



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Pavle Randelović

PROTEKTIVNI EFEKTI SELENA I SALICILNE KISELINE KOD
PACOVA SA AKUTNOM INSUFICIJENCIJOM BUBREGA
IZAZVANOM GENTAMICINOM

doktorska disertacija

Niš, 2013.

UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Pavle Ranđelović

PROTEKTIVNI EFEKTI SELENA I SALICILNE KISELINE KOD PACOVA
SA AKUTNOM INSUFICIJENCIJOM BUBREGA IZAZVANOM
GENTAMICINOM

doktorska disertacija

Mentor: Prof. dr Slavimir Veljković

Niš, 2013.

| | |
|---|--|
| I Autor | |
| Ime i prezime | Pavle Randelović |
| Datum i mesto rođenja | 06.07.1980. god. Zuara, Libija |
| Sadašnje zaposlenje | Institut za fiziologiju, Medicinski fakultet u Nišu |
| II Doktorska disertacija | |
| Broj stranica | 106 |
| Broj slika/shema | 22 |
| Broj tabela | 1 |
| Broj grafikona | 25 |
| Ustanova i mesto gde je rad izrađen | Institut za fiziologiju, Institut za patologiju, Institut za biohemiju i Centar za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu |
| Naučna oblast | Molekularna medicina, UNO Fiziologija |
| Mentor | Prof. dr Slavimir Veljković |
| III Ocena i odbrana | |
| Datum prijave teme | 24.05.2013. |
| Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije | |
| Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata | 1. Prof. dr Mirjana Radenković, predsednik 2. Prof. dr Slavimir Veljković, mentor i član 3. Doc. dr Nenad Stojiljković, član |
| Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije | 1. Prof. dr Mirjana Radenković, predsednik 2. Prof. dr Slavimir Veljković, mentor i član 3. Doc. dr Nenad Stojiljković, član 4. Doc. dr Dušan Sokolović, član 5. Prof. dr Vesna Ivetić, član |
| Datum odbrane doktorske disertacije | |

Naučni doprinos:

1. **Randjelovic P**, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Velickovic L, Sokolovic D, Stoilkovic M, Ilic I. Protective effect of selenium on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. Drug Chem Toxicol 2012;35(2):141-8.

2. **Randjelovic P**, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Jankovic-Velickovic L, Sokolovic D, Stoilkovic M, Ilic I. Salicylic acid attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. ScientificWorldJournal. 2012;2012:390613.

Srdačno se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Slavimiru Veljkoviću za doprinos pri izboru problematike i pri realizaciji ovog rada, na posvećenom vremenu, izuzetnom strpljenju, stručnom usmeravanju i angažovanju kao i na vrednim i inspirativnim savetima u pripremi i izradi ove disertacije.

Zahvaljujem prof. dr Mirjani Radenković na spremnosti za saradnju, savetima i razumevanju.

Članu komisije, doc. dr Nenadu Stojiljkoviću, dugujem veliku zahvalnost za konstantnu stručnu i moralnu podršku koju mi je pružao od samog početka mog istraživačkog rada, pa do završetka rada na ovoj disertaciji.

Zahvaljujem doc. dr Dušanu Sokoloviću na poverenju i nesebičnoj kolegijalnoj i stručnoj pomoći.

Zahvaljujem prof. dr Vesni Ivetić na saradnji i svesrdnosti.

Zahvaljujem prof. dr Ljubinki Janković-Veličković na ljubaznosti, trudu i stručnoj pomoći.

Zahvaljujem doc. dr Ivanu Jovanoviću na stručnoj pomoći i dragocenim savetima.

Zahvaljujem svojoj porodici i prijateljima na podršci i razumevanju.

Zahvaljujem svojoj supruzi Tatjani na inspiraciji, strpljenju i ljubavi.

Ova doktorska disertacija je rađena uz finansijsku pomoć projekta br. 43012, 175092 i 172061 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Spisak najčešće korišćenih skraćenica

| | |
|-------------------------------|---|
| AG | aminoglikozidi |
| ATP | adenozin trifosfat |
| CaSR | receptor za kalcijum |
| COX | ciklooksigenaza |
| eNOS | endotelna azot oksid sintaza |
| GM | gentamicin |
| GPx | glutation peroksidaza |
| GSH | glutation |
| H ⁺ | vodonik |
| H ₂ O ₂ | vodonik peroksid |
| HSP | proteini toplotonog šoka |
| i.m. | intramuskularno |
| i.p. | intraperitonealno |
| i.v. | intravenski |
| IFN- γ | interferon- γ |
| IL | interleukin |
| iNOS | inducibilna azot oksid sintaza |
| iRNK | informaciona RNK |
| JNK | jun N-terminalne kinaza |
| K | kalijum |
| K _f | koeficijent ultrafiltracije |
| LPS | lipopolisaharid |
| MAPK | mitogen aktivisana protein-kinaza |
| MDA | malondialdehid |
| mM | mili mola po litru |
| MMP | matriks metaloproteinaze |
| MPO | mijeloperoksidaza |
| Na | natrijum |
| NADP(H) | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |
| NF- κ B | nuklearni faktor kapa B |
| NO | azot oksid |
| O ₂ ⁻ | superoksidni anjon |
| OH ⁻ | hidroksilni anjon |
| PAF | faktor aktivacije trombocita |
| PG | prostaglandini |
| PLA2 | fosfolipaza A2 |
| PPAR | receptor aktiviran peroksizomalnim proliferatorom |
| SAL | salicilna kiselina |
| Se | selen |
| SKR | slobodni kiseonički radikali |

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| SOD | superoksid dismutaza |
| TNF- α | faktor nekroze tumora- α |
| tRNK | transportna RNK |
| TRxR | tioredoksin reduktaza |
| γ -GT | γ -glutamil-transpeptidaza |

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 3 |
| 2.1. Gentamicin | 3 |
| 2.1.1. Farmakologija gentamicina | 3 |
| 2.1.2. Nefrotoksičnost gentamicina | 5 |
| 2.1.2.1. Tubulski efekti | 5 |
| 2.1.2.2. Glomerulski efekti | 10 |
| 2.1.2.3. Vaskularni efekti | 15 |
| 2.1.3. Centralna uloga oksidativnog stresa i zapaljenja u gentamicinskoj nefrotoksičnosti | 16 |
| 2.2. Salicilna kiselina | 17 |
| 2.2.1. Inhibicija sinteze prostaglandina | 17 |
| 2.2.2. Inhibicija nuklearnog faktora kapa B | 18 |
| 2.2.3. Anti-zapaljensko dejstvo | 20 |
| 2.3. Selen | 22 |
| 2.3.1. Antioksidativna aktivnost selena | 23 |
| 2.3.2. Selen kao prooksidans | 25 |
| 2.3.3. Selenoproteini | 25 |
| 3. CILJ ISTRAŽIVANJA | 27 |
| 4. MATERIJAL I METODE | 28 |
| 4.1. Biohemijske analize | 29 |
| 4.2. Histopatološka ispitivanja | 29 |
| 4.3. Morfometrijska analiza | 30 |
| 4.4. Statistička analiza | 31 |
| 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA | 32 |
| 5.1. Rezultati biohemijskih analiza krvi | 32 |
| 5.2. Rezultati analize markera oksidativnog stresa u tkivu bubrega | 35 |
| 5.3. Rezultati histološke i histohepijske analize tkiva bubrega | 37 |
| 5.4. Rezultati morfometrijskih ispitivanja tkiva bubrega | 49 |
| 5.4.1. Morfometrijska analiza glomerula | 49 |
| 5.4.2. Morfometrijska analiza tubula | 55 |
| 5.4.3. Morfometrijska analiza jedara intersticijalnih ćelija | 56 |
| 6. DISKUSIJA | 62 |
| 6.1. Protektivno dejstvo salicilne kiseline na akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvanu gentamicinom | 69 |
| 6.2. Protektivno dejstvo selena na akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvanu gentamicinom | 73 |
| 7. ZAKLJUČCI | 79 |
| 8. LITERATURA | 81 |

1. UVOD

Bubreg je vitalni organ i ima važnu ulogu u organizmu. Glavna funkcija bubrega je u održavanju normalne zapremine telesne tečnosti, njenog sastava i acido bazne ravnoteže. Mnogi spoljašnji faktori, uključujući određene lekove, utiču na funkcionisanje bubrega. Zbog relativno velikog protoka krvi kroz bubreg, brojni lekovi mogu lako da izazovu njegovo oštećenje. Aminoglikozidni antibiotik gentamicin je jedan od najčešćih uzroka nefrotoksičnosti izazvane lekovima. U poslednje vreme nefrotoksičnost gentamicina je značajno redukovana prelaskom na jednodozni režim davanja kao i eliminacijom faktora rizika koji povećavaju nefrotoksičnost kod pacijenata. Međutim, još uvek je primena gentamicina povezana sa neželjenim efektima koji su značajno češći i ozbiljniji u odnosu na druge antibiotike. Obzirom da je gentamicin veoma efikasan antibiotik u lečenju teških infekcija, važno je pronaći načine za umanjnje njegove nefrotoksičnosti. Smatra se da oksidativni stres i slobodni kiseonički radikali imaju važnu ulogu u nefrotoksičnosti gentamicina. Dakle, potencijalni terapijski pristupi u sprečavanju ili saniranju oštećenja bubrega izazvanog gentamicinom bi imali važne kliničke posledice u povećanju sigurnosti leka. Oksidativni stres dovodi do oštećenja tkiva putem peroksidacije lipida, modifikacije DNK i proteina. Zbog velike zastupljenosti polinezasićenih masnih kiselina dugog lanca u sastavu ćelijske membrane, bubreg je naročito osetljiv na oksidativni stres izazvan slobodnim radikalima. Imajući u vidu da je jedan od potencijalnih mehanizama nefrotoksičnosti gentamicina oksidativni stres, neutralizacija slobodnih radikala primenom materija sa antioksidativnom aktivnošću bi umanjila oštećenje bubrega u tom slučaju.

Antioksidansi su molekuli sposobni da uspore ili spreče oksidaciju drugih molekula tako što sami bivaju oksidisani. Antioksidativna zaštita se pokazala kao jako korisna u mnogim patološkim stanjima koja su praćena povećanom produkcijom slobodnih radikala.

Selen je jedan od mikroelemenata neophodnih za život ljudi, koji se mora unositi ishranom. Selen je važan deo antioksidativnog enzima glutation peroksidaze koji štiti ćelije od štetnih učinaka slobodnih radikala koji se stvaraju tokom normalnog metabolizma kiseonika. Brojni epidemiološki podaci ukazuju da je ishrana bogata voćem i povrćem povezana sa manjom stopom oboljevanja od hroničnih nezaraznih bolesti. Laboratorijske i kliničke studije su pokazale da mikroelementi i drugi sastojci voća i povrća imaju povoljne biološke efekte. Među spomenutim materijama najpoznatiji su antioksidansi, vitamini, minerali i biljna vlakna.

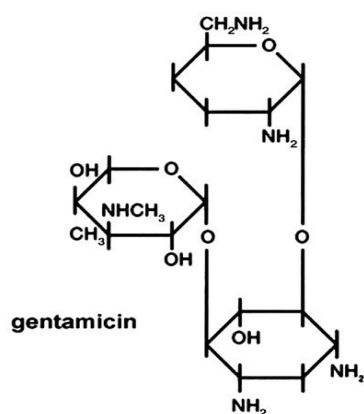
U poslednje vreme sve je više dokaza da povećan unos salicilata putem voća i povrća doprinosi sprečavanju bolesti i očuvanju zdravlja. Selen i salicilna kiselina imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, direktno ili aktivacijom antioksidativnih enzima. Njihova primena bi mogla da umanja oštećenje bubrega izazvano gentamicinom.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Gentamicin

2.1.1. Farmakologija gentamicina

Još od njihovog uvođenja u terapijsku praksu 1944. godine, aminoglikozidni antibiotici kao što su gentamicin (GM) i amikacin su najčešće korišćeni antibiotici širom sveta za lečenje Gram-negativnih bakterijskih infekcija. U mnogim slučajevima, oni su jedina efektivna terapija protiv rezistentnih bakterija. Aminoglikozidi (AG) su prirodni ili polusintetski antibiotici sa heterocikličnom strukturom koju čine dva ili više aminošećera povezana glikozidnim vezama u aminociklični prsten (slika 1).



Slika 1. Hemijska struktura gentamicina

i tobramicin (dobijen iz *Streptomyces tenebraris*) su prirodni AG, dok su netilmicin i amikacin polusintetski derivati. Polusintetski derivati imaju veću otpornost na bakterijske enzime koji obično inaktiviraju GM i tobramicin (Laurent i sar., 1990).

Aminoglikozidi napadaju spoljašnji omotač i ćelijsku membranu bakterija procesom koji zahteva energiju i kiseonik. Zbog toga su anaerobni organizmi otporni na ove antibiotike. Ireverzibilno se vezuju za 30S podjedinicu ribozoma i sprečavaju formiranje 30S inicijalnog kompleksa što dovodi do konformacione promene ribozoma i usporava ili potpuno prekida rast bakterija. Takođe, AG mogu da izazovu raspadanje 70S inicijalnog kompleksa što uzrokuje pogrešno prepisivanje genetskog koda tokom sinteze proteina (Tanaka i sar., 1975). Dakle, aminoglikozidi utiču na tri faze sinteze proteina: deluju na započinjanje peptidnog lanca blokadom 30S inicijalnog kompleksa, blokiraju disocijaciju ribozoma (ireverzibilno) i

indukuju pogrešno prepisivanje genetskog koda bakterije tokom sinteze proteina (Jacoby i sar., 1967).

Aminoglikozidna familija antibiotika pokazuje slične farmakokintetske osobine. U organizmu se GM primarno eliminiše putem bubrega procesima filtracije, sekrecije i reapsorpcije. Gentamicin ima relativno mali volumen distribucije, oko $0,22 \pm 0,05$ l/kg kod čoveka (Yoshiyama i sar., 1996) i $0,28 \pm 0,01$ l/kg kod pacova (Lin i sar., 1994) što omogućava korišćenje jednozaprernskog modela za ispitivanje farmakokinetike. Parenteralni putevi administracije kao što su intravenski (i.v.), intramuskularni (i.m.), intraperitonealni (i.p.) i drugi omogućavaju maksimalnu bioraspoloživost GM. Najveće koncentracije u serumu dostižu se posle 30 do 90 minuta nakon i.m. injekcije i 30 minuta posle i.v. injekcije. Poluživot GM je od 2 do 3 sata za ljude i od 0,5 do 1,3 sati za pacove (Lin i sar., 1994) u normalnim uslovima i proporcionalno se povećava sa smanjenjem funkcije bubrega. Oko 20 do 30% unete doze se vezuje za serumske proteine. Aminoglikozidi se ne metabolišu sistemski; izlučuju se nepromenjeni glomerulskom filtracijom, i samo 1% unete doze se eliminiše preko žuči. U urinu, njihova koncentracija može biti nekoliko stotina puta veća nego u serumu (Randall i sar., 1987). Bubrežni klirens ovih lekova je sličan klirensu kreatinina. Terapijska doza gentamicina je 3-6 mg/kg/24 h. Ova doza se primenjuje kada je funkcija bubrega očuvana. Ako je klirens kreatinina snižen, doza gentamicina se mora smanjiti ili se interval davanja mora produžiti (Deglin i sar., 1995; Malseed i sar., 1995).

Gentamicin se zanemarljivo reapsorbuje iz gastrointestinalnog trakta dok se aktivno reapsorbuje i nagomilava u lizozomima ćelija proksimalnih tubula bubrega nakon i.p, i.m. ili i.v. primene (De Broe i sar., 1984). U epitelnim ćelijama proksimalnih tubula je otkriven specifičan transportni mehanizam, koji omogućava nakupljanje GM u većoj koncentraciji u odnosu na plazmu (Nagai i sar., 2004). Pokazano je da megalin, veliki receptor za endocitozu obilno eksprimiran na apiklanoj membrani proksimalnih tubula, ima važnu ulogu u vezivanju i endocitozi GM u ćelije proksimalnih tubula (Nagai i sar., 2004). Antagonisti megalina su sintetisani (npr. citohrom c) i daju nadu kao mogući pristup u sprečavanju ili minimiziranju jatrogenih oštećenja tubula izazvanih GM (Watanabe i sar., 2004; Nagai i sar., 2006). Međutim, megalin nije prisutan na mezangijalnim ćelijama (Teng i sar., 2004). U organizmu GM se raspoređuje ekstraćelijski. Može proći placentarnu barijeru a gotovo da ne prolazi krvno-moždanu barijeru. Preuzimanje GM je proces koji obuhvata nekoliko etapa. Najpre se GM veže za membranu četkastog pokrova. Nakon toga endocitozom GM ulazi u tubulske ćelije i dospeva do lizozoma (Beauchamp i sar., 1991; Hori i sar., 1992). Aminoglikozidi su

bazne strukture i pokazuju karakterističnu polikatjonsku strukturu koja reaguje elektrostatički sa kiselim i/ili anjonskim ćelijskim komponentama kao što su fosfolipidi.

2.1.2. Nefrotoksičnost gentamicina

Jedan broj terapijskih agenasa je dugo bio povezivan sa razvojem jatrogenog oštećenja bubrega. Bubrež je česta meta toksičnih ksenobiotika, zbog svog kapaciteta za ekstrakciju i koncentrovanje toksina, kao i zbog velikog protoka krvi (oko 20% minutnog volumena srca). Eksperimentalni podaci ukazuju da nefrotoksičnost izazvana lekovima uključuje vaskularne, glomerulske i tubulske efekte. Oštećenje bubrega je najčešće posledica opstrukcije tubula zbog bubrenja ćelija ili depozicije kristala (Perazella i sar., 2003). Nefrotoksične supstance oštećuju različite vrste ćelija u nefronu. Najbolje proučen mehanizam je nekroza epitelnih ćelija tubula. Takođe su opisane i promene na glomerulima sa poremećajem funkcije. Ove promene su mnogo manje dokumentovane (Kohn i sar., 2002). Kada se neki lekovi (ciklosporin, cisplatin ili gentamicin) aplikuju eksperimentalnim životinjama, zapaža se značajan pad protoka krvi kroz bubrež i glomerulske filtracije, sa porastom vaskularnog otpora. Ovi efekti se javljaju i bez trajnih strukturnih promena u glomerulu i nezavisno od oštećenja tubula (Bennett i sar., 1994).

2.1.2.1. Tubulski efekti

Oštećenje tubula gentamicinom ima dva aspekta: 1) nekrozu epitelnih ćelija tubula, uglavnom u proksimalnom segmentu, sa pridruženom zapaljenskom komponentom i 2) funkcionalno oštećenje glavnih ćelijskih komponenti uključenih u transport vode i elektrolita.

Centralni aspekt GM nefrotoksičnosti je tubulska citotoksičnost. Tretiranje eksperimentalnih životinja GM dovodi do apoptoze (El Mouedden i sar., 2000; Li i sar., 2009) kao i do nekroze (Edwards i sar., 2007) epitelnih ćelija tubula. U kulturi ćelija, GM takođe izaziva apoptozu (El Mouedden i sar., 2000) i nekrozu ovih ćelija (Pessoa i sar., 2009).

Gentamicin izaziva citotoksičnost u onim ćelijama u kojima se nakuplja. U bubregu, to su najčešće epitelne ćelije proksimalnih tubula (Pattyn i sar., 1988; Verpooten i sar., 1989) a ćelije distalnih tubula i sabirnih kanalića su značajno manje zahvaćene citotoksičnim efektima (Fujiwara i sar., 2009). Povećano nagomilavanje GM u ćelijama proksimalnih tubula je u vezi sa ekspresijom transportnog molekula za proteine i katjone (kompleks koji formiraju megalin i kubilin) u proksimalnim tubulima. Poznato je da ovaj kompleks vrši transport GM i

generalno AG, putem endocitoze (Schmitz i sar., 2002). Ovi lekovi se onda transportuju do lizozoma, Goldžijevog aparata i endoplazminog retikuluma (Silverblatt i sar., 1982). Gentamicin se vezuje za membranske fosfolipide, menja njihov metabolizam, i dovodi do stanja poznatog kao fosfolipidoza koje je opisano kod ljudi (De Broe i sar., 1984) i eksperimentalnih životinja tretiranih GM (Nonclercq i sar., 1992). Lizosomalna fosfolipidoza nastaje zbog:

- 1) poremećaja signalnog puta fosfatidilinozitola (Ramsammy i sar., 1988),
- 2) smanjenja prometa fosfolipida (Ramsammy i sar., 1989) i nakupljanja fosfolipida u ćelijskoj membrani (Laurent i sar., 1982),
- 3) smanjenja dostupnog negativnog naelektrisanja neophodnog za pravilnu funkciju fosfolipaza (Mingeot-Leclercq i sar., 1995) i
- 4) inhibicije fosfodiesteraza zavisnih od kalcijuma (van Rooijen i sar., 1985) i
- 5) zbog inhibicije A1, A2 i C1 fosfolipaza (Ramsammy i sar., 1989; Abdel-Gayoum i sar., 1993).

Fosfolipidoza je direktno proporcionalna nivou toksičnosti GM (Tulkens i sar., 1989; Kaloyanides i sar., 1992). Međutim, slične promene su zapažene i u drugim ćelijskim tipovima izloženim GM ali je nivo oštećenja i ćelijske smrti u njima znatno niži. To ukazuje da ovi efekti možda i ne doprinose mnogo oštećenju epitelnih ćelija tubula.

Kada koncentracija GM u endozomima pređe određeni prag, njihove membrane pucaju i njihov sadržaj, zajedno sa GM, izlazi u citoplazmu (Ngaha i sar., 1983; Regec i sar., 1989). U citoplazmi GM deluje na mitohondrije direktno i indirektno (Mather i sar., 2001, Morales i sar., 2010), i tako aktivira unutrašnji put apoptoze, prekida respiratorni lanac, smanjuje stvaranje adenzin trifosfata (ATP) (Simmons i sar., 1980) i dovodi do oksidativnog stresa preko povećanja superoksid anjona i hidrokislinskih radikala (Walker i sar., 1988; Cuzzocrea i sar., 2002), koji dalje dovode do smrti ćelije. Indirektni efekat na mitohondrije je posredovan povećanjem nivoa proteina X udruženog sa Bcl-2 (Bax) (Horibe i sar., 2004) preko inhibicije njegove razgradnje u proteozomima (Servais i sar., 2006). Sadržaj lizozoma čine visoko aktivne proteaze zvane katepsini, koje su sposobne da izazovu smrt ćelije (Schnellmann i sar., 1998). Ćelijska smrt izazvana katepsinima se odigrava kroz apoptozu direktno aktivirajući izvršne kaspaze i indirektno proteolitičkom aktivacijom proapoptotskog proteina Bid i unutrašnjeg puta (Chwieralski i sar., 2006; Yin i sar., 2006). U velikim količinama, katepsini izazivaju masivnu proteolizu koja dovodi do brze ćelijske smrti po tipu nekroze, naročito u manjku ATP (Golstein i sar., 2007). U endoplazminom retikulumu, GM

inhibira sintezu proteina (Monteil i sar., 1993), remeti tačnost translacije (Buchanan i sar., 1987) i utiče na posttranslacione modifikacije proteina (Horibe i sar., 2004). Sve ovo dovodi do stresa u endoplazminom retikulumu i aktivira apoptozu preko kaspaze 12 i kalpaina (Peyrou i sar., 2007). Konačno, dokazano je da aktivacija ekstraćelijskog receptora za kalcijum (CaSR) pomoću GM i drugih AG takođe indukuje blaži stepen apoptoze u ćelijama tubula koje poseduju CaSR ali ne i kod onih koje ga nemaju. Međutim, CaSR se takođe nalazi i na GM-rezistentnim ćelijama kao što su ćelje kosti, mozga, kolona, glatki mišići, endotelne ćelije itd. Dakle, potrebno je još informacija kako bi se utvrdila tačna uloga CaSR u nefrotoksičnosti izazvanoj GM.

