog GSSG. Iz dobijenih rezultata aktivnosti antioksidantnih enzima može se zaključiti da I/R oštećenje suprimira njihovu aktivnost što delom predstavlja uzrok oštećenja bubrežnog tkiva oksidativnim stresom u uslovima I/R oštećenja. Sa druge strane jasno je da prooksidativni efekat everolimusa u I/R oštećenju bubrega nije povezan sa efektima everolimusa na antioksidantne enzime. Vremenski zavisna kinetika enzima koja pokazuje pad aktivnosti SOD, CAT i GSH-Px drugog i trećeg dana posle indukcije I/R oštećenja ukazuje na veliku aktivnost

oksidativnog stresa koja se dešava upravo kada se uočava i najveće tkivno oštećenje izraženo indeksom tubularnog oštećenja tj. nekroze kod obe grupe životinja.

Detektovana snižena aktivnost SOD može biti uzrokovana i direktnim toksičnim dejstvom peroksinitrita koji nastaju kombinovanom produkcijom NO i superoksidnog anjona. Peroksinitriti oštećuju proteine i DNK i utiču na funkciju mitohondrija. Negativna asocijacija između iNOS i aktivnosti SOD pokazana je u slučaju direktne nitrozilacije tirozinskih rezidua u molekulu SOD (25). Negativna korelacija vrednosti iRNK za iNOS i SOD pokazana je u obe eksperimentalne grupe ukazujući na potencijalnu ulogu peroksinitrita u smanjenju aktivnosti SOD. Značaj iNOS u I/R oštećenju se ogleda u činjenicama da inhibicija transkripcije iRNK za iNOS upotrebom „*antisense*“ oligodeoksinukleotida ili upotreba specifičnih inhibitora iNOS smanjuje stepen akutne bubrežne insuficijencije kod pacova podvrgnutih I/R oštećenju (24, 201). U normalnom tkivu nivo iNOS je skoro nula, međutim kada je značajno eksprimiran kao u I/R oštećenju tkivne koncentracije NO se mere u mM. NF- κ B se javlja kao jedan od glavnih transkripcionih faktora za iNOS. NO nastaje iz L-arginina dejstvom NO-sintaza. Postoje tri forme NO-sintaza: neuronalna (nNOS), endotelna (eNOS) i inducibilna (iNOS). Sve tri forme su eksprimirane u različitim delovima tkiva bubrega, ali se ekspresija iNOS značajno povećava u I/R oštećenju doprinoseći ukupnom oštećenju tkiva s obzirom da NO u velikoj koncentraciji osim citotoksičnog ima i proinflamatorno dejstvo (202, 203, 204, 205). Izvor iNOS mogu biti kako epitelne ćelije proksimalnih tubula, tako i makrofage koje infiltrišu ishemijski bubreg. Postoje podaci koji pokazuju ekspresiju iRNK za iNOS u bazalnim uslovima u tubularnim epitelnim ćelijama, koja je homologna makrofagnoj iRNK za iNOS (*macNOS*) (203, 206). Inhibiranjem *macNOS* upotrebom specifičnih antisense nukleotida, Noiri i saradnici su pokazali u pacovskom modelu I/R oštećenja ublažavanje funkcionalnih i histoloških promena (201). NO inhibira transport elektrona u mitohondrijama što rezultuje u povećanoj produkciji superoksidnog anjona. Superoksid se prevodi u H₂O₂ koji lako difunduje iz mitohondrija (199). Navedeni podaci ukazuju na efekat I/R oštećenja na povećane aktivnosti iNOS, što je everolimusom bilo dodatno potencirano. Mi smo detektovali povećanu transkripciju iRNK za iNOS u obe eksperimentalne grupe, ali značajno veću u grupi životinja tretiranih everolimusom drugog dana I/R oštećenja što je korespondiralo i sa značajno većim oštećenjem tkiva u istoj grupi životinja,

povećanom nuklearnom ekspresijom p65 i povećanim intenzitetom vezivanja NF- κ B za DNK u poređenju sa netretiranim životinjama. U kasnoj, reparacionoj fazi I/R oštećenja, ekspresija iRNK za iNOS počinje da opada kod životinja tretiranih everolimusom, dok netretirane životinje pokazuju konstantan porast u ekspresiji iRNK za iNOS. Porast ekspresije iRNK za iNOS kod netretiranih životinja u reparatornoj fazi koincidira sa povećanom infiltracijom makrofaga u bubregu koje bi mogle biti izvor povećane produkcije NO na kraju perioda posmatranja.

U našem eksperimentalnom modelu I/R oštećenja nađena je povećana ekspresija HO-1 koja predstavlja komponentu antioksidantne zaštite. HO-1 se javlja kao jedan od najvažnijih citoprotektivnih molekula u ćelijskom stresu izazavnim različitim stimulusima kao što su I/R oštećenje i radijacija, ostvarujući svoje antioksidantno i antiapoptotsko dejstvo (207). HO-1 katabolizuje hem uz oslobađanje biliverdina i CO koji imaju imunomodulatorno, antiapoptotsko, a u slučaju CO i vazoaktivno dejstvo (208). Postoje dokazi da u tkivu podvrgnutom I/R oštećenju nastali azot monoksid (NO) podstiče gubitak transkripta za HO-1 (209). Pokazano je takođe da NO ostvaruje i suprotan efekat dovodeći do povećane ekspresije HO-1, ukazujući na kompleksne nivoe regulacije NO i HO-1 (210, 211). Sa druge strane, indukcija ekspresije HO-1 pokazuje koristan efekat u bubrežnom oštećenju nastalom nakon ishemije zato što smanjuje produkciju NO, nakon čega dolazi do smanjene produkcije peroksinitrita (212). Navedeni efekat povećanja ekspresije HO-1 u I/R oštećenju bio je suprimiran kod životinja tretiranih everolimusom u prva dva sata reperfuzije potvrđujući da everolimus promoviše pad redoks statusa u tkivu bubrega u I/R oštećenju. Ovo je u suprotnosti sa rapamicinom za koji je pokazano da povećava ekspresiju HO-1 (213, 214). Različiti efekti navedena dva mTOR inhibitora ukazuju da mTOR receptor ne mora biti uključen u regulaciju HO-1 ekspresije, ili da everolimus i/ili rapamicin mogu uticati na HO-1 ekspresiju drugim putevima. Dodatni uzrok smanjene aktivnosti i ekspresije HO-1 kod životinja podvrgnutih I/R oštećenju bubrega i tretmanu everolimusom bi mogao biti i deficit NADPH kojeg HO-1 koristi u degradaciji hema (215, 216). Od značaja je podatak objavljen u jednoj studiji I/R oštećenja jetre da je povećana ekspresija iRNK za HO-1 kao i ekspresija proteina HO-1 nađena već u samom početku reperfuzione faze (217). Može se spekulirati da i I/R oštećenje bubrega utiče na ekspresiju HO-1 na sličan način. Važno je napomenuti da je 6 h nakon indukcije I/R oštećenja kod životinja

tretiranih everolimusom počela značajno da raste ekspresija HO-1 koja je ponovo drugog i trećeg dana nakon indukcije I/R oštećenja značajno manja u odnosu na netretirane životinje što koincidira i sa značajno većim oštećenjem tkiva.