U eksperimentima na ćelijama u kulturi pokazano je da GM nezavisno od oštećenja ćelija inhibira čitav niz membranskih transportnih proteina (kotransport natrijuma i fosfata ($\text{Na}^+\text{-Pi}$) (Sorribas i sar., 2001) i $\text{Na}^+\text{-H}^+$ kontratransport (Levi i sar., 1990); transport dipeptida pomoću nosača (Skopicki i sar., 1996); elektrogeni Na^+ transport (Todd i sar., 1992) i $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpu (Sassen i sar., 2006)). Inhibicija transporta ometa reapsorpciju u tubulima i ugrožava homeostazu ćelija. Na primer, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpa je ključna komponenta održanja volumena ćelije. Inhibicija ove pumpe bi dovela do nekontrolisanog bubrenja ćelija i posledične nekroze ili apoptoze (Lieberthal i sar., 1996). Već posle 30 minuta od perfuzije bubrega rastvorom GM (Parsons i sar., 1997) ili 3 sata nakon davanja eksperimentalnim životinjama (Foster i sar., 1992), zapaža se smanjeno bubrežno preuzimanje kalcijuma i magnezijuma, što vodi ka povećanom izlučivanju ovih minerala putem bubrega, pre vidljivih znakova oštećenja bubrega. Gentamicin se transportuje i takmiči sa proteinima, katjonima i drugim molekulima za kompleks megalin-kubilin u proksimalnim tubulima i na taj način ometa njihovu reapsorpciju (Nagai i sar., 2002; Nagai i sar., 2006).

Oštećeno tkivo ili ćelije se otpuštaju u lumen tubula i delimično ili potpuno dovode do opstrukcije što smanjuje ekskretornu funkciju nefrona (Neugarten i sar., 1983; Rivas-Cabanero i sar., 1993). Opstrukcija povećava hidrostatski pritisak u tubulima i Boumanovoj kapsuli, što smanjuje filtracioni pritisak a samim tim i glomerulsku filtraciju. Međutim, u blažim slučajevima i početnim stadijumima, u odsustvu značajne opstrukcije tubula, može se detektovati nakupljanje kreatinina i ureje u krvi, što predstavlja dokaz oštećenja bubrega i ukazuje na smanjenje glomerulske filtracije. U odsustvu značajne opstrukcije nefrona, povećanje kreatinina u plazmi može se jedino objasniti smanjenom glomerulskom filtracijom. Oštećenje tubula vodi ka poremećenoj reapsorpciji koja uzrokuje preveliki dotok vode i elektrolita u distalne delove nefrona, što dalje aktivira tubuloglomerulsku povratnu spregu.

Ona se ostvaruje preko angiotenzina II i aferentne i eferentne arteriole, što dovodi da smanjenja glomerulske filtracije (Vallon i sar., 2003; Blantz i sar., 2007). Ova sprega se aktivira kao zaštitini mehanizam koji sprečava veliki gubitak vode i elektrolita (Komlosi i sar., 2009). Ovaj mehanizam se adaptira u periodu od 1 do 24 sata (Deng i sar., 2004). Dakle, nakon ovog perioda njegova uloga u smanjenju filtracije bi teorijski trebalo da nestane. Međutim, glomerulska filtracija ostaje smanjena dokle god je GM prisutan. Jedno od mogućih objašnjenja je da oksidativni stres, zapaljenje i oslobađanje vazokonstrikora dovode do kontrakcije mezangijalnih ćelija i krvnih sudova.

Postoje dva glavna razloga za oštećenje bubrega izazvano GM: njegovo nakupljanje u ćelijama proksimalnih tubula i interakcija sa ćelijskim membranama i organelama. Ćelije četkastog pokrova proksimalnih tubula su izložene koncentraciji GM većoj od one u serumu jer bubreg predstavlja glavni ekskretorni put za GM.

Poznato je da koncentracija GM u ćelijama proksimalnih tubula bubrega nije u vezi sa nefrotoksičnošću ali se smatra da je tubulska nekroza dozno zavisna (Bennett i sar., 1989). Međutim, nedavne studije sa ćelijama u kulturi su pokazale da je ključni aspekt gentamicinske citotoksičnosti njegova koncentracija u citoplazmi, a ne kao što se ranije smatralo nakupljanje u lizozomima (Servais i sar., 2008). Takođe je dokazano da mala količina GM ulazi direktno u citoplazmu, nezavisno od endocitoze posredovane kompleksom megalin/kubilin (Myrdal i sar., 2005). Pored toga, pokazano je da GM ulazi u ćelije tubula u kulturi kroz nespecifični katjonski kanal TRPV4 (Karasawa i sar., 2008). Međutim, ovaj kanal je prisutan samo u distalnim tubulima, a i njegov doprinos ulasku GM je relativno mali.

Gentamicin se eliminiše primarno preko glomerulske filtracije. Oko 3 do 5% od unetog GM se aktivno reapsorbuje u ćelije proksimalnih tubula (Laurent i sar., 1990) i izaziva nekrozu S1-S2 segmenta proksimalnih tubula bubrega (Houghton i sar., 1976). Nakupljanje nesvarenih fosfolipida u lizozomima, označeno kao lizozomalna fosfolipidoza, je u tesnoj vezi sa GM nefrotoksičnošću. Nakupljanje GM u lizozomima se može dokazati autoradiografijom (Silverblatt i sar., 1979) ili obeleženim zlatom (Beauchamp i sar., 1991) i može dostići koncentracije koje su nekoliko puta veće u odnosu na nivo u serumu (Giuliano i sar., 1986). I kod ljudi i kod životinja, lizozomalna fosfolipidoza dovodi do nekroze ćelija i promena u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula i u manjoj meri distalnih tubula i sabirnih kanalića. Cojocel (1984a) je dokazao da GM smanjuje nivo glomerulske filtracije, kao i tubulsku reapsorpciju, što vodi do nakupljanja proteina niske molekulske mase zajedno sa

povećanim bubrežnim izlučivanjem Na i K. U normalnim uslovima, ovi proteini niske molekulske mase se slobodno filtriraju u glomerulu i gotovo potpuno reapsorbuju u tubulima.

Kisela sredina potpomaže elektrostatičke interakcije između GM i negativno naelektrisanih fosfolipida. Gentamicin se lako vezuje za negativno naelektrisane lizosomalne fosfolipide pošto su izloženi kiselijoj sredini (pH~5,4) nego u drugim organelama. Prisustvo negativno naelektrisanih fosfolipida stimuliše razgradnju fosfatidilholina pomoću kisele sfingomijelinaze, fosfolipaze A1, A2 i lipofosfolipaze (Laurent i sar., 1990). Međutim, ne zna se da li katabolizam drugih polarnih lipida može biti poremećen na sličan način. Intenzitet razgradnje fosfolipida se smanjuje u ćelijama proksimalnih tubula bubrega u prisustvu GM (Laurent i sar., 1990). Ovaj inhibitorski efekat GM na fosfolipaze se karakteriše prisustvom mijeloidnih tela (Laurent i sar., 1982). Kod laboratorijskih životinja kao i kod čoveka, povećanje sadržaja fosfolipida u korteksu bubrega (Giulliano i sar., 1984; De Broe i sar., 1984) i povećanje fosfolipidurije (Ibrahim i sar., 1989) je povezano sa oštećenjem lizozoma. Nagomilani fosfolipidi u lizozomima remete stabilnost ćelije i dovode do pucanja organela i otpuštanja štetnih komponenti uključujući i sam GM. Beauchamp i sar. (1990) su pokazali da poly-L-aspartična kiselina (PAA) može potpuno da spreči nastanak lizosomalne fosfolipidoze izazvane GM kao i znakove nefrotoksičnosti. Kishore i sar. (1990) su pokazali da PAA sprečava fosfolipidozu vezivanjem sa GM u lizozomima.

Nefrotoksični proces je generalno reverzibilan. Nakon prestanka primene GM ćelije bubrežnog epitela se regenerišu. Vrednost glomerulske filtracije se menja tek kada veliki deo (>30%) proksimalnih tubula bude zahvaćen nekrozom (Kourilsky i sar., 1982). Važno je napomenuti da se poremećaj funkcije bubrega javlja kada regeneracija tkiva ne može da nadomesti oštećenje tkiva izazvano štetnim agensom.

Fosfolipidoza uzrokuje čitav niz promena na tubulima: 1) otpuštanje enzima membrane četkastog pokrova i lizosomalnih enzima, 2) oštećenja mitohondrija, 3) tubulsku nekrozu. Giuliano i sar. (1986) su opisali morfološki i funkcionalni oporavak od kortikalne fosfolipidoze i nekroze nakon primene GM. Nakon doze od 10 mg/kg, primećena su mijeloidna tela u lizozomima ćelija proksimalnih tubula, sa blagim padom aktivnosti lizosomalne sfingomijelinaze. Suprotno, doza od 140 mg/kg GM izazvala je trajni gubitak aktivnosti sfingomijelinaze, povećanu koncentraciju fosfolipida u korteksu bubrega i nakupljanje mijeloidnih tela u lizozomima ćelija proksimalnih tubula. Nakon obustave aplikacije GM, primećena je regeneracija tubula posle 24, 48 i 72 sata. Uopšteno, potpun

oporavak može da traje nekoliko nedelja (Matthew i sar., 1992) pošto je bubrežni poluživot za GM nekoliko stotina sati (Appel i sar., 1990).

2.1.2.2. Glomerulski efekti

Glomerul je prvi deo nefrona koji dolazi u kontakt sa štetnim agensom. Gentamicin na više načina ometa filtraciju:

- 1) Gentamicin izaziva kontrakciju mezangijuma (Martinez-Salgado i sar., 2007) i smanjuje glomerulsku filtraciju kao i koeficijent ultrafiltracije (K_f) (Schor i sar., 1981; Dos Santos i sar., 1991);
- 2) Gentamicin takođe stimuliše proliferaciju mezangijalnih ćelija praćenu kompenzatornim povećanjem apoptoze ovih ćelija (Martinez-Salgado i sar., 2005; Martinez-Salgado i sar., 2007);
- 3) uprkos činjenici da GM ne izaziva izrazite morfološke promene u glomerulu, zapaženo je da visoke doze GM dovode do blagog uvećanja glomerula, promene okruglog oblika i gustine i difuznog otoka sa infiltracijom neutrofila (Stojiljkovic i sar., 2008);
- 4) gubitak selektivnosti filtracione membrane zbog neutralizacije negativnog naelektrisanja (De-Barros-e-Silva i sar., 1992) doprinosi proteinuriji, naročito u okolnostima kada je reapsorpcija u tubulima poremećena kao kod nekroze tubula.

Ranije studije su pokazale da GM smanjuje broj i veličinu pora na endotelnim ćelijama u glomerulu (Cojocel i sar., 1984b; Maita i sar., 1984) što potpomaže redukciju filtracije. Ovi efekti su posledica mezangijalne kontrakcije. Gentamicin aktivira kontrakciju mezangijalnih ćelija u kulturi i smanjuje K_f (Rodriguez-Barbero i sar., 1995; Martinez-Salgado i sar., 1997). Gentamicin na više načina povećava koncentraciju kalcijuma u ćeliji i stimuliše kontrakciju mezangijalnih ćelija (Martinez-Salgado i sar., 2007). Opisna kontrakcija mezangijuma pod dejstvom GM nastaje kao posledica:

- 1) sekrecije faktora aktivacije trombocita (PAF) (Rodriguez-Barbero i sar., 1995);
- 2) aktivacije sistema renin-angiotenzin;
- 3) produkcije i dejstva vazokonstrikora kao što su endotelin-1 i tromboksan A2 (Valdivielso i sar., 1999);
- 4) stimulacije CaSR i
- 5) povećanja slobodnih kiseoničnih radikala (SKR) i oksidativnog stresa (Duque i sar., 1992).

Aktivacija fosfolipaze A2 je takođe povezivana sa sintezom nekih od navedenih medijatora i sa efektom GM na mezangijalne ćelije (Martinez-Salgado i sar., 1997).

Fosfolipaza A2 (PLA2) katalizuje nastanak arahidnoske kiseline iz koje se sintetiše, preko ciklooksigenaze, tromboksan A2 koji dovodi do kontrakcije mezangijuma. Faktor aktivacije trombocita se takođe sintetiše iz fosfolipida nastalih aktivnošću fosfolipaze A2. Faktor aktivacije trombocita je važan medijator mezangijalne kontrakcije, koja smanjuje glomerulsku filtraciju i K_f (Lopez-Novoa i sar., 1999; Santos i sar., 2009). Ukoliko se blokira efekat PAF, izostaje kontrakcija mezangijuma i smanjenje glomerulske filtracije izazvane GM (Rodriguez-Barbero i sar., 1992; Rodriguez-Barbero i sar., 1997).

Izgleda da je proliferacija ćelija izazvana GM specifična za tip ćelije (makar u in vitro uslovima). Neki autori su opisali da GM i drugi AG (neomicin B, paromomicin, tobramicin) in vitro smanjuju proliferaciju humanih epidermalnih keratinocita, verovatno preko inhibicije obrade tRNK (Tekos, 2003). Štaviše, GM smanjuje ćelijsku proliferaciju u Kortijevom organu (Bertolaso i sar., 2003) i inhibiše proliferaciju ćelija sličnih humanim osteoblastima (Isefuku i sar., 2003). Različit efekat GM na različite ćelije je možda zavisen od koncentracije korišćenog leka, kao i od eksperimentalnih uslova. Kontraktilni i proliferativni efekti na mezangijalne ćelije su dokazani i za druge nefrotoksične supstance (Rodriguez-Barbero i sar., 2000).

Eksperimentalni podaci ukazuju da je O_2^- uključen u apoptozu mezangijalnih ćelija izazvanu GM, jer sistem ksantin i ksantin-oksidaza povećava apoptozu ćelija slično gentamicinu. Štaviše, sakupljači SKR, superoksid dismutaza (SOD) i katalaza, inhibiraju apoptozu izazvanu GM (Martinez-Salgado i sar., 2004). Sve je više dokaza da stimulacija oksidativnog stresa dovodi do apoptotskog odgovora u mezangijalnim ćelijama (Choi i sar., 2000; Ishikawa i sar., 2000). Apoptoza ćelija glomerula i tubula izazvana interleukinom-1 α i faktorom nekroze tumora- α (TNF- α) je posredovana SKR (Bohler i sar., 2000). U vezi sa tim, O_2^- je prepoznat kao selektivni medijator apoptoze mezangijalnih ćelija pacova izazvane TNF- α (Moreno-Manzano i sar., 2000). Apoptoza mezangijalnih ćelija izazvana GM se takođe karakteriše ranim porastom pro-apoptoskog proteina Bax i kasnijim povećanjem Bcl-2 proteina, koji stimuliše preživljavanje (Martinez-Salgado i sar., 2004). Ushodna regulacija ekspresije Bcl-2 je takođe primećena i u ćelijama ovarijuma kao odgovor na geneticin, AG sličan GM (Tey i sar., 2000). Bcl-2 se nalazi na mestima stvaranja SKR i smatra se da sprečava oksidativno oštećenje. Pokazano je da prekomerna ekspresija Bcl-2 ima protektivno dejstvo na oksidativni stres i apoptozu u ćelijama neurona (Zhong i sar., 1993) i u mezangijalnim ćelijama (Sandau i sar., 2000). I sam Bcl-2 ima funkciju antioksidanta sposobnog da spreči apoptozu (Korsmeyer i sar., 1995). Iz navedenih podataka se da

zaključiti da povećan odnos Bax/Bcl-2 ima važnu ulogu u apoptozi mezangijalnih ćelija izazvanoj GM.

Azot oksid (NO) ima važnu ulogu u lokalnoj regulaciji protoka krvi u korteksu bubrega pacova i može da utiče na intraglomerularnu dinamiku. Azot oksid ispoljava neobičnu raznolikost akcija, delujući kao fiziološki signalni molekul, zaštitnik ćelijskih funkcija i kao toksični medijator (Valdivielso i sar., 2002). Ćelijsko oštećenje posredovano NO se odigrava preko nekoliko mehanizama koji uključuju poremećaj mitohondrijalne respiracije, inhibiciju enzima, nitrozilaciju proteina i lipidnu peroksidaciju putem medijatora kao što su N_2O_3 i peroksinitriti, nastali reakcijom između NO i O_2^- . Ovi procesi se dešavaju kada visoke koncentracije NO nastaju kao rezultat pojačane aktivnosti inducibilne NO sintaze (iNOS) (Gordge i sar., 1998). Može se pretpostaviti da povećanje ekspresije NO sintaze i povećano stvaranje NO ima ulogu u apoptozi mezangijalnih ćelija in vivo (Martinez-Salgado i sar., 2004). Dakle, in vitro studije su pokazale da GM povećava sintezu iNOS iRNK u mezangijalnim ćelijama, zajedno sa povećanjem sinteze NO, i da NO ima antiproliferativnu ulogu u mezangijalnim ćelijama tretiranim GM (Rivas-Cabanero i sar., 1997). U apoptozi mezangijalnih ćelija posredovanoj visokim koncentracijama kalcijuma, NO deluje kao proapoptotski faktor (Rodriguez-Lopez i sar., 1999). Brune (2002) je saopštio da je proapoptotski efekat NO na mezangijalne ćelije delimično posredovan aktivacijom Jun N-terminalne kinaze (JNK). Iako povećana sinteza NO više utiče na apoptozu nego na proliferaciju, O_2^- nastao kao posledica povećane aktivnosti NO sintaze bi mogao da dovede do proliferacije mezangijalnih ćelija (Martinez-Salgado i sar., 2002).

Mora se imati na umu da se i kontrakcija i proliferacija mezangijalnih ćelija u kulturi nakon tretmana GM dešava u in vitro veštačkom sistemu lišenog mnogih neuroendokrinih stimulusa i antiproliferativnog kontakta ćelija-ćelija i ćelija-matriks. Zbog toga tumačenje in vitro rezultata u in vivo uslovima mora biti krajnje obazrivo. Uopšteno, stimuli koji in vitro dovode do kontrakcije kontraktilnih ćelija (miociti, mezangijalne ćelije) isto tako indukuju kontrakciju tih ćelija in vivo. Međutim, slučaj proliferacije je nešto složeniji. Mnogi stimuli su sposobni da izazovu proliferaciju, apoptozu ili druge efekte zavisno od specifičnog stanja i uslova u kojima se nalazi određena ćelija.

Brojni autori su saopštili sposobnost blokatora kalcijumskih kanala da inhibišu kontrakciju i proliferaciju mezangijalnih ćelija indukovanu različitim supstancama (Shultz i sar., 1990; Montero i sar., 1995). Povećanje slobodnog kalcijuma (Ca^{2+}) u citosolu je neophodno za oba procesa u tim ćelijama. Gentamicin povećava intraćelijski Ca^{2+}

stimulacijom ulaska ekstraćeljskog Ca^{2+} i oslobađanjem unutrašnjih depoa (Martinez-Salgado i sar., 2000). Blokator Ca^{2+} kanala verapamil smanjuje kontrakciju i proliferaciju mezangijalnih ćelija izazvanih GM, što dokazuje da povećanje intraćeljskog Ca^{2+} ima važnu ulogu u kontraktilnim i proliferativnim efektima ovog antibiotika (Martinez-Salgado i sar., 2000). Tokom razvoja gentamicinske nefrotoksičnosti, povećana koncentracija kalcijuma u ćelijama aktivira fosfolipaze, nukleaze i proteaze koje remete funkciju ćelijske membrane i doprinose daljem oštećenju. Protektivno dejstvo verapamila se bazira na inhibiciji ulaska kalcijuma u ćelije. Verapamil ometa i oslobađanje kalcijuma iz endoplazminog retikuluma. Na ovaj način, verapamil sprečava nefrotoksično dejstvo gentamicina, koje u osnovi ima preraspodelu intraćeljskog kalcijuma (Stojiljković i sar., 2008). Verapamil takođe ispoljava protektivni efekat na deskvamaciju tubulskog epitela u gentamicinskoj nefrotoksičnosti kod pacova (Veljković i sar., 2000).

Dosadašnje in vivo i in vitro studije su jasno pokazale ulogu SKR u tubulskim i glomerulskim efektima GM. In vivo, SKR su označeni kao medijatori nekroze proksimalnih tubula i akutne bubrežne insuficijencije izazvane GM (Du i sar., 1994). Štaviše, sakupljači SKR su se pokazali korisnim u smanjenju razvoja bubrežnog oštećenja nakon davanja endotoksina i GM (Zurovsky i sar., 1995). Administracija antioksidanata kao što su superoksid dismutaza (SOD) ili dimetil-tiourea sprečavalo je smanjenje glomerulske filtracije izazvane GM (Nakajima i sar., 1994). Primena SOD kod pacova tretiranih GM dovodi do povećanja bubrežnog protoka krvi. Zbog toga se smatra da superoksidni anjon (O_2^-) ima ulogu u vazokonstrukciji izazvanoj GM (Nakajima i sar., 1994).

Uloga SKR, bilo kao fizioloških sekundarnih glasnika ili induktora oksidativnog stresa (ili oba), je sve više evidentna u aktivaciji i oštećenju mezangijalnih ćelija. Duque i sar. (1992) su pokazali da je H_2O_2 sposoban da izazove kontrakciju mezangijalnih ćelija in vitro, kao i povećanje preglomerulskog otpora in vivo. Uloga SKR u kontrakciji i proliferaciji mezangijalnih ćelija izazvanih GM je dokazana i in vitro. Pokazano je da GM dovodi do povećanja produkcije O_2^- i aktivnosti SOD. Takođe je poznato da intraćeljski sakupljači SKR, SOD i katalaza, inhibiraju kontrakciju i proliferaciju mezangijalnih ćelija izazvanu GM (Martinez-Salgado i sar., 2002). Slični rezultati su dobijeni i za prirodni antioksidans flavonoid trans-resveratrol (Morales i sar., 2005). Produkcija O_2^- izazvana GM u ovim ćelijama je delom posledica aktivnosti NADP(H) oksidaze (Martinez-Salgado i sar., 2002). Drugi mogući izvor O_2^- može biti aktivacija fosfolipaze A_2 (Pfeilschifter i sar., 1997). To je značajno jer GM aktivira fosfolipazu A_2 zavisnu od kalcijuma (Martinez-Salgado i sar.,

1997). Sve je više dokaza da SKR mogu biti pokretači mehanizama koji za posledicu imaju proliferaciju mezangijalnih ćelija (Ali i sar., 1995). Martinez-Salgado i sar. (2002) su pokazali da oksidativni stres izazvan GM ne utiče na strukturu i funkciju ćelijske membrane. Ipak, ne mogu se zanemariti citotoksični efekti izazvani oksidativnim stresom nakon tretmana GM. Dokazano je da oksidativni stres izazvan dodatkom ksantina sa ksantin oksidazom dovodi do apoptoze mezangijalnih ćelija u kulturi; dok je dodatak SOD i katalaze u medijum sprečio nastanak apoptoze mezangijalnih ćelija izazvane GM (Martinez-Salgado i sar., 2004).

Takođe je pokazano da administracija trans-resveratrola, snažnog inhibitora SKR sa jakim antiksidativnim dejstvom i inhibitora lipidne peroksidacije (Baur i sar., 2006), značajno redukuje smanjenje glomerulske filtracije i protoka krvi kroz bubrege izazvano davanjem GM kod pacova (Morales i sar., 2002). Protektivno dejstvo trans-resveratrola na funkciju bubrega je udruženo sa prevencijom lipidne peroksidacije ili inhibicijom stvaranja O_2^- (Morales i sar., 2005). Dakle, iz navedenih podataka može se zaključiti da povećanje SKR ima važnu ulogu u nastajanju pojačane kontraktilnosti i proliferacije mezangijalnih ćelija izazvane GM.

Kod pacova tretiranih GM, proliferacija i apoptoza mezangijuma se odigravaju u isto vreme. Oba procesa očigledno kompenzuju jedan drugi, jer nije dokazana promena broja ćelija u mezangijumu (Martinez-Salgado i sar., 2004). Proliferacija mezangijuma je posredovana aktivacijom AP-1 zavisnom od kalcijuma (Martinez-Salgado i sar., 2005). Apoptoza mezangijalnih ćelija je posredovana porastom SKR (Martinez-Salgado i sar., 2005; Martinez-Salgado i sar., 2004) i verovatno hiperprodukcijom azot oksida (NO) (Martinez-Salgado i sar., 2007). Gentamicin stimuliše ekspresiju inducibilne sintaze NO (iNOS) i stvaranje NO u izolovanom glomerulu i mezangijalnim ćelijama (Rivas-Cabanero i sar., 1997; Leung i sar., 2004). Povećana količina NO, naročito tokom oksidativnog stresa, reaguje sa superoksidnim anjonom i stvara peroksinitrit. Nastali peroksinitrit izaziva nitrozativni stres i citotoksičnost (Pedraza-Chaverri i sar., 2004). Uloga ravnoteže između apoptoze i proliferacije u mezangijumu nije sasvim jasna. Verovatno je jedno homeostatska posledica drugog, da bi se održao integritet tkiva. Primarni efekt in vivo bi bila apoptoza sa posledičnom proliferacijom (Martinez-Salgado i sar., 2007).