Navedeni nalazi ukazuju da everolimus podstiče oksidativni i nitrozativni stres u ranoj fazi I/R oštećenja. Naglašena oksidacija izgleda ne nastaje usled obstruirane aktivnosti antioksidantnih enzima-SOD, CAT, GSH-Px i GR, već je posledica suprimirane ekspresije i aktivacije HO-1 koja se inače javlja kao citoprotektivni odgovor u uslovima I/R oštećenja kao i povećanja ekspresije iRNK za iNOS, odgovorne za nitrozativni stres.

Analiza dobijenih rezultata dovodi do osnovnog zaključka da tretman everolimusom u I/R oštećenju bubrega pokazuje negativno dejstvo u ranoj fazi i pozitivan efekat u kasnoj, reparacionoj fazi I/R oštećenja. mTOR inhibicija u ranoj fazi I/R oštećenja povećava ekspresiju proinflamatornih citokina, oksidativni i nitrozativni stres i posledično, povećava tkivno oštećenje. U kasnoj fazi I/R oštećenja mTOR inhibicija smanjuje inflamaciju, pre svega određenu smanjenim brojem makrofaga i smanjenom ekspresijom hemokina i ubrzava procese reparacije. Moguće objašnjenje pozitivnog efekta everolimusa u kasnoj fazi I/R oštećenja bi bilo da menjajući svojim imunomodulatornim dejstvom inflamatorni milje i fenotipsku polarizaciju makrofaga a samim tim i njihovu funkciju uz efekat na druge ćelije imunskog sistema, everolimus može uticati na procese reparacije u kasnoj fazi I/R oštećenja. Navedeni nalazi mogu imati kliničke implikacije u transplantaciji bubrega, uzevši u obzir negativno proapoptotsko dejstvo mTOR inhibitora i različitu regulaciju urođene i stečene imunosti posle indukcije I/R oštećenja. Klinički značaj se ogleda u određivanju najpovoljnijeg trenutka nakon transplantacije bubrega kada treba započeti imunosupresivnu terapiju mTOR inhibitorima da bi se izbegli negativni efekti mTOR inhibicije u ranoj fazi I/R oštećenja i postigla željena imunomodulatorna dejstva što u krajnjem cilju dovodi do dužeg preživljavanja grafta.

6. ZAKLJUČAK

- Tretman mTOR inhibitorom everolimusom prouzrokuje značajno oštećenje tubulointersticijuma bubrega u ranoj fazi I/R oštećenja bubrega, koje je praćeno i većim porastom uree i kreatinina u odnosu na netretirane životinje. Oporavak bubrežne funkcije kasni kod životinja tretiranih everolimusom, ali sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja nema razlika u bubrežnoj funkciji.
- Značajno manje prisustvo oštećenja tkiva bubrega sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja kod životinja tretiranih everolimusom u poređenju sa netretiranim životinjama ukazuje na efikasniju rezoluciju tkivnog oštećenja u kasnoj, reparacionoj fazi I/R oštećenja pod mTOR inhibicijom.
- Veće oštećenje tkiva bubrega za kojim sledi bolji patohistološki nalaz u fazi reparacije kod životinja tretiranih everolimusom, samo je na prvi pogled paradoksalan i može biti posledica već poznatog proapoptotskog i antiproliferativnog dejstva mTOR inhibitora u ranoj fazi I/R oštećenja, nakon čega sledi specifično imunomodulatorno dejstvo m-TOR inhibitora koje se manifestuje smanjenom makrofagnom infiltracijom u kasnoj fazi I/R oštećenja.
- I/R oštećenje indukuje ekspresiju iRNK za proinflamatorne citokine TNF- α i IL-1 β u bubrežima koja je dodatno stimulisana dejstvom everolimusa u ranoj fazi I/R oštećenja.
- Tretman everolimusom podstiče oksidativni i nitrozativni stres u ranoj fazi I/R oštećenja koji su posledica smanjene ekspresije i aktivacije HO-1 i povećanja transkripcije iRNK za iNOS.
- I/R oštećenje bubrega miševa karakteriše se bifaznom ekspresijom hemokina, kako u ranoj fazi, tako i u reparacionoj fazi I/R oštećenja. Everolimus ne menja značajno uočenu kinetiku ekspresije, ali smanjuje njen intenzitet.
- Sedmog dana posle indukcije I/R oštećenja netretirane životinje u poređenju sa životinjama tretiranim everolimusom pokazuju nov porast ekspresije iRNK za

hemokine CCL3, CCL5 i CXCL10, održavaju značajno veću ekspresiju iRNK za iNOS, veći broj makrofaga i veću nuklearnu ekspresiju p65 ukazujući na održavanje proinflamatornog miljea.

- Everolimus značajno smanjuje ekspresiju iRNK za TGF- β u reparacionoj fazi I/R oštećenja što može u daljem toku reparacije tkivnog oštećenja dovesti do smanjene fibroze u tubulointercijumu bubrega.
- Tretman everolimusom povećava aktivnost NF- κ B pokazujući skoro kontinuirano prisustvo NF- κ B u jedru za razliku od netretiranih životinja koje pokazuju cikličnu aktivnost NF- κ B. Everolimus stimuliše pored klasičnog i alternativni put aktivacije NF- κ B koji se manifestuje povećanom ekspresijom RelB u jedru naročito u reparacionoj fazi I/R oštećenja bubrega.
- Povećana nuklearna ekspresija p52 u reparacionoj fazi I/R oštećenja kod životinja tretiranih everolimusom u poređenju sa netretiranim životinjama može ukazati na antiinflamatorni efekat everolimusa.
- Urođena i stečena imunost posle indukcije I/R oštećenja mogu biti različito regulisani mTOR inhibitorima, što je od kliničkog značaja u smislu određivanja povoljnog trenutka nakon transplantacije bubrega kada treba započeti imunosupresivnu terapiju m-TOR inhibitorima.

7. LITERATURA

1. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004; 114(1):5-14.
2. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004; 364(9447):1814-27.
3. Boletis J, Balitsari A, Filiopoulos V, Stamataki E, Lionaki S, Zavos G, Kostakis A. Delayed renal graft function: the influence of immunosuppression. *Transplant Proc* 2005; 37(5):2054-9.
4. Hoste EA, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit Care Med* 2008; 36(4 Suppl):S146-51.
5. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(11):3365-70.
6. Xue JL, Daniels F, Star RA, Kimmel PL, Eggers PW, Molitoris BA, Himmelfarb J, Collins AJ. Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(4): 1135-24.
7. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000; 190(3):255-66.
8. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(6):1503-20.
9. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: Role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int* 2004; 66(2):496-9.
10. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011; 121(11):4210-21.
11. Yamamoto T, Tada T, Rodsky SV, Tanaka H, Noiri E, Kajiya F, Goligorsky MS. Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(6):F1150-5.
12. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004; 66(2):480-5.

13. Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1997; 97(4):1056-63.
14. Oh DJ, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, Faubel S, Edelstein CL. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(1):F264-71.
15. Singbartl K, Green SA, Ley K. Blocking P-selectin protects from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure. *FASEB J* 2000; 14(1):48-54.
16. Molitoris BA. Aktin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004; 66(2):871-83.
17. Molina A, Ubeda M, Escribese MM, García-Bermejo L, Sancho D, Pérez de Lema G, Liaño F, Cabañas C, Sánchez-Madrid F, Mampaso F. Renal ischemia/reperfusion injury: functional tissue preservation by anti-activated β 1 integrin therapy. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(2):374-82.
18. Murphy BJ, Robin ED, Tapper DP, Wong RJ, Clayton DA. Hypoxic coordinate regulation of mitochondrial enzymes in mammalian cells. *Science* 1984; 223(4637):707-9.
19. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201(4359):875-80.
20. Kirshenbaum LA, Singal PK. Changes in antioxidant enzymes in isolated cardiac myocytes subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lab Invest* 1992; 67(6):796-803.
21. Jackson R, Parish G, Ho YS. Effects of hypoxia on expression of superoxide dismutases in cultured ATII cells and lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1996; 271(6 Pt 1):955-62.
22. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282(2):C227-41.
23. Gadelha FR, Thomson L, Fagian MM, Costa ADT, Radi R, Vercesi AE. Ca^{2+} - independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. *Arch Biochim Biophys* 1997; 345(2):243-50.
24. Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281(5):F948-57.

25. Macmillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(21):11853-8.
26. Agullo L, Garcia-Dorado D, Inseste J, Paniagua A, Pyrhonen P, Lievadot J, Soler-Soler J. L-Arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia-reoxygenation by cGMP-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 276(5):H1574-80.
27. Kowaltowski AJ, Verecesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(3:4):463-71.
28. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(6):2826-31.
29. Declamp TJ, Dales C, Ralenkotter L, Cole PS, Hadley RW. Intramitochondrial [Ca²⁺] and membrane potential in ventricular myocytes exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 275(2 Pt 2):H484-94.
30. Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 1998; 273(14):11401-4.
31. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):361-70.
32. Whitmaarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996; 74(10):589-607.
33. Park JH, Okayama N, Gute D, Krsmanovic A, Battarbee H, Alexander JS. Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 1999; 277(6 Pt 1):C1066-74.
34. McGowan AJ, Ruiz-Ruiz MC, Gorman AM, Lopez-Rivas A, Cotter TG. Reactive oxygen intermediate(s) (ROI): common mediator (s) of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage and apoptosis. *FEBS Lett* 1996; 392(3):299-303.
35. Esposti MD, Hatzinisiriou I, McLennan H, Ralph S. Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. *J Biol Chem* 1999; 274(42):29831-37.
36. Latanich CA, Toledo-Pereira LH. Searching for NF- κ B-based treatments of ischemia reperfusion injury. *Journal of Investigative Surgery* 2009; 22(4):301-15.

37. Nichols TC. NF-kappaB and reperfusion injury. *Drug News Perspect* 2004;17(2):99-104.
38. Hacker H, Karin M. Is NFkappaB2/p100 direct activator of programmed cell death? *Cancer Cell* 2002; 2(6):431-3.
39. Aggarwal BB. Apoptosis and nuclear factor-κB: a tale of association and dissociation. *Biochem Pharmacol* 2000; 60(8):1033-9.
40. Rahman A, Anwar KN, True AL, Malik AB. Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappaB site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *J Immunol* 1999;162(9):5466-76.
41. Matsushita H, Morishita R, Nata T, Aoki M, Nakagami H, Taniyama Y, Yamamoto K, Higaki J, Yasufumi K, Ogihara T. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-κB (NF-κB)-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of the importance of NF-κB in endothelial cell regulation. *Circ Res* 2000; 86(9):974-81.
42. Karin M, Lin A. NF-κB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3(3):221-6.
43. Cao CC, Ding XQ, Ou ZL, Liu CF, Li P, Wang L, Zhu CF. In vivo transfection of NF-κB decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney International* 2004; 65(3):834-45.
44. Panzer U, Steinmetz OM, Turner JE, Meyer-Schwesinger C, von Ruffer C, Meyer TN, Zahner G, Gómez-Guerrero C, Schmid RM, Helmchen U, Moeckel GW, Wolf G, Stahl RA, Thaiss F. Resolution of renal inflammation: a new role for NF-kappaB1 (p50) in inflammatory kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(2):F429-39.
45. Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1α by NF-κB. *Biochem J* 2008; 412(3):477-84.
46. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. NF-κB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1α. *Nature* 2008; 453(7196): 807-11.
47. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:621-63.
48. May MJ, Ghosh S. Rel/NF-κB and IκB proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 1997; 8(2):63-73.

49. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Ann Rev Immunol* 1998; 16:225-60.
50. Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israël A. I kappa B epsilon, a novel member of the I κ B family, controls RelA and cRel NF- κ B activity. *EMBO J* 1997; 16(6):1413-26.
51. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25(6):280-8.
52. Wan F, Lenardo MJ. Specification of DNA binding activity of NF-kappaB proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(4):a000067.
53. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; 132(3):344–62.
54. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. NF- κ B in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(8):1254-62.
55. Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Mol Cell* 2001; 7(2):401-9.
56. Karin M. The beginning of the end: I κ Bkinase (IKK) and NF- κ B activation. *J Biol Chem* 1999; 274(39): 27339-42.
57. Chen Lf, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation. *Science* 2001; 293(5535):1653-7.
58. Vermeulen L, De Wilde G, Notebaert S, Vanden Berghe W, Haegeman G. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(5-6):963-70.
59. Tergaonkar V, Perkins ND. p53 and NF- κ B crosstalk: IKK α tips the balance. *Mol Cell Biol* 2007; 26(2):158-9.
60. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18(49):6853-66.

61. Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: Pifalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(9):1161-79.
62. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappaB signaling pathway. *Science* 2001; 293(5534):1495-9.
63. Basak S, Shih VF, Hoffmann A. Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system. *Mol Cell Biol* 2008; 28(10):3139-50.
64. Dejardin E, Droin NM, Delhase M, Haas E, Cao Y, Makris C, Li ZW, Karin M, Ware CF, Green DR. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 2002; 17(4):525-35.
65. Sanz AB, Sanchez-nino MD, Izquierdo MC, Jakubowsky A, Justo P, Blanco-Colio LM, Ruiz-Ortega M, Selgas R, Egido J, Ortiz A. TWEAK activates the non-canonical NF-kappaB pathway in murine renal tubular cells: modulation of CCL21, *PLoS One* 2010; e8955.
66. Li XC, Ma YF, Wang XH. Role of NF- κ B as effector of IPC in donor livers before liver transplantation in rats. *Transplant Proc* 2006; 38(5):1584-7.
67. Morgan EN, Boyle EM Jr, Yun W, Griscavage-Ennis JM, Farr AL, Canty TG Jr, Pohlman TH, Verrier ED. An essential role for NF-kappaB in the cardioadaptive response to ischemia. *Ann Thorac Surg.* 1999; 68(2):377-82.
68. Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277(3 Pt 2):R922-9.
69. Jo SK, Sung SA, Cho WY, Kim HK. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5):1231-9.
70. Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 2002; 23(11):509-12.

71. Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, de Vries B, Daemen MA, Hiemstra PS, van 't Veer C. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J Immunol* 2002; 168(3):1286-93.
72. Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, Kiosses WB, Tobias PS, Mackman N, McKay DB. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2007; 178(10): 6252-8.
73. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, Sharland AF, Chadban SJ. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007; 117(10):2847-59.
74. Thurman JM, Ljubanović D, Royer PA, Kraus DM, Molina H, Barry NP, Proctor G, Levi M, Holers VM. Altered renal tubular expression of the complement inhibitor Crry permits complement activation after ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 2006; 116(2):357-68.
75. Furuichi K, Gao JL, Horuk R, Wada T, Kaneko S, Murphy PM. Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 2008; 181(12):8670-6.
76. Li L, Huang L, Sung SS, Vergis AL, Rosin DL, Rose CE Jr, Lobo PI, Okusa MD. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2008; 74(12):1526-37.
77. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol* 2009; 130(1):41-50.
78. Day YJ, Huang L, Ye H, Linden J, Okusa MD. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288(4):F722-31.
79. Kinsey GR, Li L, Okusa MD. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 2008; 109(4):102-7.

80. Li L, Huang L, Sung SS, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, Engelhard VH, Okusa MD. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 2007; 178(9):5899-911.
81. Soos TJ, Sims TN, Barisoni L, Lin K, Littman DR, Dustin ML, Nelson PJ. CX3CR1+ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int* 2006; 70(3):591-6.
82. Penfield JG, Wang Y, Li S, Kielar MA, Sicher SC, Jeyarajah DR, Lu CY. Transplant surgery injury recruits recipient MHC class II-positive leukocytes into the kidney. *Kidney Int* 1999; 56(5):1759-69.
83. Loverre A, Capobianco C, Stallone G, Infante B, Schena A, Ditonno P, Palazzo S, Battaglia M, Crovace A, Castellano G, Ranieri E, Schena FP, Gesualdo L, Grandaliano G. Ischemia-reperfusion injury-induced abnormal dendritic cell traffic in the transplanted kidney with delayed graft function. *Kidney Int* 2007; 72(8):994-1003.
84. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney. *Kidney Int* 2005; 68(3):1096-108.
85. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 2007; 71(7):619-28.
86. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, Rabb H. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001; 108(9):1283-90.
87. Ysebaert DK, De Greef KE, De Beuf A, Van Rompay AR, Vercauteren S, Persy VP, De Broe ME. T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2004; 66(2):491-6.
88. Huang Y, Rabb H, Womer KL. Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cell Immunol* 2007;248(1): 4-11.

89. Ascon DB, Lopez-Briones S, Liu M, Ascon M, Savransky V, Colvin RB, Soloski MJ, Rabb H. Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol* 2006; 177(5):3380-7.
90. Marques VP, Gonçalves GM, Feitoza CQ, Cenedeze MA, Fernandes Bertocchi AP, Damião MJ, Pinheiro HS, Antunes Teixeira VP, dos Reis MA, Pacheco-Silva A, Saraiva Câmara NO. Influence of TH1/TH2 switched immune response on renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 104(1):48-56.
91. Monteiro RM, Camara NO, Rodrigues MM, Tzelepis F, Damião MJ, Cenedeze MA, Teixeira Vde P, dos Reis MA, Pacheco-Silva A. A role for regulatory T cells in renal acute kidney injury. *Transpl Immunol* 2009; 21(1):50-5.
92. Tilney NL, Guttman RD. Effect of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation* 1997; 64(7):945-7.
93. Peeters P, Terryn W, Vanholder R, Lameire N. Delayed graft function in renal transplantation. *Curr Opin Crit Care* 2004; 10(6):489-98.
94. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Immunosuppressant-induced nephropathy: pathophysiology, incidence and management. *Drug Saf* 1999; 21(6):471-88.
95. Novick AC, Hwei HH, Steinmuller D, Strem SB, Cunningham RJ, Steinhilber D, Goormastic M, Buszta C. Detrimental effect of cyclosporine on initial function of cadaver renal allografts following extended preservation. Results of a randomized prospective study. *Transplantation* 1986; 42(2):154-8.
96. Chávez-Velásquez M, Pons H, Medina M, Quiroz Y, Parra G, Herrera J. Effects of mycophenolate mofetil in ischemic acute renal failure in rats. *Nefrologia* 2007; 27(4):448-58.
97. Yakupoglu YK, Kahan BD. Sirolimus: a current perspective. *Exp Clin Transplant* 2003; 1(1):8-18.
98. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation* 2006; 81(5):643-54.

99. Inman SR, Davis NA, Olson KM, Lukaszek VA, McKinley MR, Seminerio JL. Rapamycin preserves renal function compared with cyclosporine A after ischemia/reperfusion injury. *Urology* 2003; 62(4):750-4.
100. Boratyńska M, Banasik M, Patrzalek D, Szyber P, Klinger M. Sirolimus delays recovery from posttransplant renal failure in kidney graft recipients. *Transplant Proc* 2005; 37(2):839-42.
101. Stallone G, Di Paolo S, Schena A, Infante B, Battaglia M, Ditunno P, Gesualdo L, Grandaliano G, Schena FP. Addition of sirolimus to cyclosporine delays the recovery from delayed graft function but does not affect 1-year graft function. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(1):228-33.
102. Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, Rennke H, Abernathy VE, Koh JS, Valeri R, Levine JS. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281(4):F693-706.
103. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(5):307-18.
104. Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(2):117-26.
105. Kwiatkowski DJ, Manning BD. Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Hum Mol Genet* 2005; 14(2):R251-8.
106. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18(16):1926-45.
107. Potter CJ, Pedraza LG, Huang H, Xu T. The tuberous sclerosis complex (TSC) pathway and mechanism of size control. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(3):584-6.
108. Um SH, D'Alessio D, Thomas G. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* 2006; 3(6):393-402.

109. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(37):13489-94.
110. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, Sun HL, Li LY, Ping B, Huang WC, He X, Hung JY, Lai CC, Ding Q, Su JL, Yang JY, Sahin AA, Hortobagyi GN, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 2007; 130(3):440-55.
111. Dan HC, Adli M, Baldwin AS. Regulation of mammalian target of rapamycin activity in PTEN-inactive prostate cancer cells by I kappa B kinase alpha. *Cancer Res* 2007; 67(13):6263-9.
112. Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell* 2006; 21(4):521-31.
113. Sofer A, Lei K, Johannessen CM, Ellisen LW. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol* 2005; 25(14):5834-45.
114. Hackstein H, Taner T, Logar AJ, Thomson AW. Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100(3):1084-7.
115. Monti P, Mercurio A, Leone BE, Valerio DC, Allavena P, Piemonti L. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells. *Transplantation* 2003; 75(1):137-45.
116. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(5):324-37.
117. Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, Takeuchi T, Matsuda S, Koyasu S. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* 2008; 112(3):635-43.
118. Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, Kolbe T, Stulnig TM, Hörl WH, Hengstschläger M, Müller M, Säemann MD. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* 2008; 29(4):565-77.

119. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005; 434(7034):772-7.
120. Mondino A, Mueller DL. mTOR at the crossroads of Tcell proliferation and tolerance, *Semin Immunol* 2007; 19(3):162-72.
121. Säemann MD, Haidinger M, Hecking M, Hörl WH, Weichhart T. The multifunctional role of mTOR in innate immunity: implications for transplant immunity. *Am J Transplant* 2009; 9(12):2655-61.
122. Kusaba H, Ghosh P, Derin R, Buchholz M, Sasaki C, Madara K, Longo DL. Interleukin-12-induced interferon-gamma production by human peripheral blood T cells is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem* 2005; 280(2):1037-43.
123. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Kasran A, Boon L, Hilbrands LB, Joosten I. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39(9):537-45.
124. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2006; 177(12):8338-47.
125. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernández-Fresnedo G, Gómez-Alamillo C, Merino R, Benito MJ, Cacho E, Rodrigo E, Palomar R, López-Hoyos M, Arias M. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82(4):550-7.
126. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(7):523-32.
127. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 2007; 12(3-4):112-24.
128. Schuler W, Sedrani R, Cottens S, Häberlin B, Schulz M, Schuurman HJ, Zenke G, Zerwes HG, Schreier MH. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* 1997; 64(1):36-42.
129. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valentine-von Kaeppler HA, Starling RC, Sørensen K, Hummel M, Lind JM, Abeywickrama KH,

Bernhardt P; RAD B253 Study Group. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 2003; 349(9):847-58.