2.1.2.3. Vaskularni efekti

Gentamicin dovodi do smanjenja protoka krvi kroz bubrežne (Hishida i sar., 1994; Morales i sar., 2002), što je posledica povećanog otpora bubrežne vaskulature a ne smanjenog perfuzionog pritiska (Klotman i sar., 1983). Smanjen protok krvi kroz bubrežne izaziva smanjenje glomerulske filtracije (Persson i sar., 1997), i smanjuje dostupnost kiseonika i ATP u ćelijama tubula. U početku je smanjenje protoka krvi posledica aktivacije tubuloglomerulske sprege zbog poremećene reapsorpcije u tubulima, da bi se sprečio gubitak vode i elektrolita. Kasnije, nakon adaptacije regulatornog mehanizma, protok se smanjuje zbog produkcije vazokonstriktora u krvnim sudovima bubrega i mezangijumu kao i direktnim efektom GM na vaskularne ćelije.

Azot oksid nastao u endotelu u malim količinama vrši fiziološku vazodilataciju, dok prekomerna produkcija NO zbog povećane ekspresije iNOS izaziva citotoksične efekta na okolnim ćelijama. Azot oksid reaguje sa superoksidnim anjonom i nastaje peroksinitrit, koji oštećuje proteine i ćelije. Nastali peroksinitrit pretvara endotelnu NO sintazu u disfunkcionalni enzim koji stvara superoksid i doprinosi vaskularnom oksidativnom stresu (Forstermann i sar., 2010).

Gentamicin takođe ometa sposobnost relaksacije glatkomišićnih ćelija krvnog suda, verovatno izazivajući vazokonstrikciju i smanjen protok krvi kroz bubrežne (Seçilmiş i sar., 2005). Međutim, pokazano je da GM relaksira izolovane, prekontrahovane arterije, inhibicijom fosfolipaze C, protein kinaze C i blokadom kalcijumovih kanala (Gergawy i sar., 1998; Wickman i sar., 2001).

Gentamicin indukuje marginaciju leukocita u krvnim sudovima retine koja dovodi do kongestije i infarkta. Navedeni efekat nastaje 48 do 72 časa nakon tretmana (Hines i sar., 1993). Može se pretpostaviti da se nešto slično dešava i u bubregu, naročito u snažnom prozapaljenskom okruženju.

Opšte je prihvaćen stav da je gentamicinska nefrotoksičnost primarno tubulopatijska u kojoj su oštećenje i disfunkcija tubula glavni razlozi bubrežne insuficijencije. To može objasniti neke kliničke manifestacije, kao što su proteinurija, enzimurija i poremećaji elektrolita. Međutim, u odsustvu opstrukcije tubula, samo oštećenje tubula je nedovoljno za smanjenu glomerulsku filtraciju bez dodatnih ekstratubularnih dešavanja. Poremećaj funkcije tubula dovodi do gubitka tečnosti i elektrolita što aktivira tubuloglomerulsku povratnu spregu, koja smanjuje protok krvi i glomerulsku filtraciju.

2.1.3. Centralna uloga oksidativnog stresa i zapaljenja

Tretman GM dovodi do oksidativnog stresa u ćelijama tubula, i in vivo (Karatas i sar., 2004) i u kulturi ćelija (Juan i sar., 2007). Nastali oksidativni stres je posredovan hidroksilnim radikalima iz vodonik peroksida i superoksid anjona (Basnakian i sar., 2002). Smatra se da oksidativni stres ima ključnu ulogu u GM nefrotoksičnosti (Ali i sar., 1995; Tajiri i sar., 1995; Abdel-Naim i sar., 1999). To je zasnovano na brojnim eksperimentalnim studijama koje su pokazale da kotretman sa različitim antioksidansima štiti od oštećenja bubrega izazvanog GM (Cuzzocrea i sar., 2002; Morales i sar., 2002; Martinez-Salgado i sar., 2002; Ali i sar., 2003; Stojiljkovic i sar., 2012b). Međutim, Stratta i sar. (1994) su pokazali da suplementacija glutationom (GSH) nije imala efekta na gentamicinsku nefrotoksičnost, uprkos smanjenju lipidne peroksidacije i povećanju nivoa GSH u bubregu.

Gentamicin direktno povećava stvaranje SKR u mitohondrijama (Morales i sar., 2010). Nastali slobodni kiseonički radikali:

- 1) inhibiraju transportni lanac elektrona, ćelijsko disanje i stvaranje ATP;
- 2) stimulišu otpuštanje citohroma c i faktora koji dovodi do apoptoze;
- 3) oštećuju mnoge ćelijske molekule uključujući proteine, lipide, nukleinske kiseline i tako remete funkciju ćelije i dovode do njene smrti;
- 4) doprinose kontrakciji mezangijuma i krvnih sudova;
- 5) dovode do stresa različitih organela, kao što je endoplazmatski retikulum;
- 6) učestvuju u zapaljenju;
- 7) inhibiraju transmembranski protok natrijuma, preko oksidativne inhibicije $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpe što dovodi do ćelijskog bubrenja, gubitka integriteta membrane i nekroze.

Kao što je ranije rečeno, sintetisani NO od strane iNOS može da reaguje sa superoksid anjonom i da stvori peroksinitrit, jako reaktivni radikal koji doprinosi oštećenju ćelije i smanjenoj vaskularnoj relaksaciji.

Najverovatnije je efekat antioksidanata rezultat udruženog dejstva na različitim nivoima:

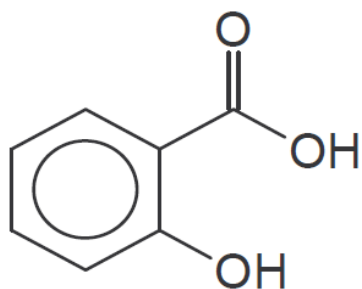
- 1) ublažavanje direktnog citotoksičnog dejstva GM;
- 2) inhibicija vazokonstrukcije i kontrakcije mezangijuma;
- 3) antizapaljensko dejstvo.

Međutim, ima malo informacija o uticaju antioksidanata na direktno citotoksično dejstvo GM na ćelije tubula bubrega u kulturi. Juan i sar. (2007) su saopštili protektivno

dejstvo u takvim uslovima. U svom radu navedeni autori su pokazali da je tetrametilpirazin smanjio nakupljanje SKR i apoptozu u ćelijama bubrega pacova NFK-52E.

2.2. Salicilna kiselina

Salicilna kiselina (SAL) spada u grupu fitohemikalija sa blagotvornim dejstvom na ljudsko zdravlje. Salicilna kiselina je fenolna komponenta prisutna u biljkama, gde ima centralnu ulogu u odbrani od infekcije izazvane patogenim agensima (Dempsey i sar., 1994; Dangel i sar., 1998). Nalazi se u različitim količinama u voću, povrću, biljkama i začinima. Mnogo poznatija je kao glavni metabolit i aktivna komponenta aspirina, anti-zapaljenskog leka koji se koristi u kliničkoj praksi preko 100 godina (Stanley i sar., 2000). Relativno skoro je prihvaćeno da hronična upotreba aspirina u niskim dozama predstavlja efektivno sredstvo u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i kolorektalnog karcinoma (Sanmuganathan i sar., 2001; Gasche i sar., 2004). To podržava hipotezu da povoljni efekti voća i povrća na zdravlje delimično zavise od prisustva SAL u njima.



Slika 2. Salicilna kiselina

Još je Hipokrat opisao analgetičko dejstvo kore vrbe. Koristila se kroz istoriju u narodnoj medicini za ublaženje bola. Godine 1859. izolovana je i sintetisana aktivna komponenta SAL. Salicilna kiselina je kristalna organska karboksilna kiselina koja se dobija iz kore vrbe. Rastvorljiva je u alkoholu, dok se u vodi slabo rastvara. Pošto je imala štetno dejstvo na sluzokožu želudca, 1897. god. Felix Hoffman je sintetisao pufervisani oblik u vidu acetilsalicilne kiseline (Schindler i sar., 1978).

2.2.1. Inhibicija sinteze prostaglandina

Najbolje proučeno i opisano dejstvo SAL je inhibicija sinteze prostaglandina (PG) (Vane i sar., 1971). Prostaglandini (PG) su članovi familije lipida koji nastaju iz polinezasićenih masnih kiselina pomoću enzima ciklooksigenaze (COX). Skoro sve ćelije u ljudskom telu mogu da stvaraju PG iz arahidonske kiseline koja se nalazi u sklopu fosfolipida ćelijske membrane. Nakon sinteze, PG deluju kao autokrini i parakrini lipidni medijatori u održanju lokalne homeostaze u organizmu. Prostaglandini imaju brojne fiziološke uloge od kojih su najvažnije: a) zaštita gastrointestinalnog trakta; b) održanje bubrežne homeostaze; c) normalna funkcija uterusa, implantacija embriona i porođaj; d) regulisanje funkcije sna i

buđenja i e) regulisanje telesne temperature (Murray i sar., 1988). Sinteza PG je generalno vrlo mala u tkivu koje nije zahvaćeno procesom zapaljenja. Međutim, tokom zapaljenske reakcije dolazi do izrazite promene u koncentraciji i vrsti PG.

Ranije se smatralo da SAL sprečava sintezu PG tako što inhibira COX (Ohki i sar., 1979). Međutim, 1999. godine predložen je novi način inhibicije sinteze PG pomoću aspirina i SAL. Xu i sar. (1999) su dokazali da SAL i aspirin ostvaruju svoja anti-zapaljenska dejstva preko supresije transkripcije gena za COX. Većina farmakoloških dejstava salicilata se može objasniti inhibicijom sinteze PG. Međutim, pokazano je da oni deluju i preko dodatnih mehanizama, nezavisnih od COX (Tegeder i sar., 2001).

2.2.2. Inhibicija nuklearnog faktora kapa B

Pokazano je da visoke koncentracije salicilata reaguju sa kinazama, uključujući mitogen aktivisanu protein-kinazu (MAPK). Većina autora ukazuje da je reakcija salicilata sa kinazama praćena inhibitornim efektima. To može biti jedan od razloga za činjenicu da salicilati deluju inhibitorno na nekoliko nuklearnih transkripcionih faktora. Među transkripcionim faktorima, fokus istraživanja je na interakciji između salicilata i nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B). Navedeni faktor je ključni element u odgovoru ćelije na zapaljenski stimulus. Inhibicija NF- κ B pomoću salicilata je dokazana od strane Kopp-a i Ghosh-a (1994) i mnogim kasnijim studijama (Yin i sar., 1998; Bayon i sar., 1999). Imajući u vidu da je nefrotoksičnost izazvana GM posredovana i zapaljenskom komponentom (Kalayarasan i sar., 2009), i da zapaljenski proces zavisi od aktivnosti NF- κ B, za spekulaciju je da će materije koje smanjuju aktivnost NF- κ B smanjiti i stepen nefrotoksičnosti (Tugcu i sar., 2006).

Familija transkripcionih faktora Rel/NF- κ B uključuje pet ćelijskih proteina: c-Rel, RelA (p65), RelB, p50 i p52. Kao homodimeri i heterodimeri, Rel/ NF- κ B proteini se vezuju za ciljna mesta na DNK, nazvana κ B mesta, i direktno regulišu transkripciju gena. Svaka ćelija može imati čitav niz različitih kompleksa dimera, od kojih je najčešći NF- κ B i sastoji se od p50/RelA heterodimera. Pošto NF- κ B reguliše ekspresiju proinflamatornih enzima, citokina, hemokina, imunoreceptora i ćelijskih adhezionih molekula, često se označava kao centralni medijator imunskog odgovora (Pahl i sar., 1999; Baeuerle i sar., 1996). Zbog svoje ključne uloge, predloženo je da inhibicija NF- κ B pomoću salicilata znatno doprinosi njihovom anti-zapaljenskom dejstvu (Kopp i sar., 1994; Bayon i sar., 1999).

NF- κ B je uključen u kontrolu transkripcije mnogih gena čija funkcija nije samo neposredni imunski odgovor. Zato NF- κ B pre predstavlja regulator odgovora na stres a ne

centralni medijator imunskog odgovora. Otuda NF- κ B takođe funkcioniše i kao regulator apoptoze, bilo kao induktor ili, češće, kao inhibitor apoptoze. Da li će NF- κ B stimulisati ili inhibisati apoptozu zavisi od vrste ćelije i tipa induktora.

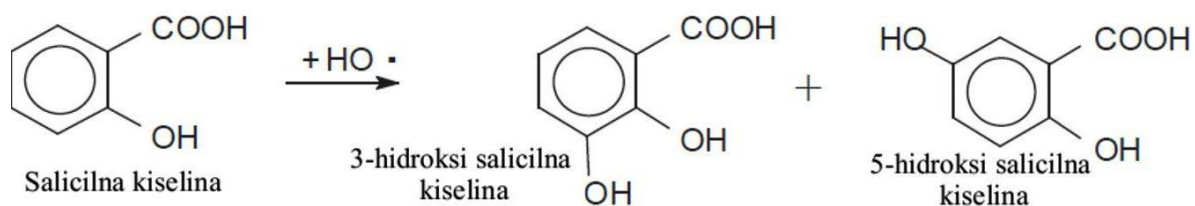
NF- κ B transkripcioni faktori se regulišu primarno interakcijom sa inhibitorynim I κ B proteinima. U većini ćelija NF- κ B je u citoplazmi u inaktivnom stanju vezan za I κ B. Većina aktivatora NF- κ B čini to preko proteolize I κ B. Glavni regulatorni korak u ovom mehanizmu uključuje aktivaciju IKK. Oslobođeni NF- κ B se onda premešta iz citoplazme u jedro, gde se vezuje za κ B mesta u promotornom regionu ciljnih gena i reguliše transkripciju.

Stimulacija ćelija lipopolisaharidom (LPS) u prisustvu salicilata dovodi do izostanka proteolize I κ B α izazvane LPS, što ukazuje da je primećena inhibicija NF- κ B posredovana inhibicijom fosforilacije i/ili proteolize I κ B (Kopp i sar., 1994). U serumu, koncentracije salicilata od 1 do 2 mM su neophodne za anti-zapaljensko dejstvo dok su koncentracije veće od 6 mM toksične (Cianferoni i sar., 2001).

Za SAL je dokazano da ima antioksidativna svojstva. Pošto SAL služi kao hemijska zamka za hidroksilni radikal, najštetniji SKR, pokazano je da može da ublaži oštećenje tkiva izazvano hipoksijom/reoksigencijom (Colantoni i sar., 1998). Međutim, nije sasvim jasno da li antioksidativno dejstvo salicilata ima uticaj na njihovo anti-zapaljensko dejstvo.

Na primer, dejstvo SAL na adheziju neutrofila se može objasniti inhibicijom aktivacije ekstracelularne MAP kinaze neophodne za dejstvo integrina (Pillinger i sar., 1998). Takođe, pokazano je i da SAL ometa aktivaciju transkripcionih faktora kao što je NF- κ B (Kopp i sar., 1994). Jedna od studija je dokazala nov farmakološki efekat SAL preko inhibicije transkripcije nekoliko gena za citokine, koji imaju važnu ulogu u imunom i zapaljenskom odgovoru (Aceves i sar., 2004). Dakle, moguće je da postoje još neki, za sada nepoznati mehanizmi putem kojih SAL ispoljava svoje dejstvo.

Dokazano je da salicilna kiselina inhibira oksidativni stres. Pošto se smatra da u osnovi gentamicinske nefrotoksičnosti stoji oksidativni stres izazvan prekomernom produkcijom SKR, opisano dejstvo SAL predstavlja potencijal za umanjenje neželjenog efekta GM na bubrege. Sagone i sar. (1987) su pokazali da SAL reaguje sa OH \cdot radikalima u granulocitima i stvara stabilne metabolite (Slika 3).



Slika 3. Mehanizam pomoću koga salicilna kiselina deluje kao sakupljač hidroksilnih slobodnih radikala (Auroma i sar., 1988).

Takođe, SAL smanjuje nivo O_2^- delovanjem na aktivnost NADPH koju stimuliše protein kinaza c i tako smanjuje SKR u humanim endotelnim ćelijama, in vitro (Dragomir i sar., 2004).

Dokazano je da SAL vezuje gvožđe (Fe^{2+}) (Kotrly i sar., 1985). To je važno jer Fe^{2+} ima značajnu ulogu u procesu lipidne peroksidacije. Gvožđe ne stvara samo hidroksilne radikale preko Fentonove reakcije, već učestvuje u stvaranju peroksi i alkoksi radikala (Halliwell i sar., 1990).

2.2.3. Anti-zapaljensko dejstvo

Smatra se da aspirin i SAL poseduju podjednako anti-zapaljensko dejstvo (Abramson i sar., 1989). Pošto SAL ne inhibira značajno COX-1 ili COX-2, anti-zapaljensko dejstvo se ne ostvaruje preko direktne inhibicije aktivnosti COX. Štaviše, aspirin ima kratak polu-život (oko 20 min) u krvi. Deacetilacijom aspirina nastaje SAL, koja ispoljava in vivo efekte. Pokazano je da su anti-zapaljenska dejstva SAL posredovana inhibicijom funkcije leukocita (Abramson i sar., 1989) i inhibicijom ekspresije različitih prozapaljenskih gena.

Inducibilna NOS ima važnu ulogu u procesu zapaljenja i povrede tkiva. Kao i COX-2, ekspresija iNOS je indukovana citokinima i LPS. Ovaj enzim katalizuje stvaranje NO koji dalje ispoljava svoja dejstva preko aktivacije guanil ciklaze, kao i putem nitracije i nitrozilacije proteina. Štaviše, NO reaguje sa superoksidnim jonom i stvara peroksinitrit. Peroksinitrit je jako reaktivan i sposoban je da ošteti tkiva. Obzirom da GM povećava sintezu NO u bubregu putem indukcije iNOS (Rivas-Cabanero i sar., 1997), od posebne važnosti je saopštenje da natrijum salicilat može da inhibiše ekspresiju iNOS. Utvrđeno je da SAL inhibira ekspresiju iNOS u alveolarnim makrofagima pacova stimulisanu LPS i interferonom- γ (IFN- γ) (Aeberhard i sar., 1995; Kepka-Lenhart i sar., 1996). Farivar i sar. (1996) su pokazali inhibiciju iNOS pomoću natrijum salicilata u primarnim neonatalnim fibroblastima pacova sa IC_{50} od 750 μ M. Ryu i sar. (2000) su saopštili supresiju iNOS ekspresije pomoću SAL u RAW 264.7 ćelijama na posttranslacionom ili translacionom nivou ali ne i

transkripcionom. Sakitani i sar. (1997) su takođe saopštili inhibiciju iNOS ekspresije u hepatocitima na translacionom a ne transkripcionom nivou. Iako je u većini studija nađeno da SAL u farmakološkim koncentracijama inhibira ekspresiju iNOS, neke studije su utvrdile inhibitorne efekte samo u supra-terapeutskim dozama (Chung i sar., 2000). Paradoksalno, Nishio i sar. (1998) su pokazali suprotan efekat salicilata na iNOS ekspresiju. Oni su pronašli da natrijum salicilat povećava sintezu iNOS i NO u vaskularnim glatkomišićnim ćelijama. Zabeleženi efekat je međutim bio slab. Ovi protivurečni nalazi sugerišu da efekat salicilata na ekspresiju iNOS zavisi od tipa ćelije, uslova i stimulusa.

Postoje brojne studije koje ukazuju da matriks metaloproteinaze (MMP) imaju ulogu u akutnom oštećenju bubrega i u promenama na glomerulima i epitelnim ćelijama tubula. Povećanje aktivnosti MMP-2 je dokazano u modelu oštećenja ishemijom-reperfuzijom, kao i nakon tretmana GM (Romero i sar., 2009). Morin i sar. (1999) su saopštili da natrijum salicilat u dozi 2 mM poništava ekspresiju stromelizina indukvanu TNF α .

Natrijum salicilat se pokazao uspešnim i u supresiji akutnih zapaljenskih reakcija kod životinja (Cronstein i sar., 1999). Abramson i sar. (1994) su pokazali da aspirin inhibira funkciju neutrofila. Sugerisano je da je to posledica indukcije sinteze adenozina (Catania i sar., 1991).

Endotelna NOS (eNOS) je stalno eksprimirana na endotelnim ćelijama krvnih sudova. Ona stvara fiziološke količine NO za održanje homeostaze vaskularnog tonusa i reaktivnosti trombocita. Aktivnost eNOS se reguliše posttranslacionom modifikacijom kao i na nivou transkripcije (Grosser i sar., 2003). Pokazano je da SAL u farmakološkim koncentracijama aktivira eNOS i povećava sintezu NO u endotelnim ćelijama (Polte i sar., 1997). Ovi rezultati sugerišu da salicilati imaju protektivnu ulogu u očuvanju integriteta krvnih sudova (Fleming i sar., 2003).

Oštećenje tkiva ishemijom/reperfuzijom, infekcijom, zapaljenjem i metaboličkim bolestima je praćeno pojačanom ekspresijom proteina toplotonog šoka (HSP) (Currie i sar., 1993; Mestrlil i sar., 1994). Pomenuti molekuli imaju ulogu da spreče širenje povrede i pomognu oporavak tkiva (Martin i sar., 1992; Gething i sar., 1992). Prekomerna ekspresija HSP štiti ćelije od različitih štetnih uticaja koji uključuju oksidativni stres, ishemiju, sepsu, kao i GM nefrotoksičnost (Li i sar., 1992; Jaattela i sar., 1992; Sanchez i sar., 1992; Cheng i sar., 1998). Za delovanje HSP odgovorna je familija heat shock transkripcionih faktora (HSF). Ovi transkripcioni faktori se vezuju za specifični element na promoteru HSP i dovode

do ekspresije HSP (Morimoto i sar., 1993; Lis i sar., 1993). Jurivich i sar. (1992) su saopštili da natrijum salicilat povećava vezivanje HSF za DNK. Međutim, salicilati nisu povećali ekspresiju HSP. Ovakvi rezultati ukazuju da salicilati samo delimično aktiviraju HSP. Jurivich i sar. (1995) su uporedili uticaj salicilata i toplote na vezivanje HSF za DNK. Njihovi nalazi su otkrili da salicilati dovode do prolaznog povećanog vezivanja HSF-1 za DNK dok je toplota dovela do trajnog vezivanja HSF-1 za DNK (Jurivich i sar., 1995). Soncin i sar. (1996) su našli recipročne efekte pro-zapaljenskih stimulusa i anti-zapaljenskih lekova na vezivanje HSF-1 sa DNK u monocitima. Pošto HSF-1 deluje inhibitorno na citokine, Housby i sar. (1999) su ispitivali dejstvo salicilata na aktivnost HSF-1 i ekspresiju citokina. Utvrđena je korelacija između aktivacije vezivanja HSF-1 za DNK i smanjenja koncentracije IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 i TNF- α (Housby i sar., 1999). Ovi rezultati ukazuju da aktivacija HSF-1 pomoću salicilata ima veći značaj u kontroli ekspresije pro-zapaljenskih gena u odnosu na ekspresiju HSP. Međutim, većina studija do sada je koristila HSP-70 kao metu transkripcione aktivacije HSF-1. Iako aktivacija HSF-1 pomoću salicilata nije povezana sa ekspresijom HSP-70, moguće je da su drugi HSP mete HSF-1.

2.3. Selen

Selen (Se) je 1817. godine otkrio švedski hemičar Jöns Jacob Berzelius, i dao mu ime u čast grčke boginje meseca, Selene (Arner i sar., 2010; Comasseto i sar., 2010). Selen je univerzalni esencijalni element u tragovima. Važan je za mnoge ćelijske procese. Selen može da deluje kao faktor rasta (Ramauge i sar., 1996). Ima snažna antioksidativna (Behne i sar., 2000) i antikancerska (Combs i sar., 2001) svojstva, i neophodan je za normalnu funkciju štitne žlezde (Ramauge i sar., 1996) i imunskog sistema (Roy i sar., 1995). U prvoj polovini 20. veka Se je zbog svoje toksičnosti smatran nepoželjnim elementom za više organizme uključujući i čoveka. Toksičnost Se je prvi put potvrđena 1933. godine kod životinja koje su konzumirale biljke roda *Astragalus*, *Xylorrhiza*, *Oonopsis* i *Stanleya* u zapadnim predelima Sjedinjenih Američkih Država. Ove biljke imaju sposobnost da nakupljaju velike količine Se iz zemlje, pa se zato i zovu biljke sakupljači Se ili biljke indikatori Se (Oldfield i sar., 1987). U drugoj polovini 20. veka dogodio se značajan preokret u razumevanju važnosti Se u ljudskoj ishrani. Prvi takvi radovi potiču od Schwarz-a i Foltz-a (1957) koji su pokazali da je Se u jako niskim koncentracijama neophodan za život. Kod pacova koji su konzumirali hranu bez vitamina E, dodatak Se u niskim koncentracijama sprečio je pojavu nekroze jetre. Sledeći dokaz važnosti Se usledio je nakon otkrića ključne uloge Se u sintezi glutathion peroksidaze

(GPx) (Rotruck i sar., 1973), tioredoksin reduktaze (TRxR) i drugih enzima koji pružaju zaštitu od oksidativnog stresa. Nakon 1973. godine potvrđeno je u brojnim istraživanjima da su selenoproteini i/ili selenoenzimi uključeni u metabolizam svih viših kičmenjaka (Rayman i sar., 2000).

Iako se još uvek ne poznaje u potpunosti metabolizam Se u organizmu, zna se da je Se uglavnom prisutan u obliku Se-cisteina u tkivnim proteinima (Sunde i sar., 2000). U našem organizmu ima ukupno oko 10 do 20 mg Se. Polovina te količine nalazi se u skeletnim mišićima, mada organi poput bubrega, jetre i testisa imaju najveću koncentraciju Se. Čelije koje najviše koriste Se su čelije imunskog sistema, eritrociti i trombociti. Selen se uglavnom eliminiše iz organizma putem urina (Burk i sar., 2002). Selen iz hrane se dobro resorbuje iz digestivnog trakta (procenat apsorpcije ide od 50% za neorganske do 100% za organske forme) (Navarro-Alarcon i sar., 2005).

Preporučeni dnevni unos Se je 1989. god. bio 50-70 µg/dan, dok je kasnije snižen na 55 µg/dan za zdrave odrasle ljude (El-Bayoumy, 2001 i sar.; Whanger i sar., 2004). Ova količina Se obezbeđuje potrebe za 25 poznatih (Stadtman i sar., 2002) selenoproteina kao i za opšte zdravlje čoveka (Rayman i sar., 2000). Opseg između nedostatka, esencijalnosti i toksičnosti za Se je vrlo uzak.

2.3.1. Antioksidativna aktivnost selena

Ravnoteža između pro-oksidanata i antioksidanta je važna za život i funkcionisanje aerobnih organizama. Poremećaj ravnoteže u korist pro-oksidanata i/ili na štetu antioksidanata koji može dovesti do oštećenja naziva se oksidativni stres (Sies i sar., 1986). Oksidativni stres predstavlja stanje kada stvaranje SKR u sistemu prevazilazi sposobnost sistema da ih neutrališe i eliminiše. Poremećaj ravnoteže može nastati zbog nedostatka antioksidanata ili zbog prekomerne produkcije SKR. Ukoliko se ne kontrolišu, višak SKR može da ošteti ćelijske lipide, proteine ili DNK i tako poremeti normalne ćelijske funkcije. Slobodni kiseonički radikali su nusproizvodi ćelijskog metabolizma i primarno nastaju isticanjem elektrona u mitohondrijama tokom oksidativne fosforilacije. Glavni enzimski izvori SKR u humanim ćelijama su NAD(P)H oksidaze, ksantin oksidaza, mijeloperoksidaza, ciklooksigenaza i lipooksigenaza.

Takođe, i drugi enzimi u ćeliji udruženi sa ćelijskom membranom ili organelama su opisani kao izvori SKR (Meier i sar., 1989). Spoljašnji izvori SKR su redukujući ksenobiotici (Kappus i sar., 1981) kao i zračenje, npr. ultraljubičasto (Brenneisen i sar., 1998). Sa druge

strane, male količine SKR moduliraju prenos signala u ćeliji, kao što je i dokazano za insulin (Goldstein i sar., 2005). Mnogi hormoni, faktori rasta i citokini pokreću stvaranje SKR nakon vezivanja za svoje receptore (Thannickal i sar., 2000). Imajući u vidu novu ulogu SKR kao dela intraćelijske signalne kaskade, definicija oksidativnog stresa se od skoro promenila u „poremećaj redoks signalizacije i kontrole,, (Sies i sar., 2007).

Aerobni organizmi su tokom evolucije razvili odbrambene mehanizme koji ih štite od oksidativnog stresa izazvanog SKR (Valko i sar., 2004). Antioksidativna zaštita je organizovana u tri kategorije: prevencija, zaustavljanje i popravljanje (Sies i sar., 1993). Prva linija odbrane je prevencija stvaranja reaktivnih molekula u fizičkom ili biohemijskom smislu. Glavni način za zaustavljanje dejstva štetnog agensa je isključivanje iz dalje aktivnosti. Zaštita od oksidativnog stresa uključuje i popravku oštećenja, kao npr. popravka DNK i proteoliza (Sies i sar., 1993). Selen i sistem glutationa imaju ulogu u antioksidativnoj zaštiti uglavnom na nivou zaustavljanja (presretanja).

Prvi dokaz o ulozi Se u zaštiti od oksidativnog stresa objavljen je 1973. god. kada je pokazano da Se učestvuje u sintezi GPx (Rotruck i sar., 1973). Ovaj enzim je efektivan u redukciji H_2O_2 i lipidnih peroksida. Takođe, Se je komponenta nekoliko drugih selenoproteina koji imaju važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti. Jedan od njih, TRxR je ključni enzim u metabolizmu Se (Lee i sar., 2000; Madeja i sar., 2005). Tiodoksinska reduktaza je enzim uključen u redukciju ćelijskih supstrata (Sunde i sar., 2000). Davanje visokih doza Se pacovima direktno povećava aktivnost TRxR (Thorne i sar., 2003). Selenoprotein P štiti endotelne ćelije od dejstva SKR (Allan i sar., 1999; Ganther i sar., 1999). Svaki od ovih selenoproteina sadrži Se u obliku Se-cisteina. Adekvatna ekspresija nekih selenoproteina, kao npr. Se protein P, zahteva veće količine Se u ishrani (Xia i sar., 2005). Takođe, neke osobe zahtevaju veće količine Se za efikasnu sintezu Se proteina (Rayman i sar., 2005). Ove individualne razlike u ekspresiji Se proteina potiču od polimorfizma pojedinačnih nukleotida u genima za Se proteine koji određuju efikasnost ugradnje Se u selenoproteine (Ichimura i sar., 2004; Apostolou i sar., 2004).

Selen može da zaštiti životinje od štetnog dejstva teških metala poput žive (Hg), olova (Pb), kadmijuma (Cd) i srebra (Thorne i sar., 2003; Mousa i sar., 2007; Kibriya i sar., 2007; Cabanero i sar., 2007). U zadnje vreme razmatraju se intenzivno i uticaji Se na genom i proteom. U jednoj studiji, Kibriya (2007) je našao da nakon davanja Se životinjama dolazi do pojačane ekspresije mnogih gena. Wangher (2001) je pokazao da Se sprečava neurotoksičnost Hg, Cd i Pb tako što sprečava njihovo nakupljanje u mozgu.

2.3.2. Selen kao prooksidans

Efekat selen na ćelije zavisi od primenjene forme i doze. U umereno visokim dozama Se inhibira rast ćelija i ima prooksidantni efekat jer dovodi do stvaranja superoksida. U visokim koncentracijama uglavnom neorganskih formi, Se deluje toksično zbog kidanja lanca DNK (Combs i sar., 1998). Prooksidantno delovanje Se izgleda da ima i pozitivnu i negativnu ulogu (Stewart i sar., 1999). Smatra se da je oksidativni stres glavni mehanizam citotoksičnosti Se i uključen je u sposobnost Se da izazove apoptozu (Kim i sar., 2004; Drake i sar., 2006).

2.3.3. Selenoproteini

Do sada je otkriveno 25 eukariotskih Se-proteina (Kryukov i sar., 2003). Međutim, smatra se da postoji između 30 i 50 Se-proteina kod sisara koji se mogu identifikovati u humanom genomu (Behne i sar., 2001). O važnosti Se-proteina za život najbolje govori podatak da miševi kojima nedostaje gen za sintezu Se-cisteina uginu tokom rane embriogeneze (Bosl i sar., 1997). Proteini koji sadrže Se su podeljeni u 3 grupe:

- 1) proteini u koje je Se ugrađen nespecifično;
- 2) proteini koji specifično vezuju Se;
- 3) "pravi" selenoproteini, koji sadrže Se u obliku Se-cisteina (Behne i sar., 2001).

Za razliku od drugih metala, koji su udruženi sa svojim apoproteinom kao kofaktorom, Se se kotranslaciono ugrađuje u Se-proteine u vidu Se-cisteina (Berry i sar., 2001). Selenoproteom svih dosad ispitanih vrsta je vrlo mali. Kod čoveka je identifikovano 25 gena za Se-proteine (Kryukov i sar., 2003).

Neki od ovih proteina su uključeni u antioksidativnu zaštitu. Na primer, citosolna GPx, prvi otkriveni Se-protein (Flohe i sar., 1973), štiti ćelije od oksidativnog oštećenja redukujući H_2O_2 , hidroperokside slobodnih masnih kiselina i fosfolipidne hidroperokside (Brigelius i sar., 2003). Familija dejodinaza sastoji se od 3 člana koji se razlikuju po tkivnoj zastupljenosti i ulozi u aktivaciji i inaktivaciji tireoidnih hormona (Behne i sar., 2001). Kod čoveka postoje 3 različite TRxR koje održavaju ćelijsku redoks homeostazu redukujući tioredoksin i druge supstrate (Tamura i sar., 1996). Se-protein W je eksprimiran u srčanom i skeletnim mišićima (Birringer i sar., 2002). Pored uloge u katalitičkom centru selenoenzima, Se-cistein ima potencijal da popravi oksidativna oštećenja putem redukcije tirozinskih radikala u proteinima (Steinmann i sar., 2008). Se-metionin takođe može da deluje kao sakupljač SKR. Slobodni Se-metionin se brzo oksidiše pomoću peroksinitrita u metionin selenoksid (Padmaja i sar., 1996), koji se može redukovati nazad u Se-metionin u

neenzimskoj reakciji sa glutationom (Assmann i sar., 1998). Ova reakcija se odigrava i sa Se-metioninom u proteinima (Le i sar., 2008), i na taj način Se-metionin pruža prvu liniju odbrane od peroksinitrita i drugih oksidanata.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Na osnovu podataka izloženih u poglavlju "PREGLED LITERATURE" postavili smo sledeće ciljeve istraživanja:

1. Ispitati da li salicilna kiselina smanjuje nefrotoksične efekte gentamicina.
2. Ispitati da li selen smanjuje nefrotoksične efekte gentamicina.
3. Utvrditi da li je oksidativni stres uključen u mehanizam gentamicinske nefrotoksičnosti.
4. Ustanoviti da li se efekti salicilne kiseline i selena potenciraju kada je u pitanju smanjenje gentamicinske nefrotoksičnosti.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Studija je obuhvatala analizu 64 laboratorijskih pacova Wistar soja, oba pola, telesne mase 250-300 grama. Životinje su uzgajane na Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu. Životinje su čuvane u polikarbonskim kavezima u kontrolisanim uslovima uz dvanaestočasovni dnevno/noćni ciklus, na temperaturi od $21 \pm 2^\circ\text{C}$, i sa ad libitum dostupnom hranom (VETFARM – Subotica) i pijaćom vodom. Sve eksperimentalne procedure su odobrene od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu (br. 01-5518-8) i izvedene u skladu sa pravilima Normativa Evropske Unije (86/609/EEC) kao i pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta u Nišu.

Nakon perioda adaptacije od 7 dana, sve eksperimentalne životinje su nasumično podeljene u 8 grupa. Svaku grupu činilo je po 8 životinja. Ispitivanim eksperimentalnim grupama intraperitonealno (i.p.) je aplikovan gentamicin, selen, salicilna kiselina i fiziološki rastvor u određenim dozama i kombinacijama koje su navedene u daljem tekstu. Sve grupe su tretirane u toku 8 uzastopnih dana.

Eksperimentalnim grupama je izvršena sledeća aplikacija lekova:

1. Prva eksperimentalna grupa (K-grupa) služila je kao kontrolna grupa i tretirana je fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl) u dozi od 1 ml na dan.
2. Druga eksperimentalna grupa (GM-grupa) tretirana je gentamicinom (Galenika, Beograd, Srbija) u pojedinačnoj dozi od 100 mg/kg na dan.
3. Treća eksperimentalna grupa (SE-grupa) dobijala je natrijum selenit (Sigma, St. Louis, MO, USA) u pojedinačnoj dozi od 1 mg/kg na dan.
4. Četvrta eksperimentalna grupa (SAL-grupa) tretirana je salicilnom kiselinom (Sigma, St. Louis, MO, USA) u pojedinačnoj dozi od 100 mg/kg na dan.
5. Peta eksperimentalna grupa (SS-grupa) tretirana je salicilnom kiselinom u dozi od 100 mg/kg na dan i natrijum selenitom u dozi od 1 mg/kg na dan.
6. Šesta eksperimentalna grupa (GSE-grupa) tretirana je gentamicinom u dozi 100 mg/kg na dan i natrijum selenitom u dozi od 1 mg/kg na dan.
7. Sedma eksperimentalna grupa (GSAL-grupa) tretirana je gentamicinom u dozi 100 mg/kg na dan i salicilnom kiselinom u dozi od 100 mg/kg na dan.

8. Osmu eksperimentalnu grupu (GSS-grupa) tretirana je gentamicinom u dozi 100 mg/kg na dan, natrijum selenitom u dozi od 1 mg/kg na dan i salicilnom kiselinom u dozi od 100 mg/kg na dan.

Eksperimentalne životinje su anestetizirane i.p. injekcijom ketamina (ketamidol 10%, Richter Pharma AG, Wels, Austria) i žrtvovane devetog dana od početka eksperimenta. Neposredno nakon anestetiziranja i vivisekcije uzimano je 2 ml krvi iz aorte za biohemijske analize. Tkivo bubrega svake eksperimentalne životinje je deljeno na dva dela, za biohemijske analize i svetlosno mikroskopsko ispitivanje.

4.1. Biohemijske analize

Određivanje koncentracija natrijuma, kalijuma, ureje i kreatinina iz krvi eksperimentalnih životinja vršeno je uz pomoć automatskog biohemijskog analizatora (A25 Biosystems, Barselona, Španija) u laboratoriji Klinike za nefrologiju KC u Nišu.

Za određivanje oksidativnog stresa tkivo bubrega je isečeno u male komadiće i homogenizovano u ledenoj vodi, pomoću homogenizatora (IKA Works de Brasil Ltda Taquara, RJ 22713-00). Homogenati (10% w/v) su centrifugirani na 1500 x g na 4°C.

Proteini su određivani metodom po Lowry-u (Lowry,1951) koristeći goveđi serumski albumin kao standard. Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu bubrega je određivan spektrofotometrijski, na osnovu reakcije sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) (Ohkawa,1979). Apsorpcija homogenata je merena na 532 nm. Koncentracija malondialdehida (MDA), krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije, je izražavana po mg/proteina, koristeći koeficijent molekularne ekstincije MDA ($1,56 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-1}$).

Koncentracija karbonilnih grupa, kao pokazatelj oksidativno modifikovanih proteina, je određivana spektrofotometrijski (Levine,1994) pomoću 2,4 dinitrofenilhidrazina, poznatog karbonilnog reagensa. Reaktivni karbonilni derivati su izračunavani pomoću koeficijenta molarne ekstincije DPNH na 370 nm ($22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$) i izraženo u $\mu\text{mol/g}$ proteina.

4.2. Histopatološka ispitivanja

Za mikromorfološka ispitivanja isečci bubrega svih eksperimentalnih grupa su neposredno nakon žrtvovanja fiksirani u 10% pufersanom formaldehidu. Nakon fiksacije, tkivni uzorci su kalupljeni u parafinu i sečeni pomoću rotacionog mikrotoma na debljinu od 5 μm . Dobijeni preseki su bojeni sledećim metodama bojenja:

- a) Hematoksilin-eozin (HE) metoda za proučavanje morfoloških promena bubrega;

- b) Perjodna kiselina-Šifovo bojenje (PAS) histohemijska metoda bojenja za verifikaciju sadržaja glikogena;
- c) JONES bojenje (srebro metenamin) za bojenje bazalnih membrana tubula i kapilara glomerula.

Svi preparati su ispitivani na svetlosnom mikroskopu Leica DMR (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany). Za određivanje stepena oštećenja bubrega, indeksi kao što su degeneracija tubula, nekroza tubula, infiltracija mononuklearnih ćelija i hijalini cilindri su numerički bodovani. Kriterijumi za bodovanje stepena oštećenja su bili sledeći: 0 za odsutnu leziju, 1 za blage promene, 2 za umerena oštećenja i 3 za izrazita oštećenja.

4.3. Morfometrijska analiza

Za kvantifikaciju promena utvrđenih histološkom analizom bubrežnog tkiva korišćena je morfometrijska analiza ispitivanih struktura bubrega (glomeruli, proksimalni i distalni tubuli i jedra ćelija intersticijuma bubrega). Morfometrijska analiza vršena je pomoću svetlosnog mikroskopa Leica DMR (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) primenom kompjuterskog programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Iz svake eksperimentalne grupe analizirano je po četiri nasumično izabrane životinje.

Za analizu glomerula korišćeni su preparati bojeni HE metodom i slikani pod uvećanjem objektiva 10 puta. Analizom su bili obuhvaćeni svi uočeni glomeruli na 10, po principu slučajnog izbora odabranih vidnih polja po jednom slučaju. Na uočenim glomerulima određivani su sledeći morfometrijski parametri: celularnost, area, prosečna, medianska i integralna optička gustina, perimetar, Feret-ov dijametar, kao i oblikovni deskriptori (cirkularnost, eliptičnost i solidnost).

Morfometrijska analiza tubula bubrega vršena je na preparatima bojenim PAS metodom i slikanih pod povećanjem objektiva 10 puta. Analiza je uključivala 10, po principu slučajnog izbora odabranih vidnih polja po jednom slučaju. Na svakom vidnom polju analizirano je pet slučajno odabranih proksimalnih i pet slučajno odabranih distalnih tubula, kojima je merena površina epitela. Analizom su bili obuhvaćeni samo oni tubuli čije su konture bile jasno uočljive.

Morfometrijska analiza jedara ćelija intersticijuma vršena je na preparatima bojenim HE metodom i slikanim pod povećanjem objektiva 40 puta, na ukupno slučajno odabranih 10 vidnih polja. Morfometrijskom analizom 10 slučajno odabranih jedara po svakom vidnom

polju (ukupno 100 jedara po analiziranom slučaju) mereni su sledeći parametri: area, prosečna, medianska i integralna optička gustina, perimetar, Feret-ov dijametar, kao i oblikovni deskriptori (cirkularnost, eliptičnost i solidnost).

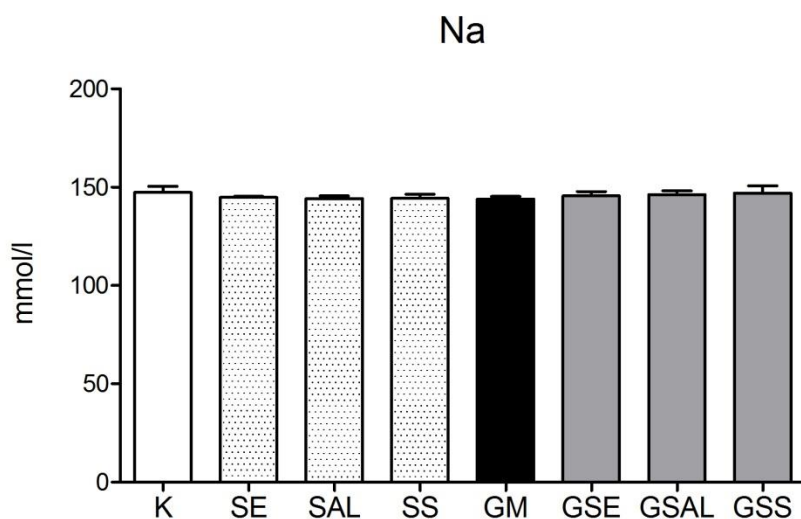
4.4. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišćen je kompjuterski program Graphpad Prism 5.03, San Diego, CA, USA. Statistička obrada podataka dobijenih biohemijskom analizom krvi i homogenizovanog tkiva bubrega izvršena je izračunavanjem srednjih vrednosti i standardne devijacije. Statistička značajnost je utvrđena jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) i post hoc Takijevim (Tukey) testom. Kao statistički značajne uzimane su vrednosti verovatnoće (p) manje od 0,05.

Celokupno eksperimentalno istraživanje obavljeno je na Medicinskom fakultetu u Nišu i to na Institutu za fiziologiju, Institutu za biomedicinska istraživanja, Institutu za biohemiju i Institutu za patologiju.

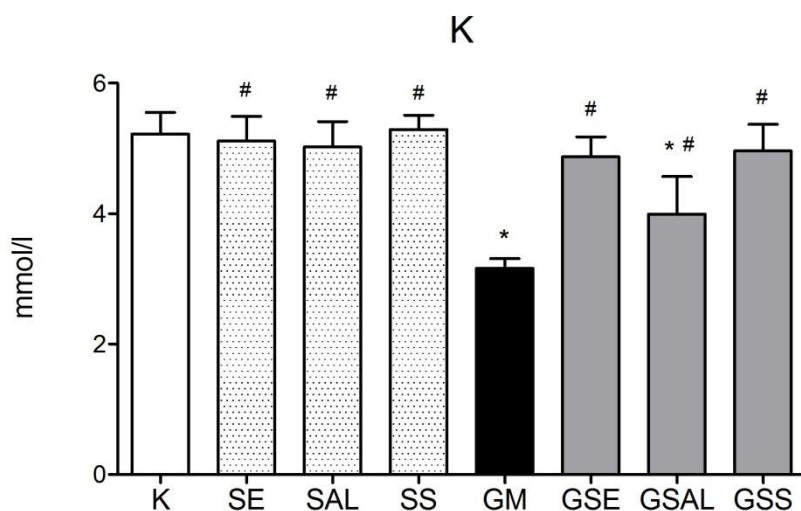
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Rezultati biohemijskih analiza krvi



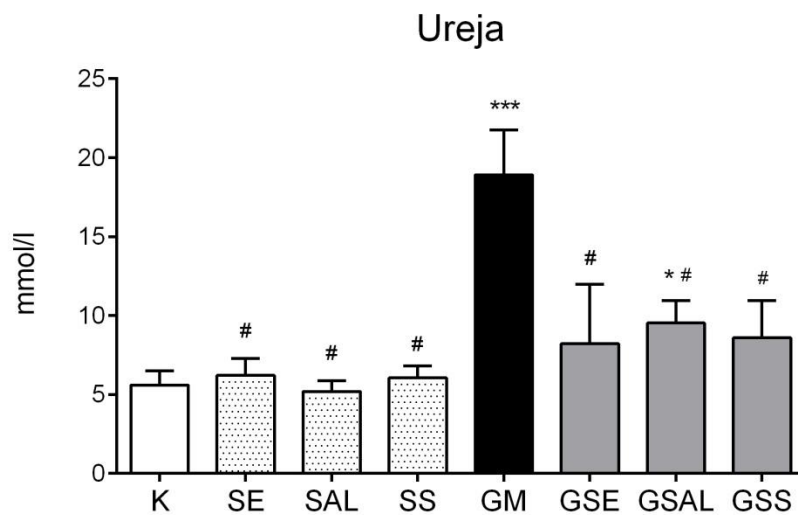
Grafikon 1. Vrednosti serumskih koncentracija natrijuma kod eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.

Prosečne vrednosti serumskih koncentracija natrijuma svih eksperimentalnih grupa statistički su se značajno razlikovale na osnovu rezultata jednofaktorskog ANOVA testa ($p < 0.05$). Međutim, međusobne razlike između svih eksperimentalnih grupa nisu bile statistički značajne na osnovu rezultata Tukey-Kramer post hoc testa.