130. Webster AC, Lee VW, Chapman JR, Craig JC. Target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression of kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Transplantation* 2006; 81(9):1234-48.

131. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, Kramer S, Fischer W, Gschaidmeier H, Pietruck F. ZEUS Study Investigators. Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 2011; 377(9768):837-47.

132. Mjörnstedt L, Sørensen SS, von Zur Mühlen B, Jespersen B, Hansen JM, Bistrup C, Andersson H, Gustafsson B, Undset LH, Fagertun H, Solbu D, Holdaas H. Improved Renal Function After Early Conversion From a Calcineurin Inhibitor to Everolimus: a Randomized Trial in Kidney Transplantation. *Am J Transplant* 2012; 12(10):2744-53.

133. Viganò M, Tuzcu M, Benza R, Boissonnat P, Haverich A, Hill J, Laufer G, Love R, Parameshwar J, Pulpón LA, Renlund D, Abeywickrama K, Cretin N, Starling RC, Eisen HJ. RAD B253 Study Group. Prevention of acute rejection and allograft vasculopathy by everolimus in cardiac transplants recipients: a 24-month analysis. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26(6):584-92.

134. Lane HA, Wood JM, McSheehy PM, Allegrini PR, Boulay A, Brueggen J, Littlewood-Evans A, Maira SM, Martiny-Baron G, Schnell CR, Sini P, O'Reilly T. mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2009;15(5):1612-22.

135. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A; RECORD-1 Study Group. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008; 372(9637):449-56.

136. Atkins MB, Yasothan U, Kirkpatrick P. Everolimus. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8(7):535-6.

137. Lui SL, Chan KW, Tsang R, Yung S, Lai KN, Chan TM. Effect of rapamycin on renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant Int* 2006; 19(10):834-9.
138. Rossi M, Grivetta SA, Dianzani MA. Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase in regenerating rat liver *Med Sci Res* 1987; 15:109-14.
139. De Waziers I, Albrecht R. The effects of vitamin A, nutritional status on glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in rat intestine. *Experientia* 1987; 43(4):394-5.
140. Takada Y, Noguchit T, Okabe T, Kayiyama M. Superoxide dismutase in various tissues from rabbit bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. *Cancer Res* 1982; 42(10):4233-5.
141. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-75.
142. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10):3170-5.
143. Claiborne A. Assay for catalase. In: Greenwald RA, editor. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1985. p. 283-284.
144. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1):158-69.
145. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 1974; 30(6):665-7.
146. Akagi R, Takahashi T, Sassa S. Fundamental role of heme oxygenase in the protection against ischemic acute renal failure. *Jpn J Pharmacol* 2002; 88(2):127-32.
147. Furuichi K, Kaneko S, Wada T. Chemokine/chemokine receptor mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2009; 13(1):9-14.

148. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Wang H, Matsushima K, Takeya M, Kuziel WA, Mukaida N, Yokoyama H. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(10): 2503-15.
149. Fiorina P, Ansari MJ, Jurewicz M, Barry M, Ricchiuti V, Smith RN, Shea S, Means TK, Auchincloss H Jr, Luster AD, Sayegh MH, Abdi R. Role of CXC chemokine receptor 3 pathway in renal ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(3):716-23.
150. Furuichi K, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CX3CR1 regulates renal interstitial fibrosis after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2006; 169(2):372-87.
151. Krüger T, Benke D, Eitner F, Lang A, Wirtz M, Hamilton-Williams EE, Engel D, Giese B, Müller-Newen G, Floege J, Kurts C. Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(3):613-21.
152. Li L, Okusa MD. Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury. *Semin Nephrol.* 2010; 30(3):268-77.
153. Stroo I, Stokman G, Teske GJ, Raven A, Butter LM, Florquin S, Leemans JC. Chemokine expression in renal ischemia/reperfusion injury is most profound during the reparative phase. *Int Immunol* 2010; 22(6):433-42.
154. Furuichi K, Wada T, Kitajikma S, Toyama T, Okumura T, Hara A, Kawachi H, Shimizu F, Sugaya T, Mukaida N, Narumi S, Matsushima K, Kaneko S. IFN-inducible protein 10 (CXCL10) regulates tubular cell proliferation in renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol* 2008; 109(1):c29-c38.
155. Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, Lazzeri E, Beltrame C, Francalanci M, Uguccioni M, Galli G, Cosmi L, Maurenzig L, Baggiolini M, Maggi E, Romagnani S, Serio M. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 2001; 107(1):53-63.

156. Keane MP, Belperio JA, Arenberg DA, Burdick MD, Xu ZJ, Xue YY, Strieter RM. IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis. *J Immunol* 1999; 163(10):5686-92.
157. Bujak M, Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Xia Y, Leucker T, Zymek P, Veeranna V, Tager AM, Luster AD, Frangogiannis NG. Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction. *Circ Res* 2009; 105(19):973-83.
158. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 1993; 177(6):1809-14.
159. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adoptive immunity. *Curr Opin Immunol* 2003; 14(1):129-35.
160. Zhou J, Tang PC, Qin L, EA, Gayed PM, Li W, Skokos Kyriakides TR, Pober JS, Tellides G. CXCR3-dependent accumulation and activation of perivascular macrophages is necessary for homeostatic arterial remodeling to hemodynamic stresses. *J Exp Med* 2010; 207(9):1951-66.
161. Kakuta Y, Okumi M, Miyagawa S, Blocking of CCR5 and CXCR3 suppresses the infiltration of macrophages in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2012; 93(1):24-31.
162. Kluth DC. Pro-resolution properties of macrophages in renal injury. *Kidney Int* 2007; 72(3):234-6.
163. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 2007; 37(1): 14-6.
164. Vinuesa E, Hotter G, Jung M, Herrero-Fresneda I, Torras J, Sola A. Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischemia/reperfusion injury. *J Pathol* 2008; 214(1):104-13.