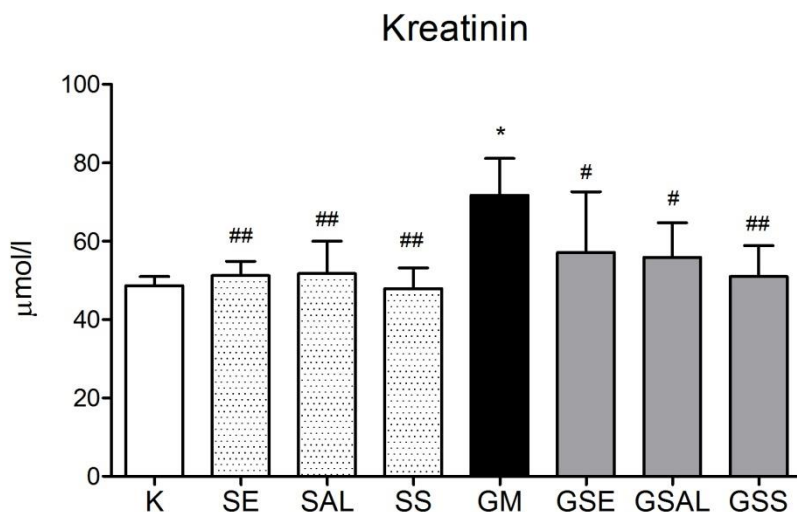
Grafikon 2. Vrednosti serumskih koncentracija kalijuma kod eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova. * $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.001$ u odnosu na grupu tretiranu gentamicinom

Primenom jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečne vrednosti serumskih koncentracija kalijuma ispitivanih grupa statistički značajno razlikuju ($p < 0.001$). Na osnovu rezultata Tukey-Kramer post hoc testa utvrđeno je da su prosečne vrednosti serumskog kalijuma kod GM i GSAL grupa statistički značajno niže ($p < 0.001$) u odnosu na iste vrednosti kod kontrolne grupe. Prosečne vrednosti kalijuma kod grupa GSE, GSAL i GSS bile su statistički značajno više ($p < 0.001$) od prosečne vrednosti kalijuma kod GM grupe.



*Grafikon 3. Vrednosti serumskih koncentracija ureje kod eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu; *** $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.001$ u odnosu na grupu tretiranu gentamicinom*

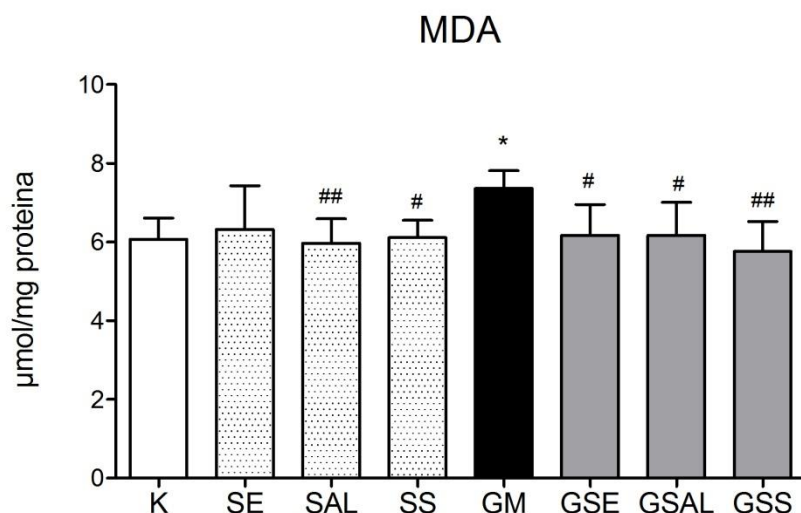
Rezultati jednofaktorskog ANOVA testa su ukazali da se prosečna vrednost ureje ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.001$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna vrednost ureje kod GM i GSAL grupe bila statistički značajno viša ($p < 0.001$ i $p < 0.05$) u odnosu na iste vrednosti kod kontrolne grupe. Prosečne vrednosti ureje kod grupa GSE, GSAL i GSS bile su statistički značajno niže ($p < 0.001$) od prosečne vrednosti ureje kod GM grupe.



*Grafikon 4. Vrednosti serumskih koncentracija kreatinina kod eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova. * $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.05$ u odnosu na grupu tretiranu gentamicinom; ## $p < 0.001$ u odnosu na grupu tretiranu gentamicinom.*

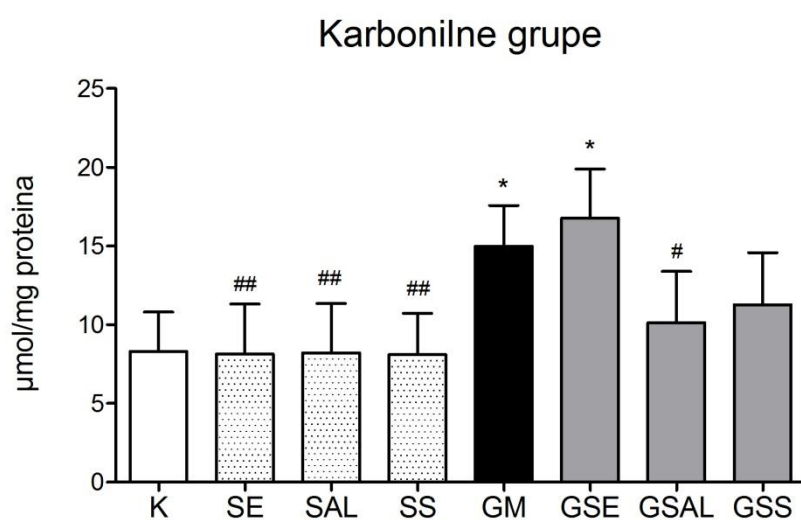
Primenom jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečne vrednosti serumskih koncentracija kreatinina ispitivanih grupa statistički značajno razlikuju ($p < 0.001$). Na osnovu rezultata Tukey-Kramer post hoc testa utvrđeno je da je prosečna vrednost serumskog kreatinina GM grupe statistički značajno viša ($p < 0.001$) od prosečne vrednosti kreatinina kontrolne grupe. Prosečne vrednosti kreatinina kod grupa GSE, GSAL i GSS bile su statistički značajno niže ($p < 0.05$, $p < 0.05$ i $p < 0.001$) od prosečne vrednosti kreatinina kod GM grupe.

5.2. Rezultati analize markera oksidativnog stresa u tkivu bubrega



Grafikon 5. Vrednosti malondialdehida u tkivu bubrega eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.05$ u odnosu na grupu tretiranu gentamicinom; ## $p < 0.01$ u odnosu na grupu tretiranu gentamicinom.

Rezultati jednofaktorskog ANOVA testa su ukazali da se prosečna vrednost MDA u tkivu bubrega ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.01$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna vrednost MDA GM grupe bila statistički značajno viša ($p < 0.05$) od prosečne vrednosti MDA kontrolne grupe. Prosečne vrednosti MDA kod grupa GSE, GSAL i GSS bile su statistički značajno niže ($p < 0.05$, $p < 0.05$ i $p < 0.01$) od prosečne vrednosti MDA kod GM grupe.



Grafikon 6. Vrednosti karbonilnih grupa u tkivu bubrega eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova. * $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.05$ u odnosu na grupu tretiranu gentamicinom; ## $p < 0.001$ u odnosu na grupu tretiranu gentamicinom.

Prosečne vrednosti koncentracija karbonilnih grupa proteina u tkivu bubrega svih eksperimentalnih grupa statistički su se značajno razlikovale na osnovu rezultata jednofaktorskog ANOVA testa ($p < 0.001$). Prosečna koncentracija karbonilnih grupa u tkivu bubrega životinja tretiranih GM i GSE grupe bila je statistički značajno veća ($p < 0.01$) u odnosu na koncentraciju karbonilnih grupa u tkivu bubrega kontrolne grupe. Prosečna koncentracija karbonilnih grupa proteina u tkivu bubrega GSAL grupe bila je statistički značajno niža ($p < 0.05$) u odnosu na iste vrednosti kod GM grupe životinja. Životinje tretirane gentamicinom, salicilnom kiselinom i selenom u odnosu na životinje tretirane samo gentamicinom imale su niže vrednosti karbonilnih grupa proteina (promene nisu na nivou statističke značajnosti). Prosečne vrednosti karbonilnih grupa proteina u životinja GSS grupe se približavaju vrednostima istih kod kontrolne grupe.

5.3. Rezultati histološke i histochemijske analize tkiva bubrega

Mikroskopskim ispitivanjem tkiva bubrega kontrolne grupe uočeni su normalni glomeruli okruženi kapsulom kao i normalni proksimalni, distalni i sabirni kanali (Slika 4). Bubrežno tkivo životinja koje su primale samo selen takođe je pokazivalo normalnu histoarhitekturu, uz blago suženje Boumanovog prostora (Slika 5). Kod grupe životinja koje su primale samo salicilnu kiselinu nisu uočene bilo kakve patološke promene u tkivu bubrega (Slika 6). Najintenzivnije promene bubrežnog parenhima uočene su u grupi životinja tretiranih samo GM. U ovoj grupi uočena je izrazita dilatacija tubula uz smanjenje visine epitela u njima (Slika 7). Takođe su uočeni brojni tubuli u nekrozi kao i izražena degeneracija ćelija tubula (Slika 8). Lumen ovih tubula često je bio ispunjen degenerativno izmenjenim i deskvamiranim epitelnim ćelijama, a mestimično su bili prisutni i hijalini cilindri u njima (Slika 9). Na preparatima bojenim Jones metodom jasno se uočava da je bazalna membrana tubula u ovoj grupi često bila oštećena i prekinuta (Slika 10). U intersticijumu korteksa bubrega jasno se uočava masivna infiltracija zapaljenskih ćelija u obliku mononuklearnih ćelija. Navedena promena je uočena u okolini krvnih sudova (Slika 11) kao i u okolini tubula (Slika 12). Pored opisanih promena na tubulima koje su bile najizrazitije, u grupi životinja tretiranih GM uočene su i morfološke promene na glomerulima. Uočena je umerena kongestija glomerula uz proširene kapilarne petlje ispunjene eritrocitima kao i suženje Boumanovog prostora (Slika 13).

Kod eksperimentalne grupe životinja tretiranih GM i SE uočene morfološke promene su po intenzitetu mnogo manje izražene u odnosu na grupu tretiranu GM. U ovoj grupi nije uočena dilatacija i nekroza tubula, dok je bila prisutna blaga degeneracija epitelnih ćelija tubula (Slika 14). Na preparatima bojenim Jones metodom jasno se uočava da je bazalna membrana tubula očuvana i bez oštećenja (Slika 15). I ovde se uočava prisustvo zapaljenskog infiltrata ali u mnogo blažoj formi u odnosu na GM grupu (Slika 16). Promene na glomerulima u ovoj grupi su bile prisutne u vidu blage kongestije glomerula i suženja Boumanovog prostora (Slika 17).

Histopatološkom analizom tkiva bubrega životinja tretiranih GM i SAL uočena je blaga degeneracija epitelnih ćelija tubula bez znakova nekroze (Slika 18). Bazalna membrana tubula bila je bez znakova oštećenja i bez prekida kontinuiteta (Slika 19). Infiltracija zapaljenskih ćelija u intersticijumu bubrega bila je mestimično prisutna ali u blagom obliku (Slika 20). Promene na glomerulima bile su blaže nego kod GM grupe i obuhvatale su samo suženje Boumanovog prostora.

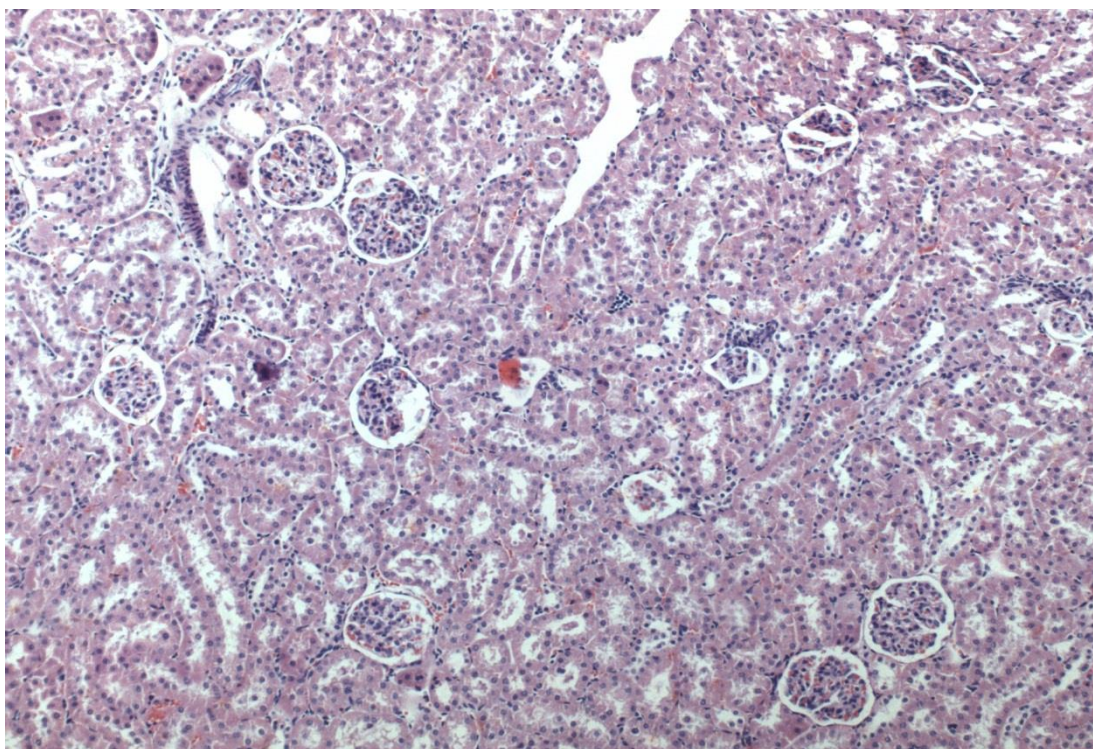
U grupi životinja koje su pored GM tretirane i SE i SAL morfološke promene bile su najblaže u odnosu na ostale eksperimentalne grupe i obuhvatale su minimalnu degeneraciju epitelnih ćelija tubula kao i mestimičnu infiltraciju zapaljenskih ćelija u intersticijumu (Slika 21). Na preparatima bojenim Jones metodom jasno se uočava da je bazalna membrane tubula očuvana i bez oštećenja (Slika 22).

Pregled histopatoloških promena uočenih u tkivu bubrega svih eksperimentalnih grupa dat je u tabeli 1.

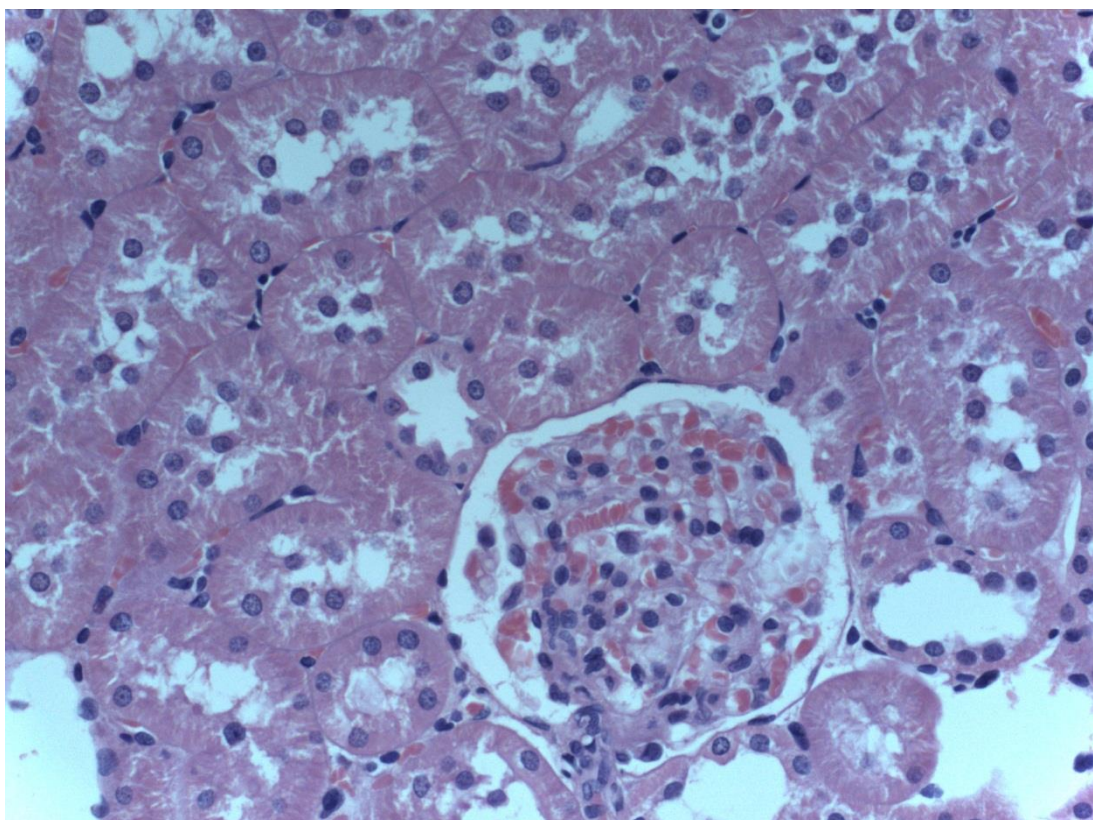
Tabela 1. Semi-kvantitativna analiza histopatoloških promena u tkivu bubrega svih eksperimentalnih grupa

| Histopatološke promene | K | SE | SAL | SS | GM | GSE | GSAL | GSS |
|---|---|----|-----|----|-----|-----|------|-----|
| Dilatacija tubula | - | - | - | - | +++ | - | - | - |
| Degeneracija tubula | - | - | - | - | +++ | + | + | + |
| Nekroza tubula | - | - | - | - | ++ | - | - | - |
| Oštećenje bazalne membrane tubula | - | - | - | - | ++ | - | - | - |
| Hijalini cilindri u tubulima | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Infiltracija mononuklearnih ćelija | - | - | - | - | +++ | + | + | + |
| Suženje Bouman-ovog prostora | - | + | - | - | ++ | + | - | - |
| Kongestija glomerula | - | + | - | - | ++ | + | + | - |

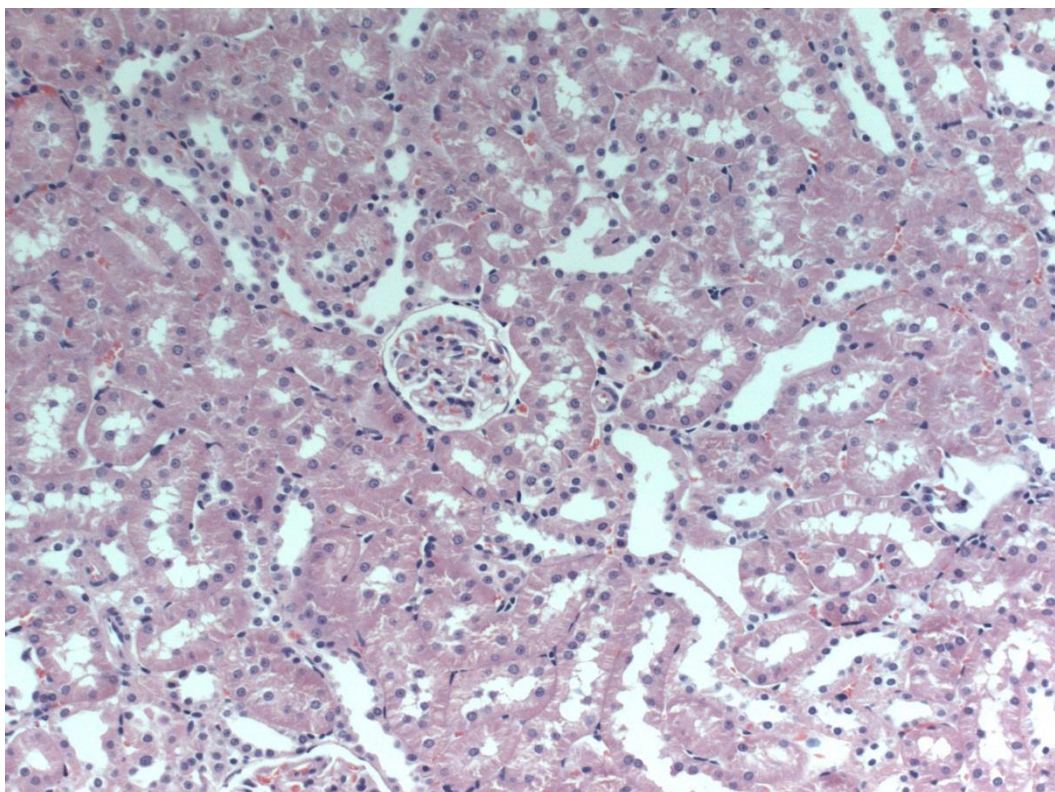
Intenzitet promena je pretstavljen na sledeći način: bez promena (-), blage (+), umerene (++) i izražene (+++) promene.



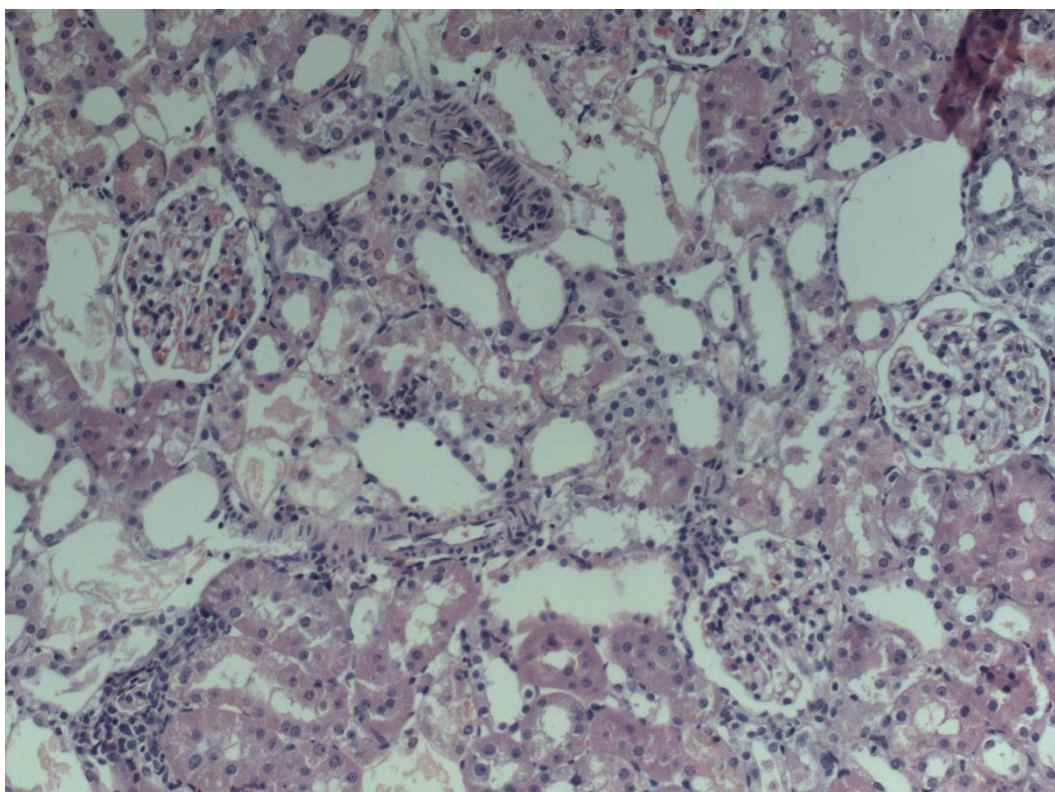
Slika 4. Normalan histološki izgled bubrežnog tkiva kontrolne grupe životinja (H&E x 100).



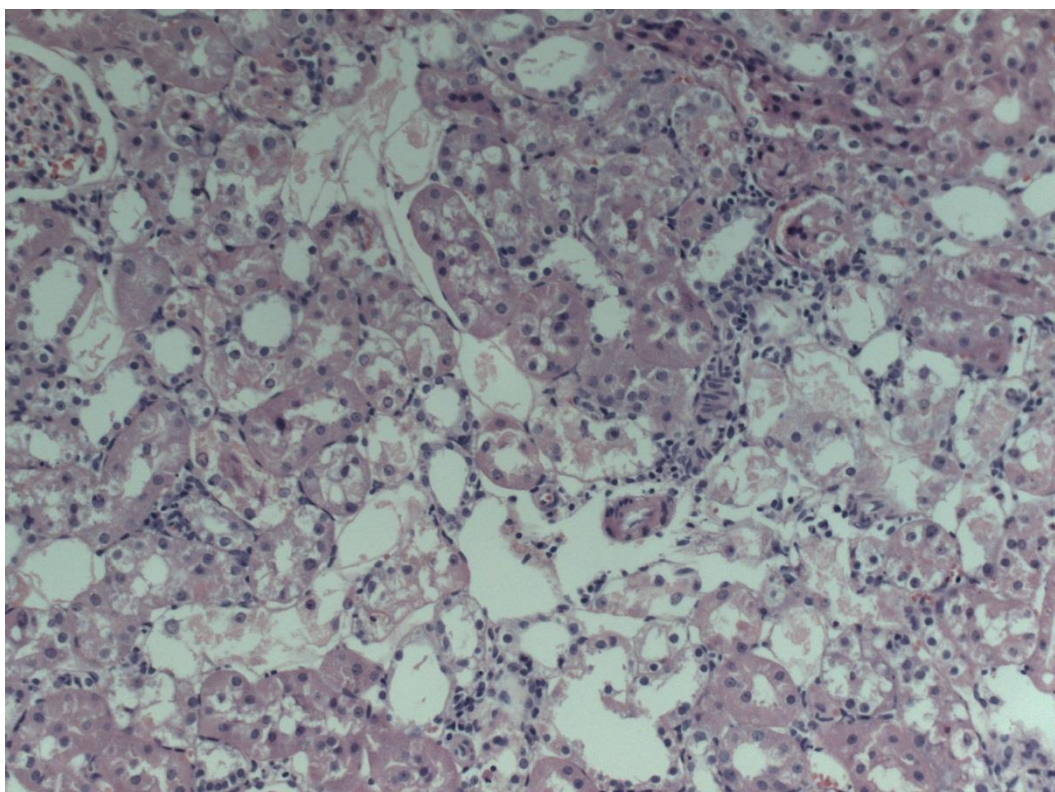
Slika 5. Tkivo bubrega životinja tretiranih selenom (1 mg/kg) pokazuje normalan izgled (H&E x 400).



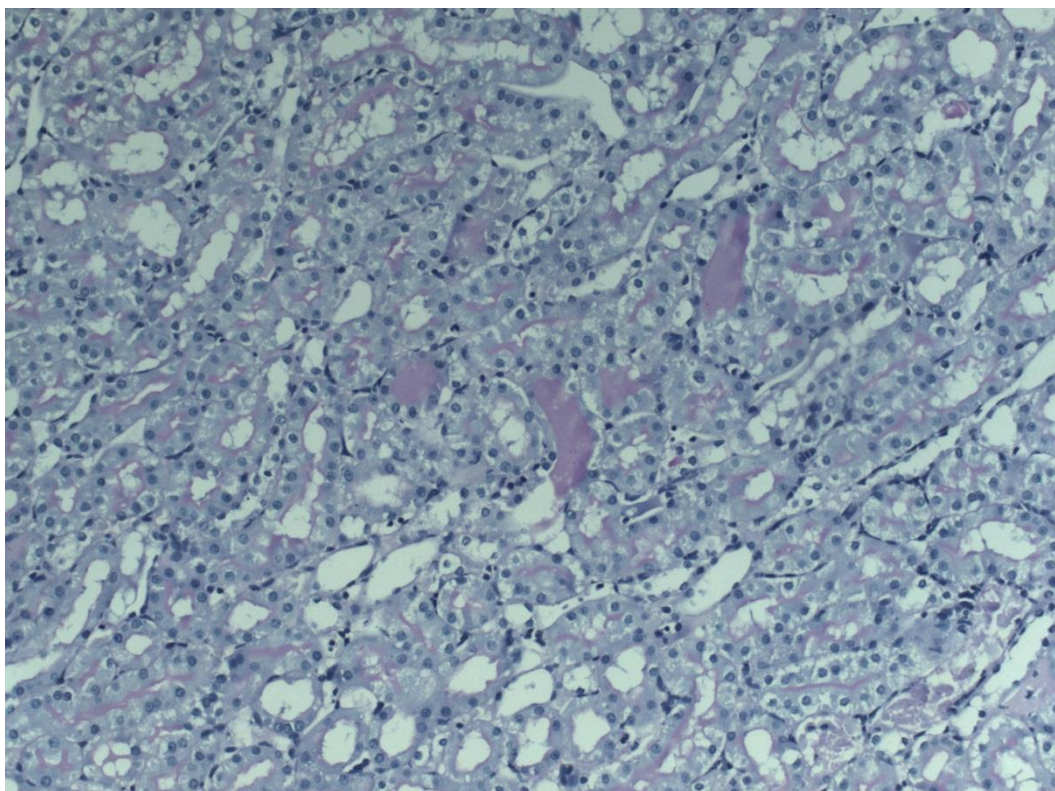
Slika 6. Tkivo bubrega životinja tretiranih salicilnom kiselinom (100 mg/kg) pokazuje normalnu histološku građu (H&E x 200).



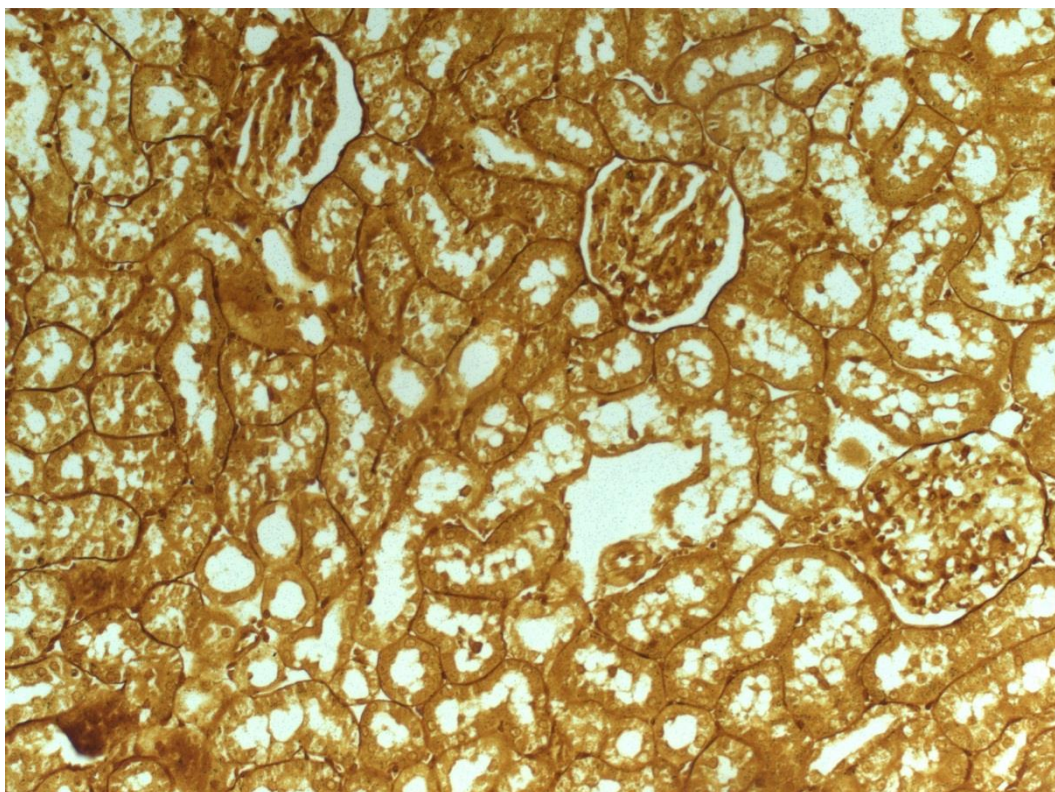
Slika 7. Tkivo bubrega životinja tretiranih gentamicinom (100 mg/kg) tokom 8 dana. Prisutna je izražena dilatacija tubula uz smanjenje visine epitela u njima (H&E x 200).



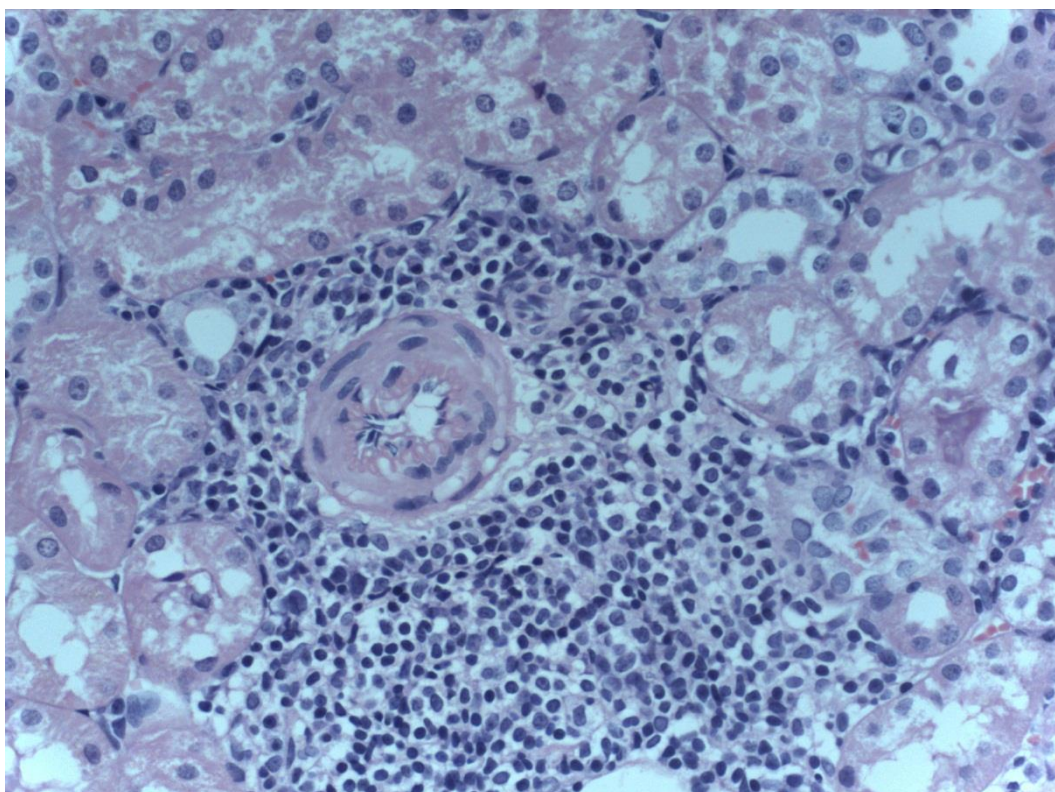
Slika 8. Izražena degeneracija i nekroza tubula bubrega u grupi životinja tretiranih gentamicinom (H&E x 200).



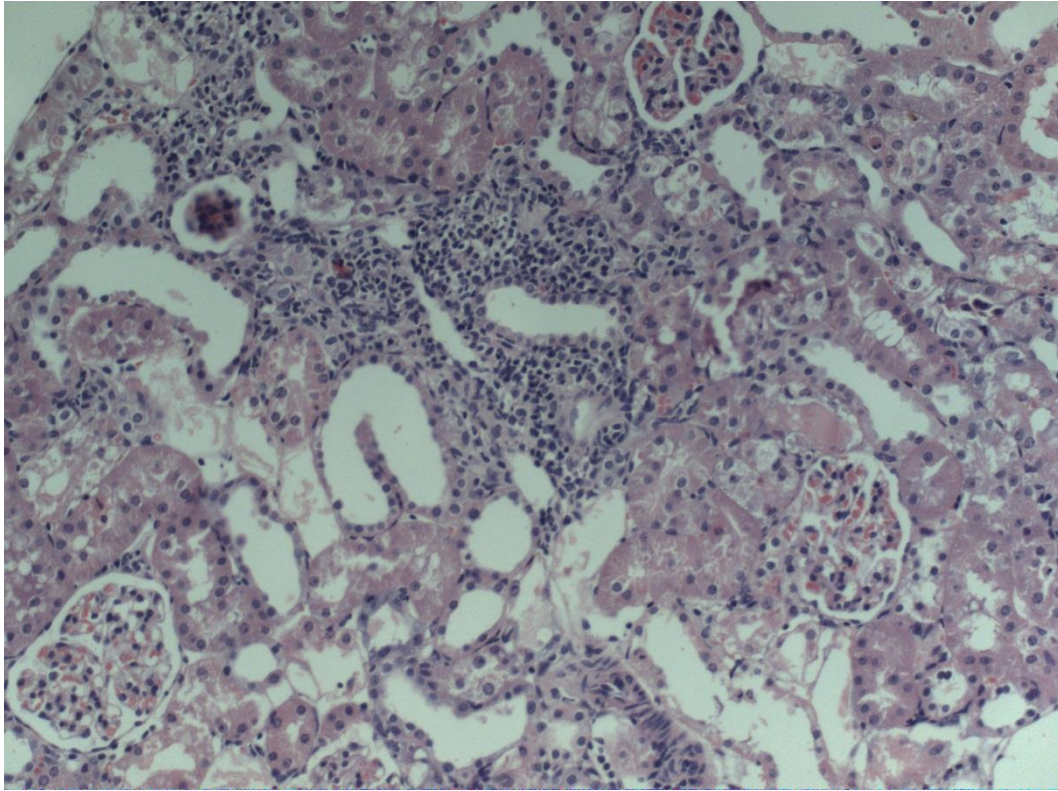
Slika 9. Hijalini cilindri u pojedinim tubulima bubrega životinja tretiranih gentamicinom (PAS x 200).



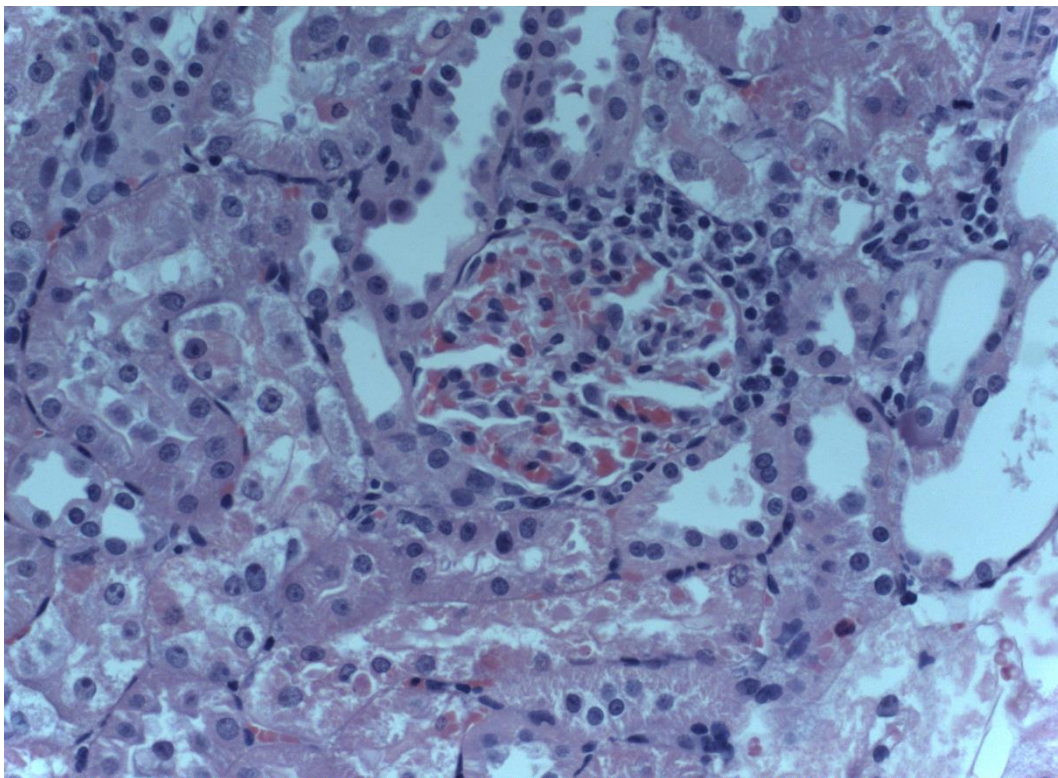
Slika 10. Oštećenje i isprekidanost bazalne membrane pojedinih tubula u tkivu bubrega životinja koje su tretirane gentamicinom tokom 8 dana (Jones x 200).



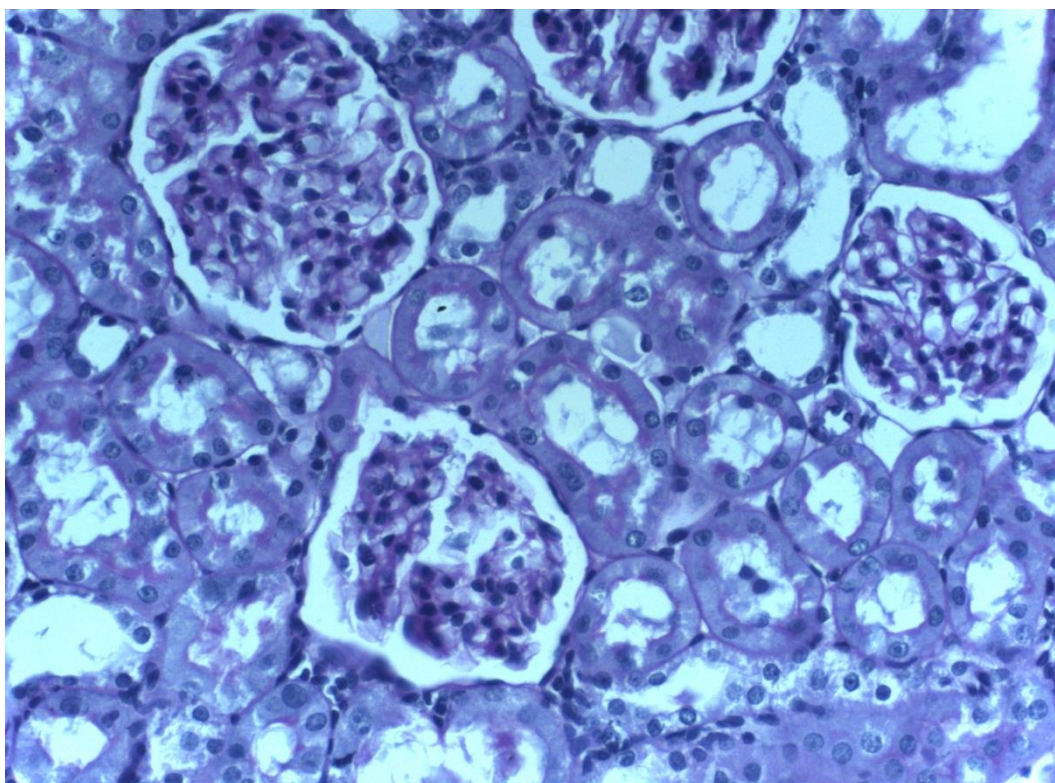
Slika 11. Masivna perivaskularna infiltracija mononuklearnih ćelija u korteksu bubrega životinja GM grupe (H&E x 400).



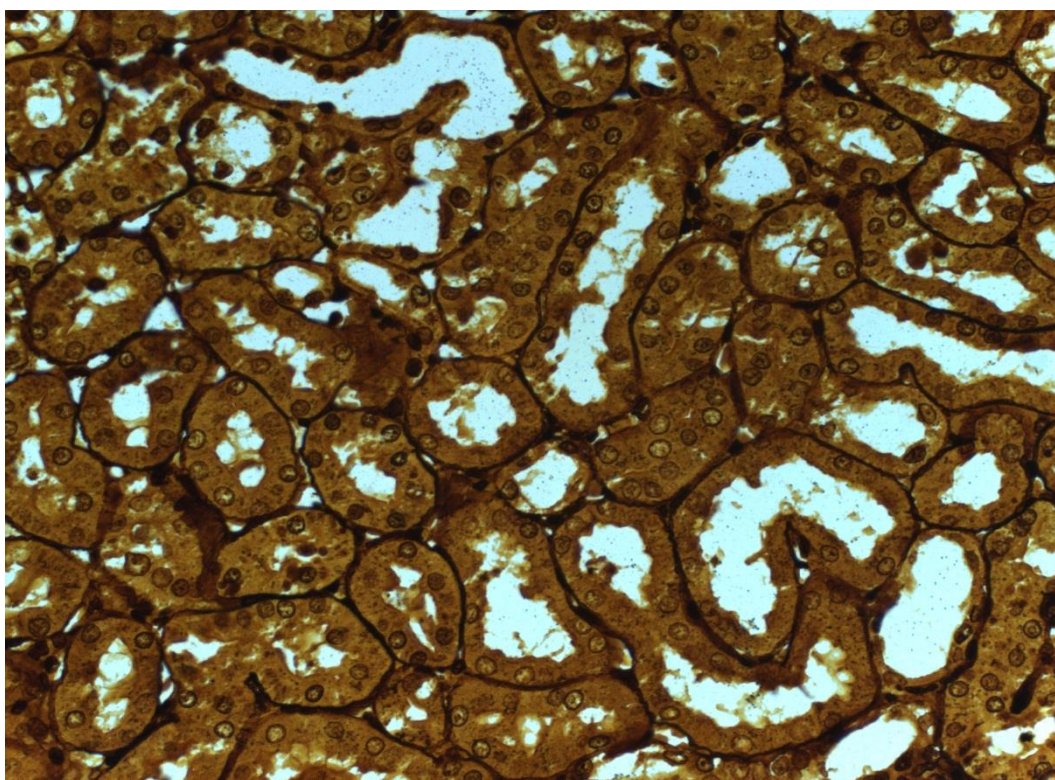
Slika 12. Izražena infiltracija mononuklearnih ćelija u okolini tubula bubrega životinja GM grupe (H&E x 200).



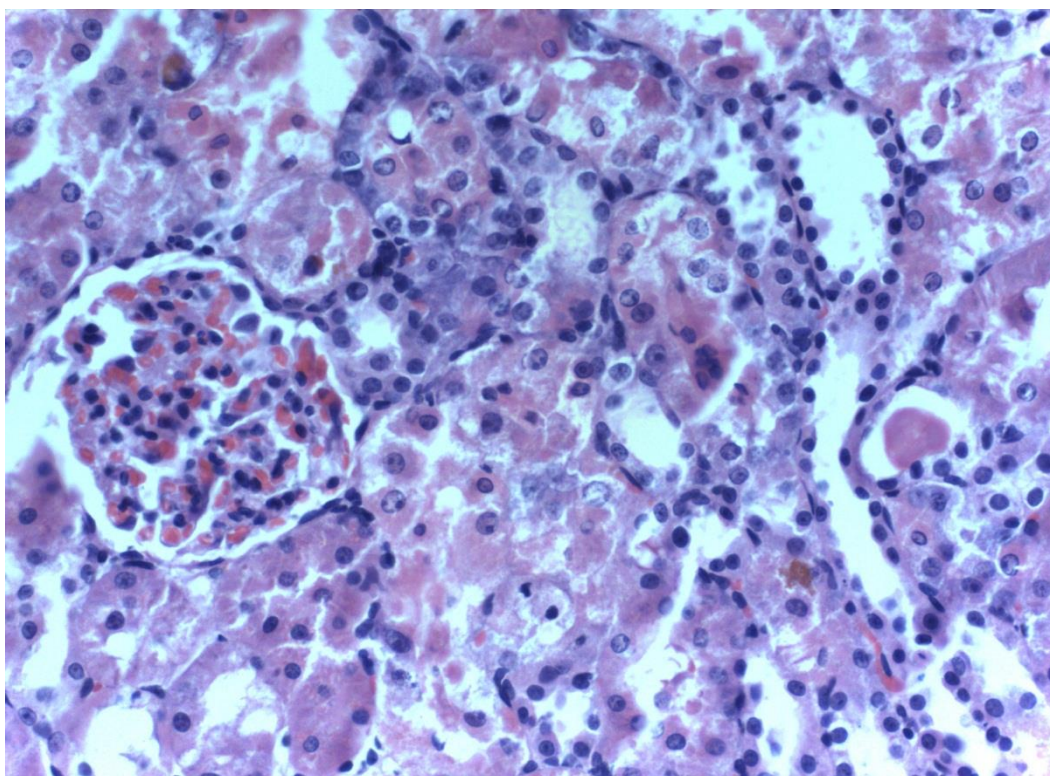
Slika 13. Promene na glomerulima nakon tretmana gentamicinom u GM grupi životinja. Prisutna je umerena kongestija glomerula uz proširene kapilarne petlje ispunjene eritrocitima kao i suženje Boumanovog prostora (H&E x 400).