165. Jang HS, Kim J, Park YK, Park KM. Infiltrated macrophages contribute to recovery after ischemic injury but not to ischemic preconditioning in kidneys. *Transplantation* 2008; 85(3):447-55.
166. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Tomosugi N, Mukaida N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H. Gene therapy expressing amino-terminal truncated monocyte chemoattractant protein-1 prevents renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(4):1066-71.
167. Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(2):166-76.
168. Guan Q, Nguan CY, Du C. Expression of transforming growth factor- β 1 limits renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2010; 89(11):1320-7.
169. Spurgeon KR, Donohoe DL, Basile DP. Transforming growth factor-beta in acute renal failure: receptor expression, effects on proliferation, cellularity, and vascularization after recovery from injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288(3):F568-77.
170. Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt SM, Miyaji T, McLeroy P, Nibhanupudy B, Li S, Star RA. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int* 2001; 60(6):2118-28.
171. Daemen MA, van de Ven MW, Heineman E, Buurman WA. Involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 1999; 67(6):792-800.
172. Schmitz F, Heit A, Dreher S, Eisenächer K, Mages J, Haas T, Krug A, Janssen KP, Kirschning CJ, Wagner H. Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. *Eur J Immunol* 2008; 38(11):2981-92.
173. Meldrum KK, Meldrum DR, Hile KL, Yerkes EB, Ayala A, Cain MP, Rink RC, Casale AJ, Kaefer MA. p38 MAPK mediates renal tubular cell TNF-alpha production and TNF-alpha-dependent apoptosis during simulated ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(2):C563-70.

174. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK, Eisenbarth SC, Florquin S, Flavell RA, Leemans JC, Sutterwala FS. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(48):20388-93.
175. Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, Roelofs JJ, van der Poll T, Florquin S, Leemans JC. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 2008; 3(10):e3596.
176. Wan X, Fan L, Hu B, Yang J, Li X, Chen X, Cao C. Small interfering RNA targeting IKK β prevents renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300(4):F857-63.
177. Moss NC, Stansfield WE, Willis MS, Tang RH, Selzman CH. IKKbeta inhibition attenuates myocardial injury and dysfunction following acute ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(4):H2248-53.
178. Feng B, Chen G, Zheng X, Sun H, Zhang X, Zhang ZX, Xiang Y, Ichim TE, Garcia B, Luke P, Jevnikar AM, Min WP. Small interfering RNA targeting RelB protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2009; 87(9):1283-9.
179. Nelson DE, Ihekweba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, McDowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MR. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 2004; 306(5696):704-8.
180. Ashall L, Horton CA, Nelson DE, Paszek P, Harper CV, Sillitoe K, Ryan S, Spiller DG, Unitt JF, Broomhead DS, Kell DB, Rand DA, Sée V, White MR. Pulsatile stimulation determines timing and specificity of NF-kappaB-dependent transcription. *Science* 2009; 324(5924):242-6.
181. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 2002; 298(5596):1241-5.

182. Fusco AJ, Huang DB, Miller D, Wang VY, Vu D, Ghosh G. NF-kappaB p52:RelB heterodimer recognizes two classes of kappaB sites with two distinct modes. *EMBO Rep* 2009; 10(2):152-9.
183. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104(4):487-501.
184. Saitoh T, Nakayama M, Nakano H, Yagita H, Yamamoto N, Yamaoka S. TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2003; 278(38):36005-12.
185. Xia Y, Pauza M, Feng L, Lo D. Rel B regulation of chemokine expression modulates local inflammation. *Am J Pathol* 1997; 151(2):375-87.
186. Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D. Expression of RelB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 1995; 373(6514):531-6.
187. Weih F, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA, Ryseck RP, Lira SA, Bravo R. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* 1995; 80(2):331-40.
188. Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* 1999; 274(43):30353-6.
189. Yang F, Tang E, Guan K, Wang CY. IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003; 170(11):5630-5.
190. Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS Jr. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kB through utilization of the IkbKinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* 2001; 276(22):18934-40.

191. Sizemore N, Lerner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR. Distinct roles of the I κ B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from I κ B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B. *J Biol Chem* 2002; 277(6):3863-9.
192. Dan HC, Cooper MJ, Cogswell PC, Duncan JA, Ting JP, Baldwin AS. Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev* 2008; 22(11):1490-1500.
193. Loverre A, Ditonno P, Crovace A, . Ische Gesualdo L, Ranieri E, Pontrelli P, Stallone G, Infante B, Schena A, Di Paolo S, Capobianco C, Ursi M, Palazzo S, Battaglia M, Selvaggi FP, Schena FP, Grandaliano G. Ischemia-reperfusion induces glomerular and tubular activation of proinflammatory and aniapoptotic pathways: differential modulation by Rapamycin. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(10):2657-86.
194. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47(3):446-56.
195. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 2010; 39(2): 171.
196. Edinger AL, Thompson CB. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* 2002; 13(7): 2276-88.
197. Wagle A, Jivraj S, Garlock GL, Stapleton SR. Insulin regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression is rapamycin-sensitive and requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1998; 273(24):14968-74.
198. Schieke SM, Phillips D, McCoy JP Jr, Aponte AM, Shen RF, Balaban T, Finkel T. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem* 2006; 28(37):27643-52.
199. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009; 417(1):1-13.
200. Suyani E, Derici UB, Sahin T, Ofluoglu E, Pasaoglu H, Erdem O, Barit G, Reis KA, Erten Y, Arinsoy T, Sindel S. Effects of everolimus on cytokines, oxidative stress and renal histology in ischemia-reperfusion injury of the kidney. *Ren Fail* 2009; 31(8):698-703.

201. Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS. In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *J Clin Invest* 1996; 97(10):2377-83.
202. Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 1995; 268(5 Pt 2):F885-98.
203. Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* 1994; 46(3):653-65.
204. Lieberthal W. Biology of ischemic and toxic renal tubular cell injury: role of nitric oxide and the inflammatory response. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7(3):289-95.
205. Blantz RC, Munger K. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron* 2002; 90(4):373-8.
206. Ahn KY, Mohaupt MG, Madsen KM, Kone BC. In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol* 1994; 267(5 Pt 2):748-57.
207. Akagi R, Takahashi T, Sassa S. Fundamental role of heme oxygenase in the protection against ischemic acute renal failure. *Jpn J Pharmacol* 2002; 88(2):127-32.
208. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235(1-2):249-63.
209. Mayer RD, Wang X, Maines MD. Nitric oxide inhibitor N omega -nitro-L-arginine methyl ester potentiates induction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: a novel mechanism for regulation of the oxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(1):43-50.
210. Zuckerbraun BS, Billiar TR, Otterbein SL, Kim PK, Liu F, Choi AM, Bach FH, Otterbein LE. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced hemoxygenase 1. *J Exp Med* 2003;198(11):1707-16.
211. Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 1996; 270(1 Pt 2):107-14.

212. Salom MG, Cerón SN, Rodriguez F, Lopez B, Hernández I, Martínez JG, Losa AM, Fenoy FJ. Heme oxygenase-1 induction improves ischemic renal failure: role of nitric oxide and peroxynitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(6): H3542-9.
213. Gonçalves GM, Cenedeze MA, Feitoza CQ, Wang PM, Bertocchi AP, Damião MJ, Pinheiro HS, Antunes Teixeira VP, dos Reis MA, Pacheco-Silva A, Câmara NO. The role of heme oxygenase 1 in rapamycin-induced renal dysfunction after ischemia and reperfusion injury. *Kidney Int* 2006; 70(10):1742-9.
214. Visner GA, Lu F, Zhou H, Liu J, Kazemfar K, Agarwal A. Rapamycin induces heme oxygenase-1 in human pulmonary vascular cells: implications in the antiproliferative response to rapamycin. *Circulation* 2003; 107(6):911-6.
215. Kitamuro T, Takahashi K, Ogawa K, Uono-Fujimori R, Takeda K, Furuyama K, Nakayama M, Sun J, Fujita H, Hida W, Hattori T, Shirato K, Igarashi K, Shibahara S. Bach1 functions as a hypoxia inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J Biol Chem* 2003; 278(11):9125-33.
216. Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(3):F425-41.
217. Yun N, Eum HA, Lee SM. Protective role of heme oxygenase-1 against liver damage caused by hepatic ischemia and reperfusion in rats. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13(10):1503-12.