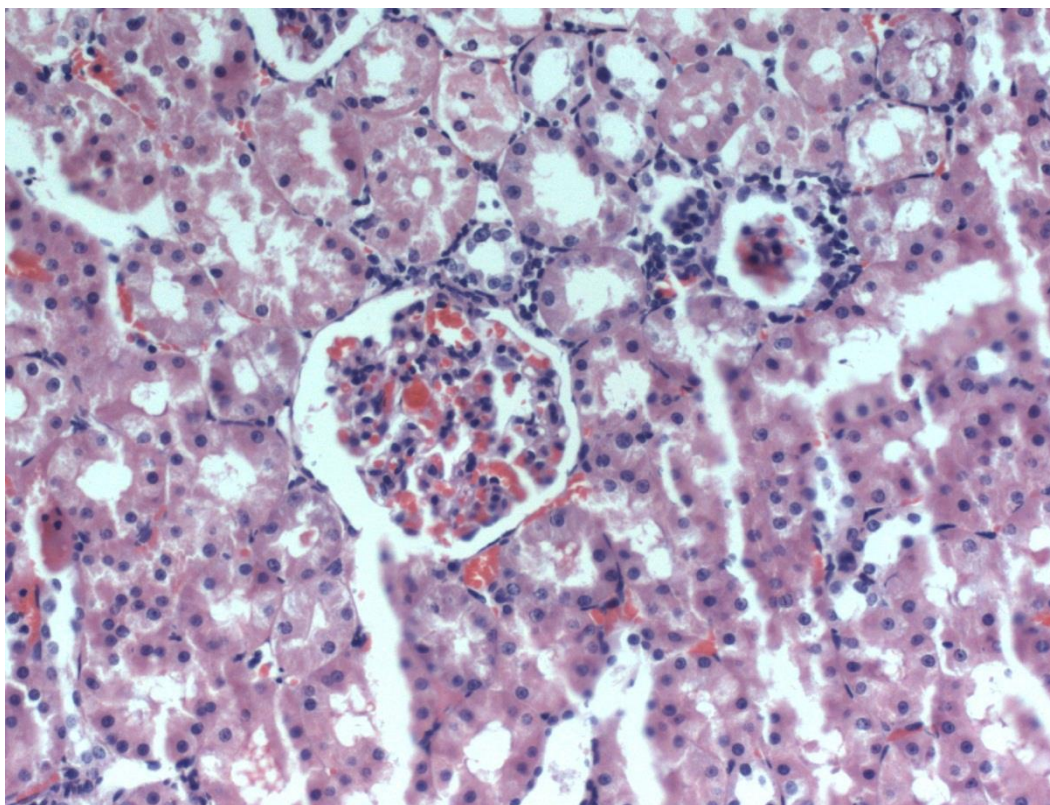
Slika 14. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega životinja tretiranih gentamicinom (100 mg/kg) i selenom (1 mg/kg). Prisutna je blaga degeneracija epitelnih ćelija tubula bubrega (PAS x 400).



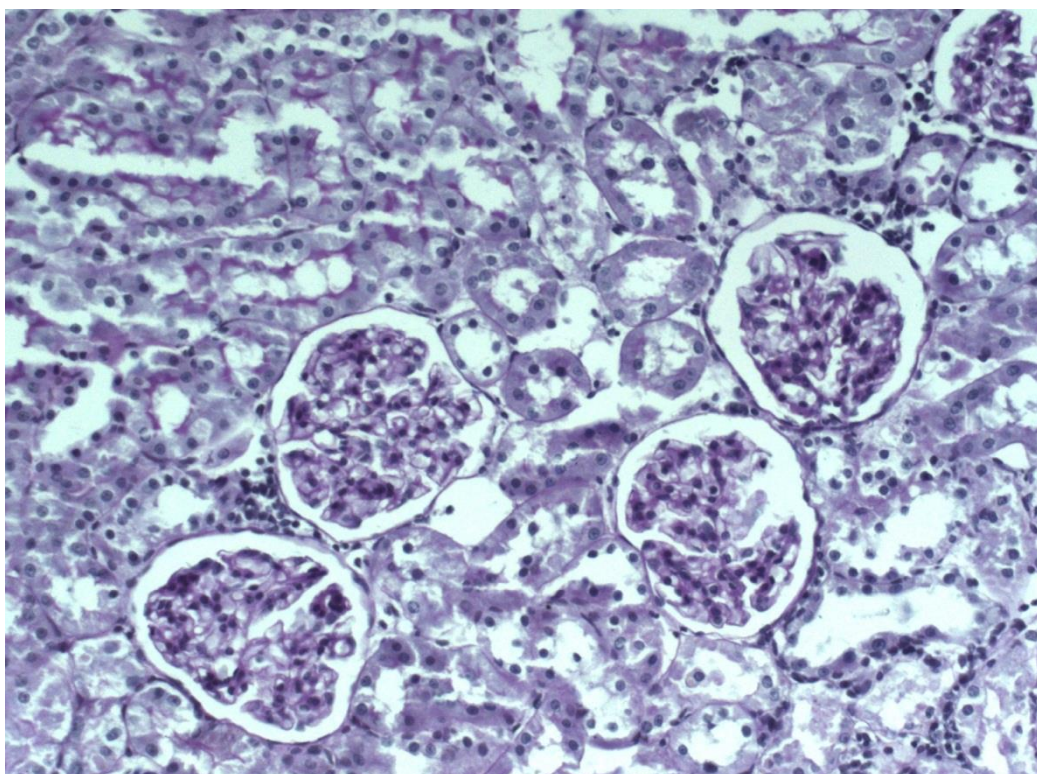
Slika 15. Očuvana bazalna membrana tubula bubrega u grupi životinja tretiranih selenom i gentamicinom (Jones x 400).



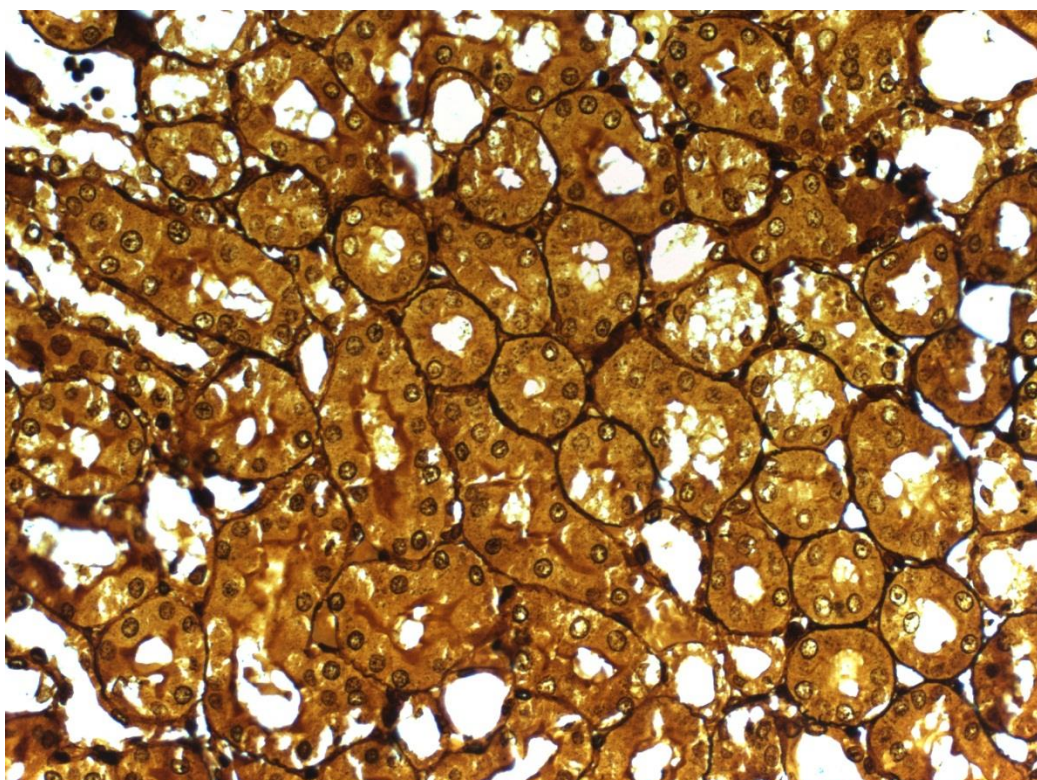
Slika 16. Histološki izgled glomerula i tubula u bubregu životinja GSE grupe. Uočava se umereno prisustvo zapaljenskog infiltrata i blago suženje Boumanovog prostora (H&E x 400).



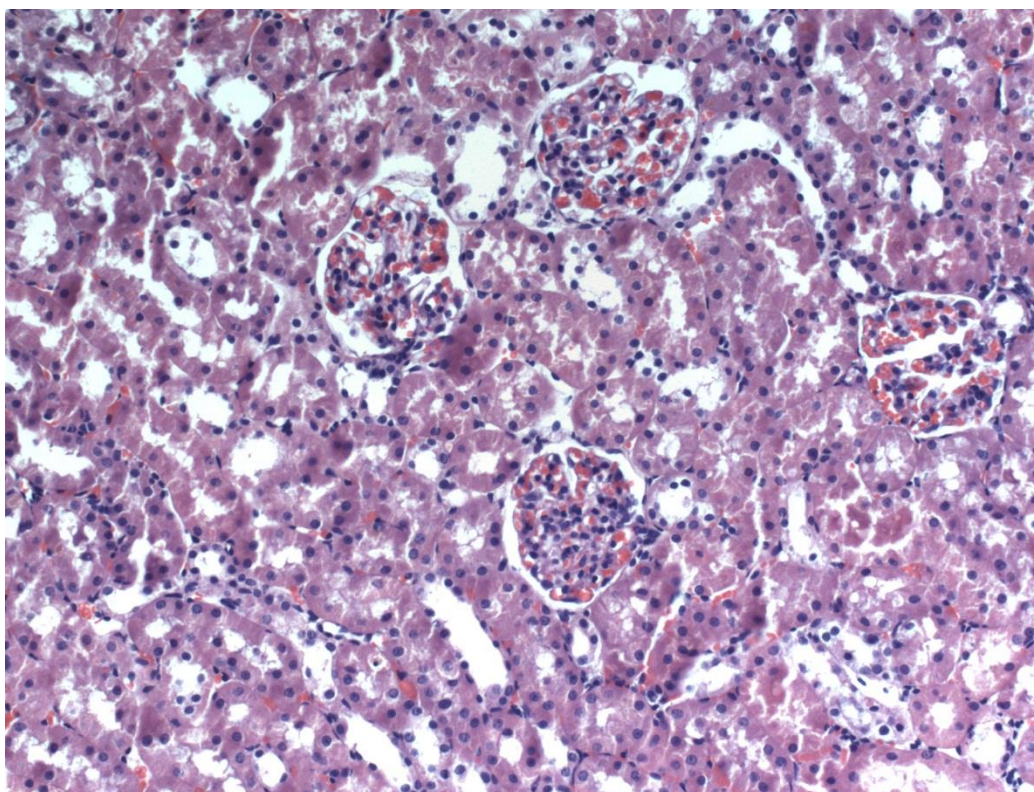
Slika 17. Promene na glomerulima u GSE grupi u vidu blage kongestije glomerula i suženja Boumanovog prostora (H&E x 200).



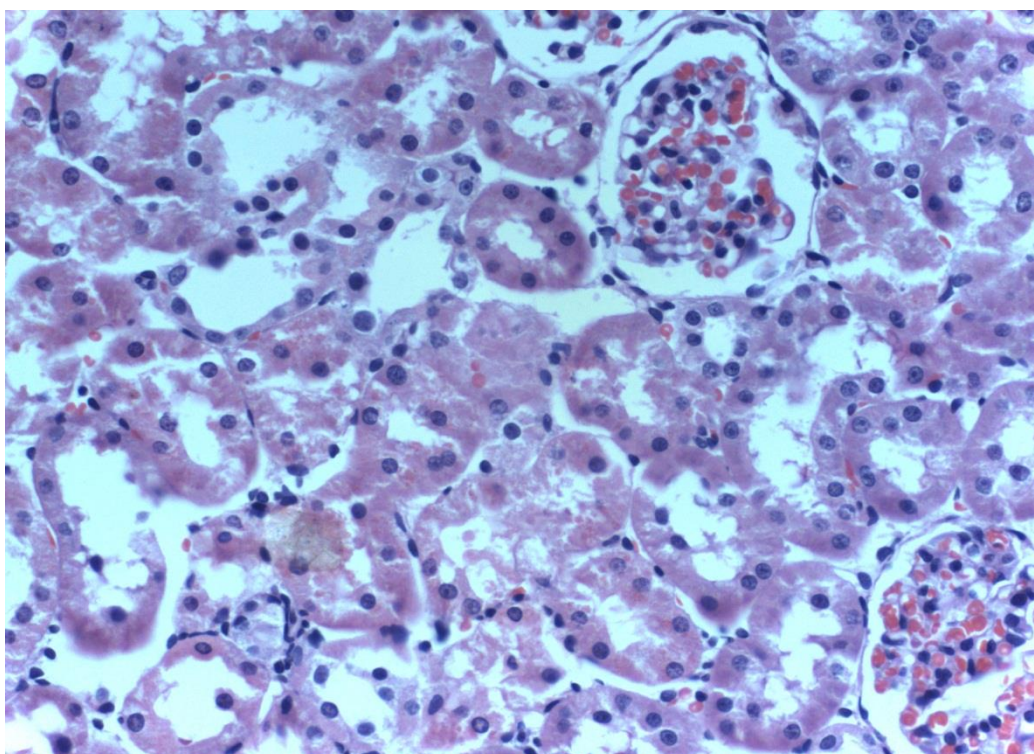
Slika 18. Tkivo bubrega životinja tretiranih gentamicinom (100 mg/kg) i salicilnom kiselinom (100 mg/kg). Prisutna je blaga degeneracija epitelnih ćelija tubula bez znakova nekroze (PAS x 200).



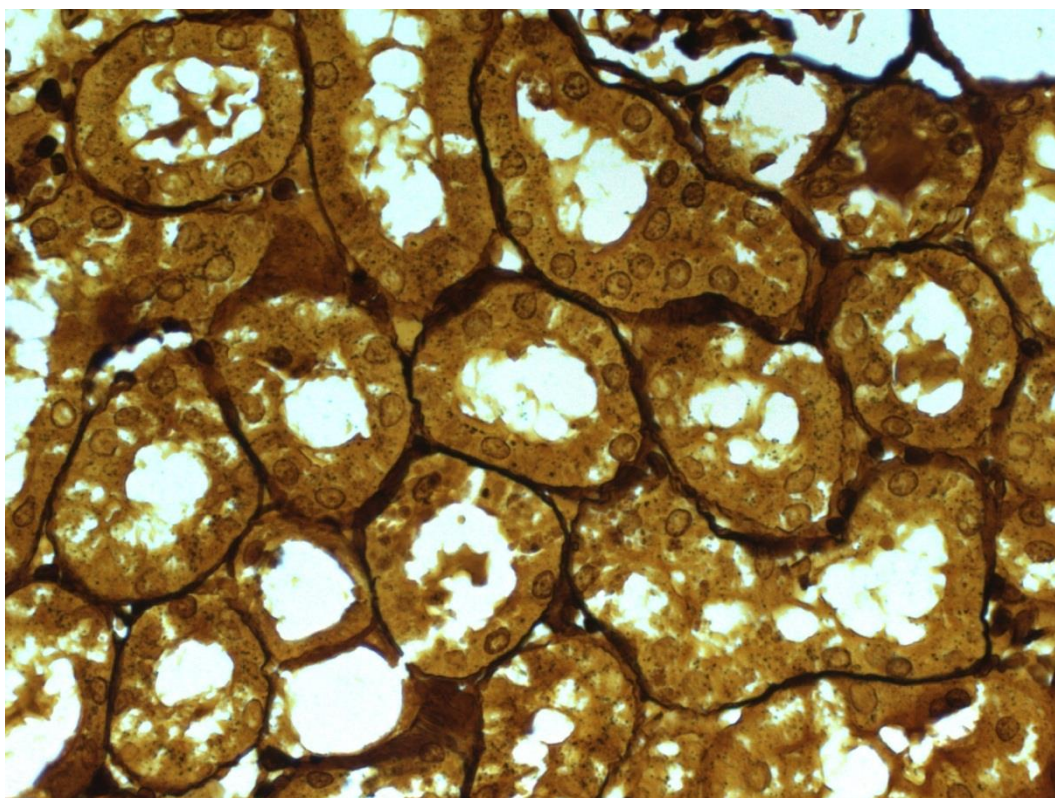
Slika 19. Tamno prebojena bazalna membrana tubula bubrega bez znakova oštećenja i bez prekida kontinuiteta u GSAL grupi (Jones x 400).



Slika 20. Histološki izgled glomerula i tubula u bubregu životinja GSAL grupe. Infiltracija zapaljenskih ćelija u intersticijumu bubrega bila je mestimično prisutna ali u blagom obliku (H&E x 200).



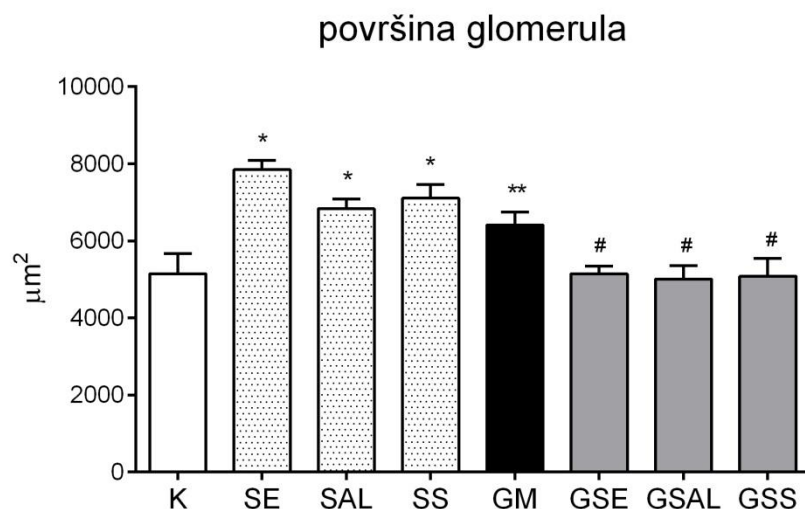
Slika 21. Tkivo bubrega životinja tretiranih gentamicinom (100 mg/kg), salicilnom kiselinom (100 mg/kg) i selenom (1 mg/kg). Uočava se minimalna degeneraciju epitelnih ćelija tubula uz gotovo normalan izgled bubrežnog parenhima (H&E x 400).



Slika 22. Potpuno očuvana bazalna membrana tubula bubrega životinja GSS grupe na preparatima bojenim srebro metenaminom (Jones x 400).

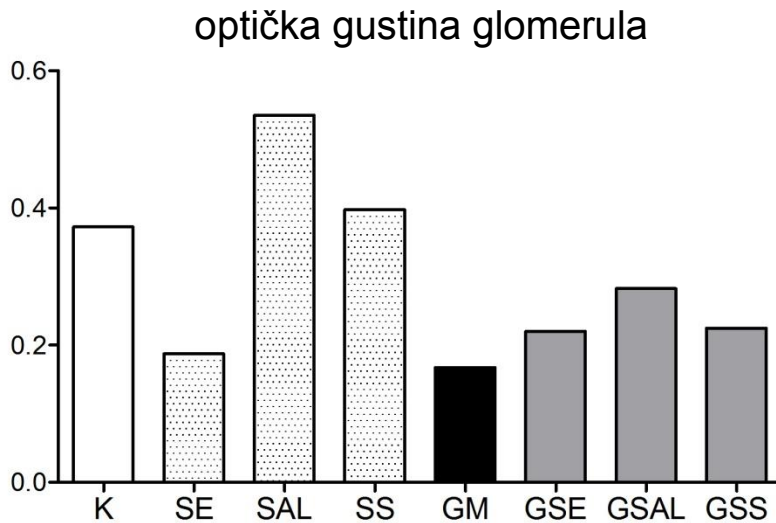
5.4. Rezultati morfolometrijskih ispitivanja tkiva bubrega

5.4.1. Morfolometrijska analiza glomerula



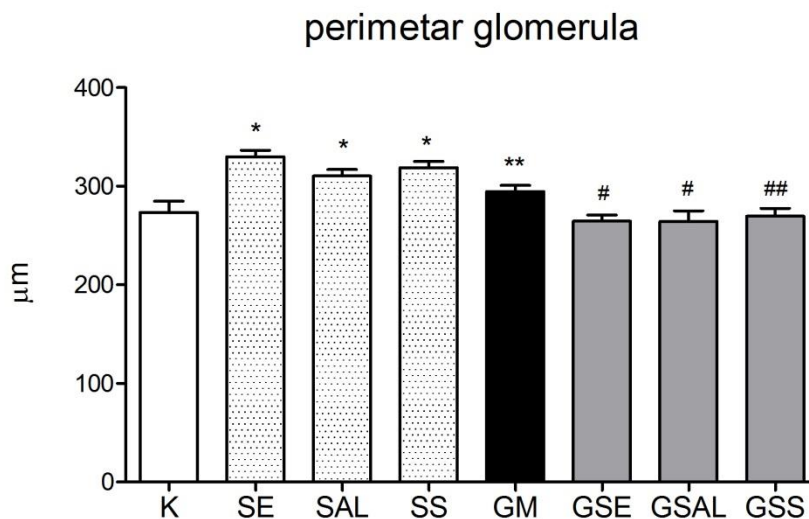
Grafikon 7. Prosečne vrednosti površine glomerula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu; ** $p < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu # $p < 0.01$ u odnosu na GM grupu.

Rezultati jednofaktorskog ANOVA testa su ukazali da se prosečna površina glomerula ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.001$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna površina glomerula grupa kod kojih je administriran gentamicin (GM grupa), selen (SE grupa), salicilna kiselina (SAL grupa) i selen i salicilna kiselina (SS grupa) bila statistički značajno ($p < 0.05$) viša od prosečne površine glomerula kontrolne grupe, respektivno. Prosečne površine glomerula grupa GSE, GSAL i GSS su statistički značajno ($p < 0.05$) niže od prosečne površine glomerula GM grupe, ali se ne razlikuju statistički značajno ($p > 0.05$) od prosečne površine glomerula kontrolne grupe.



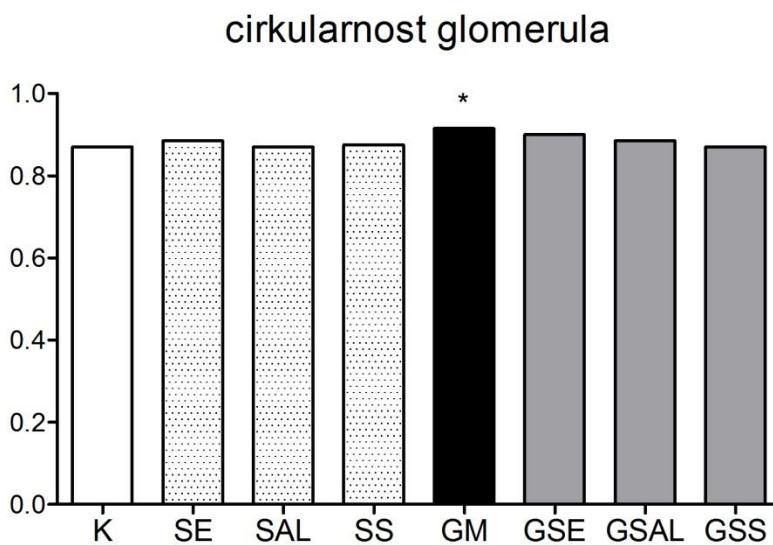
Grafikon 8. Vrednosti srednje optičke gustine glomerula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao vrednost medijane.

Rezultati Kruskal – Wallis ANOVA testa su pokazali da se srednja optička gustina glomerula ispitivanih grupa statistički značajno ne razlikuje međusobno ($p > 0.05$). Optička gustina glomerula pacova GSE, GSAL i GSS grupa je veća od iste pacova GM grupe, ali manja od K grupe. Navedene promene nisu statistički značajne.



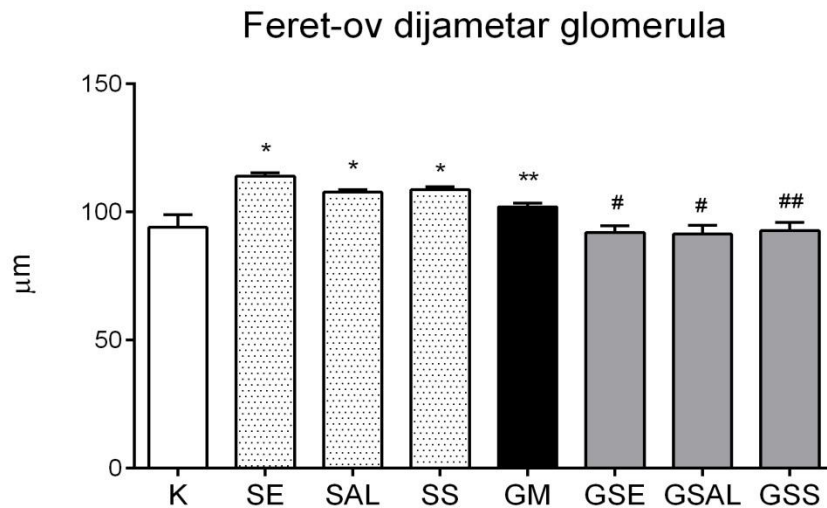
Grafikon 9. Prosečne vrednosti perimetra glomerula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. ** $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu; * $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.01$ u odnosu na GM grupu; ## $p < 0.05$ u odnosu na GM grupu.