PRILOG A

LISTA SKRAĆENICA

A1 – antiapoptotski protein

AMPK – protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom („*AMP-activated protein kinase*“)

AP-1 – aktivirajući protein 1 („*activator protein 1*“)

ATP – adenozin trifosfat

B7-1 – protein na aktiviranim antigen-prezentujućim ćelijama preko kojeg se ostvaruje kostimulacioni signal za aktivaciju T-ćelija putem interakcije sa CD28 koji je eksprimiran na membrani T-ćelija

BAFF – B ćelijski aktivirajući faktor („*B-cell activating factor*“)

Bcl-2 – B-ćelijski limfom-2, regulatorni protein ćelijske smrti – apoptoze („*B-cell lymphoma 2*“)

Bcl-3 – B-ćelijski limfom-3, regulatorni protein ćelijske smrti – apoptoze („*B-cell lymphoma 3*“)

CAT – katalaza

CCL19 – hemokinski ligand 19 sa CC motivom

CCL2 – hemokinski ligand 2 sa CC motivom

CCL21 – hemokinski ligand 21 sa CC motivom

CCL3 – hemokinski ligand 3 sa CC motivom

CCL5 – hemokinski ligand 5 sa CC motivom

CCR1 – receptor tip 1 za hemokine sa CC motivom

CCR2 – receptor tip 2 za hemokine sa CC motivom

CD 11c – protein na površini denditskih ćelija, ranije nazivan Integrin alfa X (INTGAX)

CD1d – glikoprotein koji prezentuje lipide („*cluster of differentiation*“ 1)

CD25 – alfa lanac receptora za IL-2

CD28 – kostimulatorni molekul eksprimiran na aktiviranim T-ćelijama

CD3 – antigen eksprimiran na površini T-ćelija kao deo T-ćelijskog receptorskog kompleksa

CD4 – marker pomoćničkih T- ćelija

CD40L – ligand za CD40

CD8 – koreceptor za T-ćelijski receptor eksprimiran uglavnom na citotoksičnim T-limfocitima

c-FLIP – antiapoptozni protein („*cellular FLICE-like inhibitory protein*“)

cGMP – ciklični guanozin monofosfat

cIAP – inhibitor apoptoze koji interferira sa kaspazama („*Cellular inhibitor of apoptosis protein 1*“)

cIAP-2 – inhibitor apoptoze koji interferira sa kaspazama („*Cellular inhibitor of apoptosis protein 2*“)

CO – ugljen monoksid

COX-2 – ciklooksigenaza 2

cRel – transkripcioni faktor koji sadrži Rel homologni domen i pripada NF-κB transkripcionoj familiji

CX3CL1 – hemokinski ligand 1 sa C-X3-C motivom, drugačije zvan fraktalkin

CX3CR1 – receptor za CX3CL1

CXCL10 – hemokin sa CXC motivom 10, ranije znan kao protein kojeg indukuje interferon gama 10 (IP10)

CXCR3 – receptor za CXCL10

DEPC – dietil pirokarbonat

dNTP – deoksinukleozid trifosfat

DTT – ditiotreitol

4E-BPs – protein koji vezuje eukariotski translacioni inicijacioni faktor 1 i tako formira kompleks koji učestvuje u regulaciji translacije (*„eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1“*)

EDTA – etilendiaminotetrasirćetna kiselina

EGTA – etilen glikol tetrasirćetna kiselina

eNOS – endotelijalna azotmonoksid-sintaza

ERK – kinaza regulisana ekstracelularnim signalom (*„extracellular signal-regulated kinase“*)

F4/80 – antigenski marker mišjih makrofaga

FKBP12 – imunofilinski protein koji vezuje takrolimus, ranije poznat kao FK506 (*„FK506 binding protein“*)

FoxP3 – transkripcioni faktor koji pripada FOX familiji proteina i ima karakteristični račvasti oblik domena kojim se vezuje za DNK (*„forkhead box P3“*); bitan je za razvoj regulatornih T-ćelija

GR – glutation reduktaza

GSH – glutation

GSH-Px – glutation peroksidaza

GSSG – redukovana forma glutationa

H₂O₂ – vodonik peroksid

HCl – hlorovodonična kiselina

HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperacinetansulfonska kiselina

HIF-1 – faktor indukovan hipoksijom 1 („*hypoxia-inducible factor*“)

HO-1 – hem oksigenaza-1

I/R – ishemijsko/reperfuziono

ICAM-1 – intercelularni adhezivni molekul-1

IFN- γ – interferon gama

IKK α – podjedinica I κ B kinaznog kompleksa

IKK β – podjedinica I κ B kinaza kompleksa

IL-10 – interleukin-10

IL-12p40/70 – interleukin-12

IL-13 – interleukin 13

IL-1 β – interleukin-1 beta

IL-2 – interleukin-2

IL-23 – interleukin-23

IL-4 – interleukin-4

IL-8 – interleukin-8

iNKT – invarijantne T-ćelijske prirodne ubice („*invariant natural killer T cells*“)

iNOS – inducibilna azotmonoksid-sintaza

IRF-5 i 7 – faktori 5 i 7 koji regulišu interferon („*interferon regulatory factor*“)

IRS1 – receptorski supstrat za insulin 1 („*insulin receptor substrate 1*“)

I κ B α - jedan od *kappa*-B proteina

I κ B β - jedan od *kappa*-B proteina

I κ B γ - jedan od *kappa*-B proteina

I κ B ϵ - jedan od *kappa*-B proteina

KC – hemokin kojeg proizvode keratinociti

LPS – lipopolisaharid

LST8 – protein koji je deo mTOR kompleksa sa ulogom da poveća njegovu kinaznu aktivnost

LT α 1 β 2 – limfotoksin alfa1, beta2

macNOS – makrofagna azotmonoksid-sintaza

MAPK – protein kinaza aktivirana mitogenom („*mitogen activated protein kinase*“)

MCP-1 – monocitno hemotaktički protein-1 („*monocyte chemotactic protein-1*“)

MHC – geni (proteini) glavne histokompatibilnosti („*major hystocompatibility complex*“)

MIP-2 – makrofagni inflamatorni protein-2 („*macrophage inflammatory protein-2*“)

MOPS – 3-(N-morfolin) propansulfonska kiselina; ima puferska svojstva i deo je rastvora koji se koristi u elektroforezi proteina

MPTP – pore koje povećavaju propustljivost mitohondrijalne membrane („*mitochondrial permeability transition pores*“)

mTOR – „*mammalian target of rapamycin*“

MyD88 – mijeloidni diferencijacioni protein primarnog odgovora 88 („*myeloid differentiation primary response gene (88)*“)

Na⁺/K⁺-ATPaza – natrijum, kalijum-ATPaza

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NaN₃ – natrijum azid

NFAT – nuklearni faktor aktiviranih T ćelija („*nuclear factor of activated T-cells*“)

NF-κB – nuklearni faktor kapa B

NIK – kinaza koja indukuje NF-κB („*NF-κB inducing kinase*“)

NK 1.1- marker T-ćelija prirodnih ubica kod miševa soja C57

nNOS – neuronalna azotmonoksid-sintaza

NO – azot monoksid

·NO – slobodni azotni radikal

NP40 – nonil fenoksipolietoksiletanol; ima funkciju deterdženta u destrukciji citoplazmatske membrane u cilju dobijanja intracelularnog sadržaja

„*nu/nu*“ – oznaka za miševe kojima zbog određene genetske mutacije nedostaje timus

O₂⁻ – superoksidni anjon

p100/p52 (NF-κB2) – transkripcioni faktor koji sadrži Rel homologni domen i pripada NF-κB transkripcionoj familiji

p105/p50 (NF- κ B1) – transkripcijski faktor koji sadrži Rel homologni domen i pripada NF- κ B transkripcijskoj porodici

PAS- „*Periodic acid-Schiff*“; histološki metod bojenja koji detektuje polisaharide i mukozne supstance kao što su glikoproteini

PCNA – nuklearni antigen proliferirajućih ćelija („*proliferating cell nuclear antigen*“)

PCR – „*polimeraza chain reaction*“

PDGF – faktor rasta kojeg proizvode trombociti („*platelet derived growth factor*“)

PI3K – fosfatidilinozitol 3 kinaza

PMSF – fenilmetansulfonilfluorid; ima svojstvo da inhibira serinske proteaze

Poly(dI-dC) – poli deoksiinozinska-deoksicitidilna kiselina

PVDF – poliviniliden fluorid

RAD – mikroemulzija everolimusa

RAG1 – gen koji kodira enzim koji učestvuje u rekombinaciji gena za T ćelijski receptor i imunoglobuline („*recombinasa activating gene*“)

RANKL – ligand za receptor koji aktivira NF- κ B („*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*“)

Raptor – regulatorni protein udružen sa mTOR-om („*regulatory-associated protein of mTOR*“)

Ras – signalni intraćelijski protein sa GTP-aznom aktivnošću koji interreaguje sa ERK

REDD1 – protein koji nastaje u odgovoru ćelije na stres kao što su hipoksija i oštećenje DNK („*regulated in development and DNA damage responses 1*“)

RelA (p65) – transkripcijski faktor koji sadrži Rel homologni domen i pripada NF- κ B transkripcijskoj porodici

RelB – transkripcioni faktor koji sadrži Rel homologni domen i pripada NF- κ B transkripcionoj familiji

RHEB – protein koji je homologan Ras-u i značajno je zastupljen u mozgu („*Ras homolog enriched in brain*“); vezuje GTP i ima GTP-aznu aktivnost; učestvuje u insulin/mTOR/S6K1 signalnom putu

Rictor – protein pridružen mTOR-u koji je nesenzitivan na dejstvo rapamicina („*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*“)

20S/26S – podjedinice proteazoma

S6K1 – ribozomalni protein S6 kinaza 1

SDS – natrijum dodecil sulfat (sodium dodecyl sulphate)

SIN1 – protein koji interreaguje sa protein-kinazama koje su aktivirane stresom („*stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein 1*“)

SKR – slobodni kiseonični radikali

SMAD3 – sekundarni glasnik koji pripada familiji proteina koji modulira dejstvo TGF- β i homologan je proteinu nađenom u Drozofili („*Mothers against decapentaplegic homolog 3*“)

SOD – superoksid dismutaza

STAT3 – transduktor signala i aktivator transkripcije („*Signal transducer and activator of transcription*“)

TCR – T-ćelijski receptor

TGF- β – faktor transformacije rasta-beta („*transforming growth factor- β* “)

TLR – receptori slični toll-u („*toll-like receptors*“)

TNF- α – faktor nekroze tumora-alfa („*tumor necrosis factor-alpha*“)

Treg-ćelija – regulatorna T-ćelija

Tweak – slab induktor apoptoze koji je sličan TNF- α („*TNF related weak inducer of apoptosis*“)

VCAM-1 – vaskularni ćelijski adhezivni molekul 1 („*vascular cell adhesion molecule*“)

XIAP – X-vezani inhibitorni protein apoptoze

BIOGRAFIJA

Aleksandra V. Kezić je rođena 28.11.1968. godine u Raški. Osnovnu i srednju školu završila je u Mladenovcu. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1994. godine sa prosečnom ocenom 9,55 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Od 1997. do 1998. godine radila je u Centru za imunološka istraživanja „Branislav Janković“ u Beogradu. Magistrirala je na Imunologiji odbranom teze pod nazivom „Dejstvo lezije preoptičke oblasti hipotalamusa na primarni humoralni imunski odgovor pacova“ 2000. godine, od kada je zaposlena u Kliničkom centru Srbije na Klinici za nefrologiju. Specijalistički ispit iz Interne medicine položila je 2001. godine sa odličnim uspehom i stekla zvanje specijaliste interne medicine. Od 2004. godine radi kao asistent na predmetu interna medicina na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Subspecijalistički rad pod nazivom „Uticaj rezidualne bubrežne funkcije na stanje kardiovaskularnog sistema i regulaciju hipertenzije“ odbranila je 2006. godine i time stekla zvanje subspecijaliste nefrologa. Pohađala je školu nefrologije, dijalize i transplatacije u organizaciji „Evropskog Udruženja za Dijalizu i Transplantaciju“. Jednomesečno stručno usavršavanje na odeljenju nefrologije i transplantacije Univerzitetske klinike Eppendorf u Hamburgu obavila je 2005. godine. Od 2009. do 2010. godine radila je na naučnom projektu nefrološkog istraživačkog tima Univerzitetske klinike Eppendorf u Hamburgu šest meseci. Dr Aleksandra Kezić je učestvovala kao autor radova na nekoliko domaćih i međunarodnih kongresa. Nosilac je prve nagrade za poster prezentaciju na XVIII nefrološkom kongresu podunavskih zemalja u Novom Sadu 2006. godine. Autor je nekoliko radova štampanih u domaćim i časopisima od međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а АЛЕКСАНДРА КЕЗИЋ

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ДЕЈСТВО МТОР ИНХИБИТОРА ЕВЕРОЛИМУСА НА АКТИВНОСТ
НО-КБ, ИНФЛАМАЦИЈУ И ИСХОД ИСХЕМИЈСКО/РЕПЕРФУЗИСНОГ
ОШТЕЋЕЊА БУБРЕГА КРД, МИШЕВА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 04.04.2013.

А.Кезић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора АЛЕКСАНДРА КЕЗИЋ

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада ДЕЈСТВО МТОР ИНХИБИТОРА ЕВЕРОЛИМУСА НА АКТИВНОСТ
НО-КБ, ИНФЛАМАЦИЈУ И ИСХОД ИСХЕМИЈСКО/РЕПЕРФУЗИОНЕ
ОШТЕЋЕЊА БУБРЕГА КОД МИШЕВА

Ментор PROF. DR. ВИШЊА ЛЕЖАИЋ

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 04.04.2013.

А. Кезић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ДЕЈСТВО mTOR ИНХИБИТОРА ЕВЕРОЛИМУСА НА АКТИВНОСТ NF- κ B, ИНФЛАМАЦИЈУ И ИСХОД ИСХЕМИЈСКО/РЕПЕРДУЗЦИОНОГ ОШТЕЋЕЊА БУБРЕГА КОД МИШЕВА
која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 04.04.2013.