Statističkom analizom dobijenih vrednosti perimetra glomerula pomoću jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečna vrednost ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.001$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečan perimetar glomerula grupa GM, SE, SAL i SS statistički značajno ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) viši od prosečnog perimetra glomerula kontrolne grupe. Prosečne vrednosti perimetra glomerula grupa GSE, GSAL i GSS bile su statistički značajno niže ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.05$) od prosečne vrednosti perimetra grupe GM i približavaju se vrednostima K grupe.



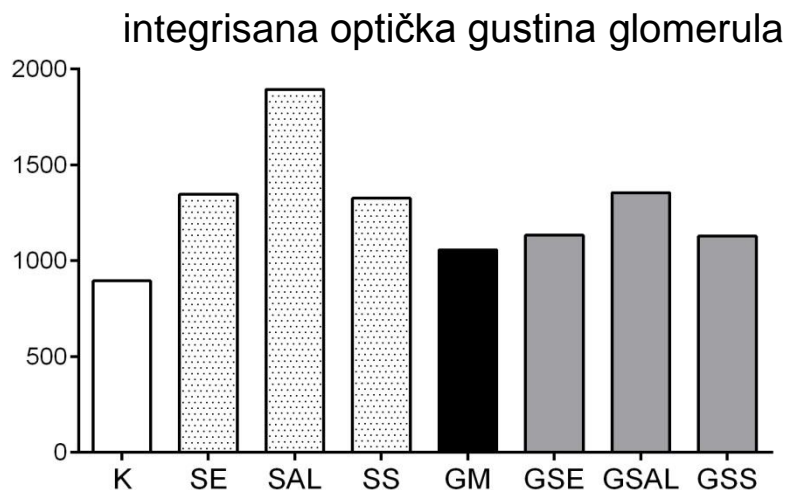
*Grafikon 10. Vrednosti cirkularnosti glomerula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao vrednost medijane. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu;*

Rezultati Kruskal – Wallis ANOVA testa su ukazali da se cirkularnost glomerula ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.05$). Dunn – ov post hoc test je ukazao da je vrednost cirkularnosti glomerula GM grupe statistički značajno viša ($p < 0.05$) od cirkularnosti kontrolne grupe. Cirkularnost glomerula kod životinja GSE, GSAL i GSS grupa je bila niža u odnosu na cirkularnost glomerula kod životinja tretiranih gentamicinom, i približavala se vrednostima kontrolne grupe. Međutim, uočene razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0.05$).



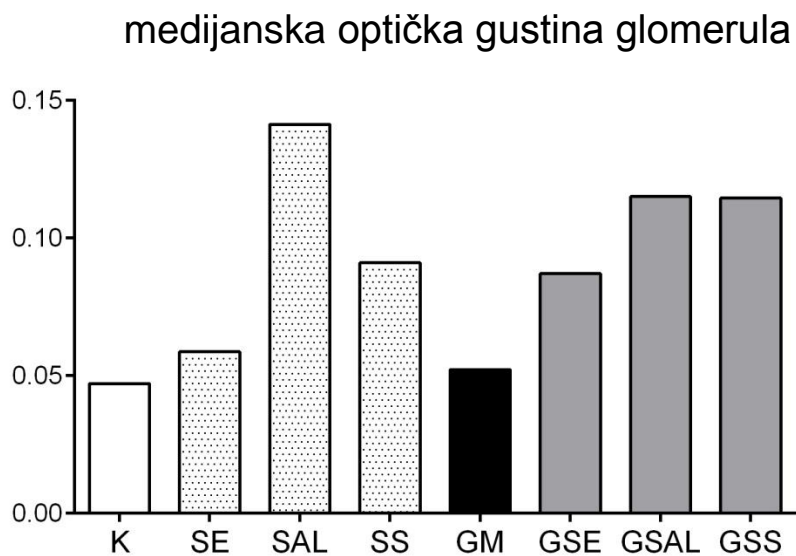
*Grafikon 11. Prosečne vrednosti Feret-ovog dijametra glomerula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu; ** $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.001$ u odnosu na GM grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na GM grupu.*

Rezultati jednofaktorskog ANOVA testa su ukazali da se prosečne vrednosti Feret-ovog dijametra glomerula ispitivanih grupa statistički značajno razlikuju ($p < 0.001$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da su prosečne vrednosti Feretovog dijametra glomerula grupa GM, SE, SAL i SS, statistički značajno ($p < 0.05$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) više od prosečne vrednosti Feretovog dijametra glomerula kontrolne grupe. Prosečne vrednosti Feretovog dijametra glomerula grupa GSE, GSAL i GSS bile su statistički značajno niže ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$) od prosečne vrednosti Feretovog dijametra grupe GM (i približavale su se navedenim vrednostima K grupe).



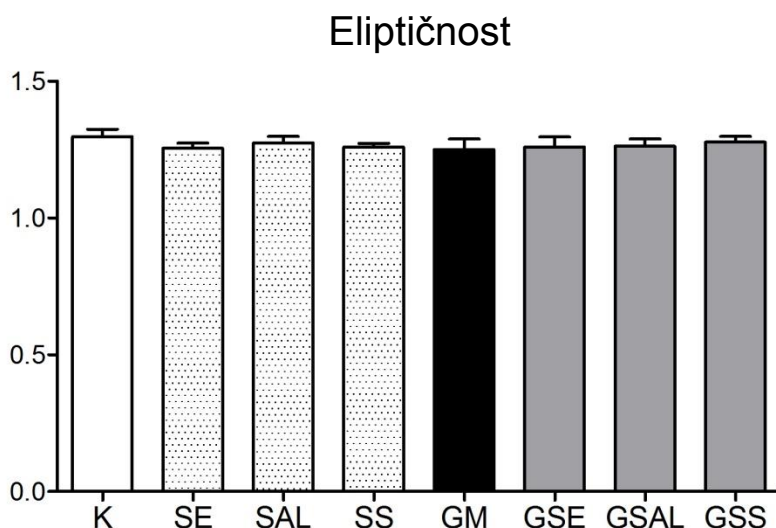
Grafikon 12. Vrednosti integrirane optičke gustine glomerula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao vrednost medijane.

Rezultati Kruskal – Wallis ANOVA testa su pokazali da se integrirana gustina glomerula ispitivanih grupa statistički značajno ne razlikuje međusobno ($p > 0.05$).



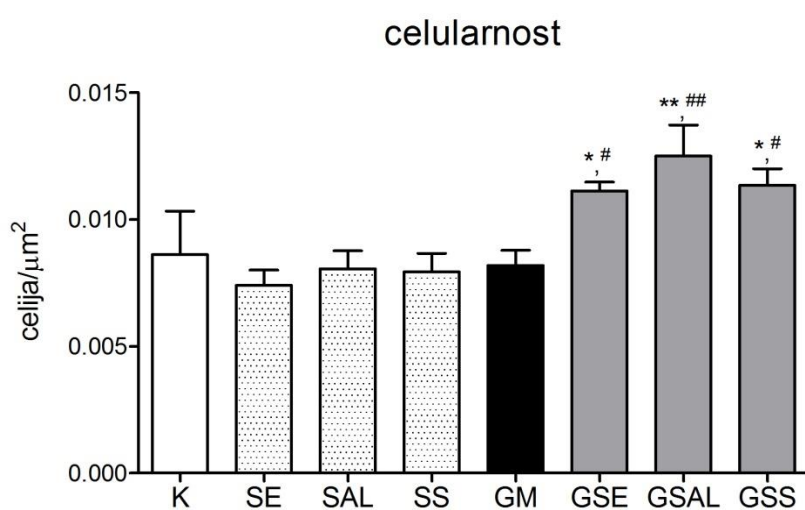
Grafikon 13. Vrednosti medijanske optičke gustine glomerula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao vrednost medijane.

Rezultati Kruskal – Wallis ANOVA testa su pokazali da se medijanska optička gustina glomerula ispitivanih grupa statistički značajno ne razlikuje međusobno ($p > 0.05$).



Grafikon 14. Prosečne vrednosti eliptičnosti glomerula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD.

Rezultati jednofaktorskog ANOVA testa su ukazali da se prosečne vrednosti eliptičnosti glomerula ispitivanih grupa statistički značajno ne razlikuju ($p > 0.05$).

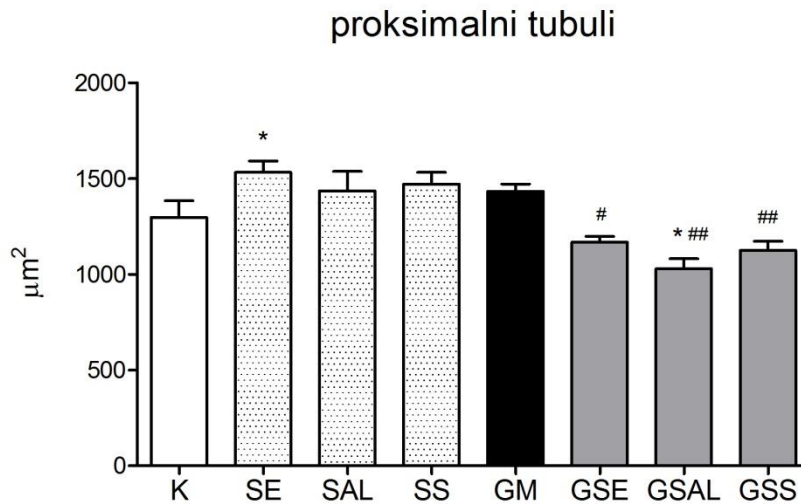


Grafikon 15. Prosečne vrednosti celularnosti glomerula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. ** $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu; * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.01$ u odnosu na GM grupu; ## $p < 0.001$ u odnosu na GM grupu.

Statističkom analizom dobijenih vrednosti celularnosti glomerula pomoću jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečna vrednost ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.001$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da su prosečne vrednosti celularnosti glomerula grupa GSE, GSAL i GSS bile statistički značajno

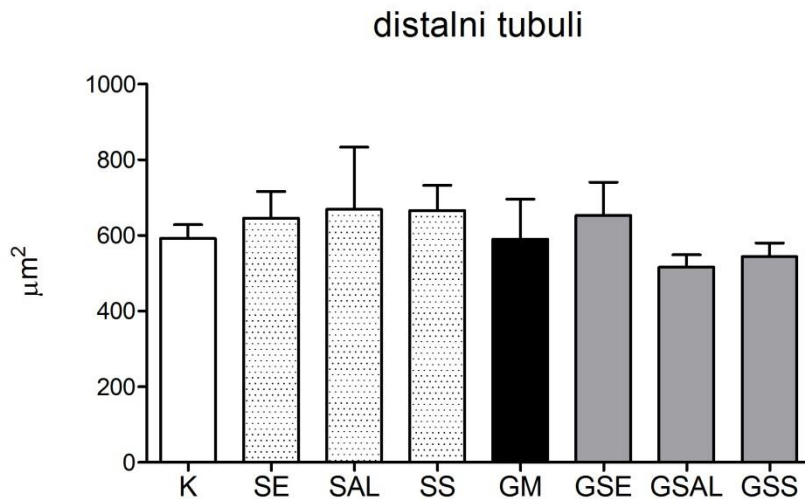
više od prosečne vrednosti celularnosti kod kontrolne ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.05$) i GM grupe ($p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.01$). Prosečne vrednosti navedenih parametara GSE, GSAL i GSS grupe su nešto bliže istim vrednostima kontrolne no GM grupe.

5.4.2. Morfometrijska analiza tubula



Grafikon 16. Prosečne vrednosti površine epitela proksimalnih tubula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.01$ u odnosu na GM grupu; ## $p < 0.001$ u odnosu na GM grupu.

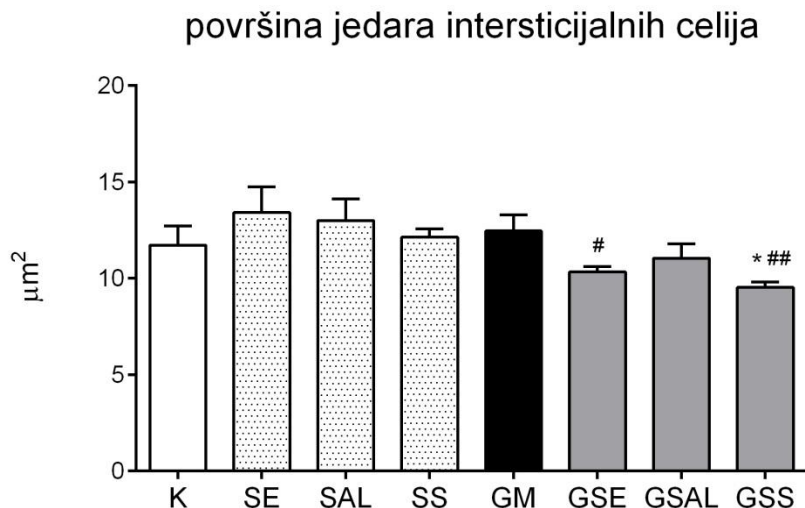
Statističkom analizom dobijenih vrednosti površine epitela proksimalnih tubula pomoću jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečna vrednost ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.001$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna površina epitela proksimalnih tubula SE grupe statistički značajno ($p < 0.01$) viša od prosečne površine epitela kontrolne grupe. Prosečna površina epitela proksimalnih tubula kod grupe GSAL bila je statistički značajno niža ($p < 0.01$) od prosečne površine epitela kontrolne grupe. Prosečne površine epitela proksimalnih tubula kod grupa GSE, GSAL i GSS bile su statistički značajno niže u odnosu na prosečnu površinu epitela GM grupe ($p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.01$).



Grafikon 17. Prosečne vrednosti površine epitela distalnih tubula kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD.

Statističkom analizom dobijenih vrednosti površine epitela distalnih tubula pomoću jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečna vrednost ispitivanih grupa statistički značajno ne razlikuje ($p > 0.05$).

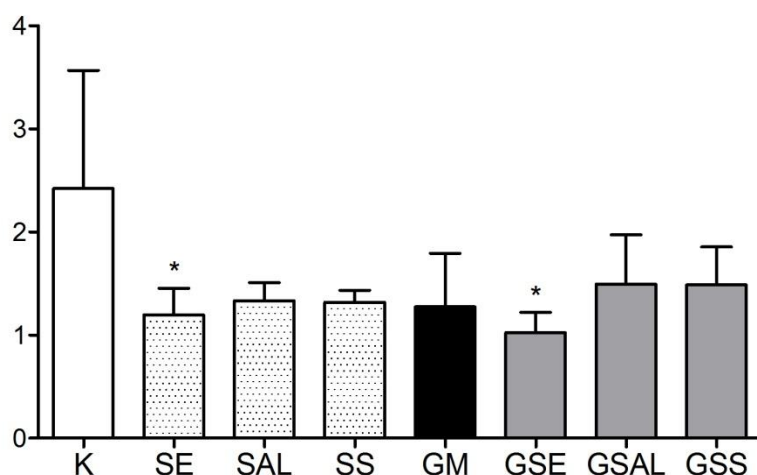
5.4.3. Morfometrijska analiza jedara intersticijalnih ćelija



Grafikon 18. Prosečne vrednosti površine jedara ćelija intersticijuma bubrega kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.05$ u odnosu na GM grupu; ## $p < 0.01$ u odnosu na GM grupu

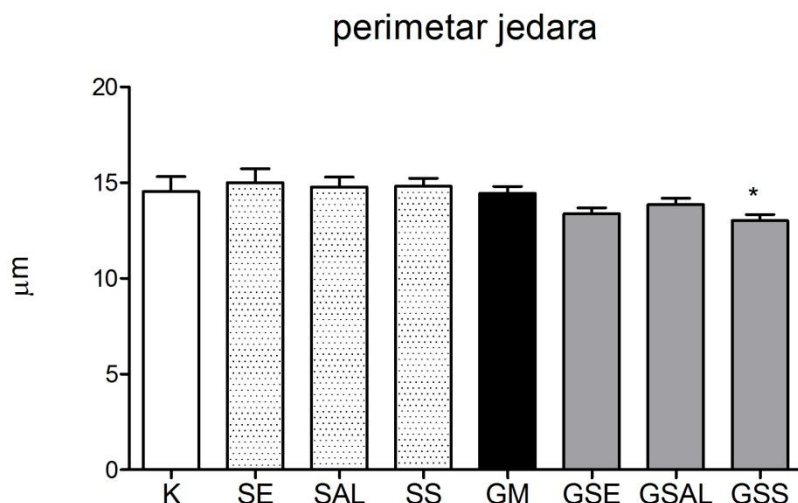
Rezultati jednofaktorskog ANOVA testa su ukazali da se prosečna površina jedara ćelija intersticijuma ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.001$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna površina jedara ćelija intersticijuma GSS grupe statistički značajno niža ($p < 0.05$) od prosečne površine jedara kontrolne grupe. Prosečne površina jedara GSS i GSE grupa bile su statistički značajno niže ($p < 0.05$ i $p < 0.01$) od istih vrednosti kod GM grupe.

optička gustina jedara



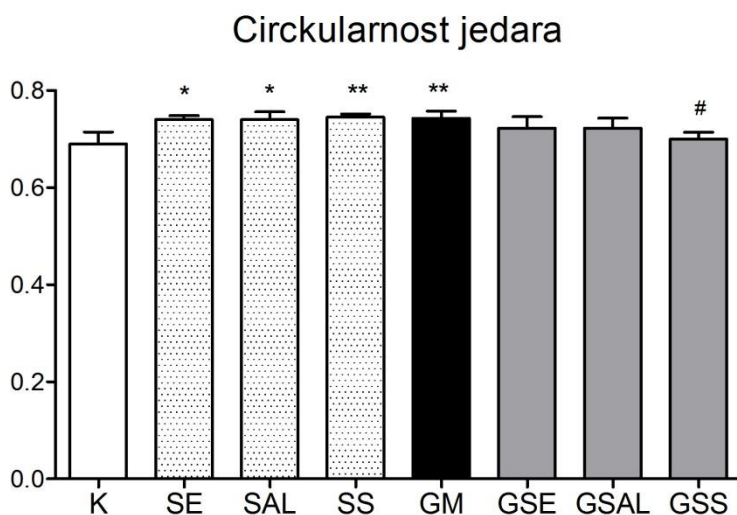
Grafikon 19. Prosečne vrednosti srednje optičke gustine jedara ćelija intersticijuma bubrega kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu.

Statističkom analizom dobijenih vrednosti srednje optičke gustine jedara ćelija intersticijuma pomoću jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečna vrednost ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.05$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna vrednost srednje optičke gustine jedara ćelija intersticijuma SE i GSE grupe statistički značajno niža ($p < 0.05$) od istih vrednosti kod životinja kontrolne grupe. Optička gustina jedara GM grupe bila je dosta niža od istih vrednosti kod kontrolne grupe, ali ove promene nisu na nivou statističke značajnosti. Nadalje se da uočiti da je u životinja GSAL i GSS grupa optička gustina jedara intersticijuma bubrega veća od istih kod GM grupe, ali takođe bez statistički značajnosti.



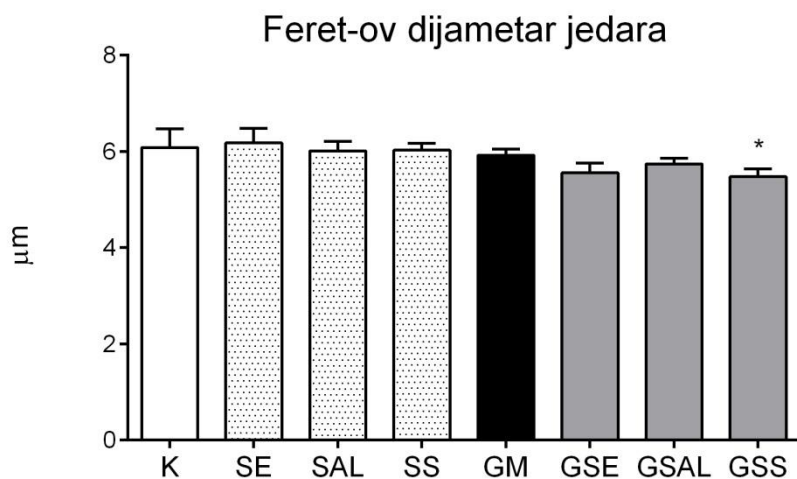
Grafikon 20. Prosečne vrednosti perimetra jedara ćelija intersticijuma bubrega kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu i GM grupu.

Statističkom analizom dobijenih vrednosti perimetra jedara ćelija intersticijuma pomoću jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečna vrednost ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.001$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečan perimetar jedara GSS grupe statistički značajno niži ($p < 0.05$) od istih vrednosti kod kontrolne i GM grupe.



Grafikon 21. Prosečne vrednosti cirkularnosti jedara ćelija intersticijuma bubrega kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu; ** $p < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu; # $p < 0.05$ u odnosu na GM grupu.

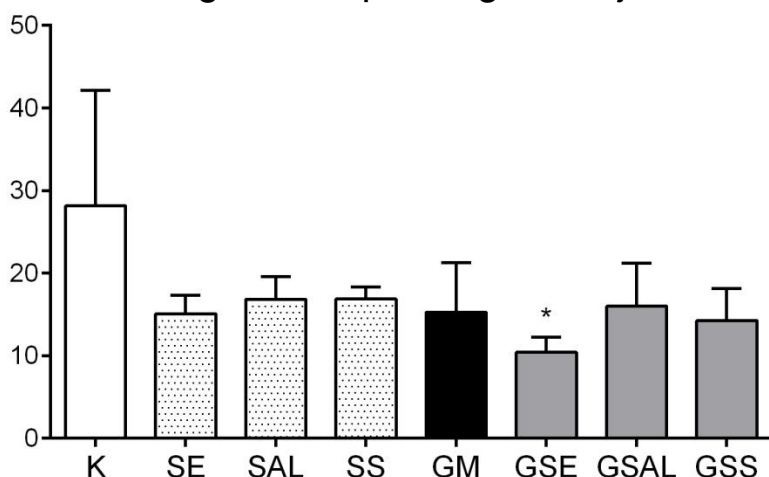
Rezultati jednofaktorskog ANOVA testa su ukazali da se prosečna cirkularnost jedara ćelija intersticijuma ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.001$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna cirkularnost jedara ćelija intersticijuma SAL, SE, SS i GM grupa statistički značajno viša ($p < 0.05$; $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.01$) od istih vrednosti kod kontrolne grupe. Prosečne vrednosti cirkularnosti jedara ćelija intersticijuma kod GSS grupe bile su statistički značajno niže ($p < 0.05$) od istih vrednosti kod GM grupe.



*Grafikon 22. Prosečne vrednosti Feret-ovog dijametra jedara ćelija intersticijuma bubrega kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu.*

Statističkom analizom dobijenih vrednosti Feretovog dijametra jedara ćelija intersticijuma pomoću jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečna vrednost ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.01$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna vrednost Feretovog dijametra jedara ćelija intersticijuma GSS grupe statistički značajno niža ($p < 0.05$) od istih vrednosti kod kontrolne grupe životinja.

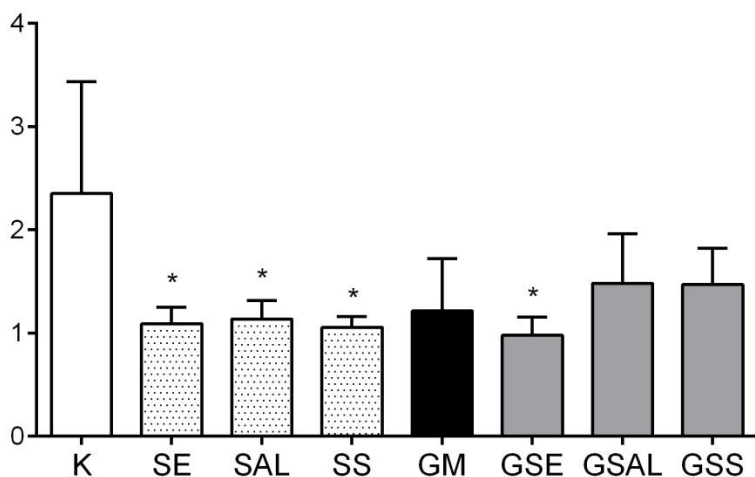
integrirana optička gustina jedara



Grafikon 23. Prosečne vrednosti integrirane optičke gustine jedara ćelija intersticijuma bubrega kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu.

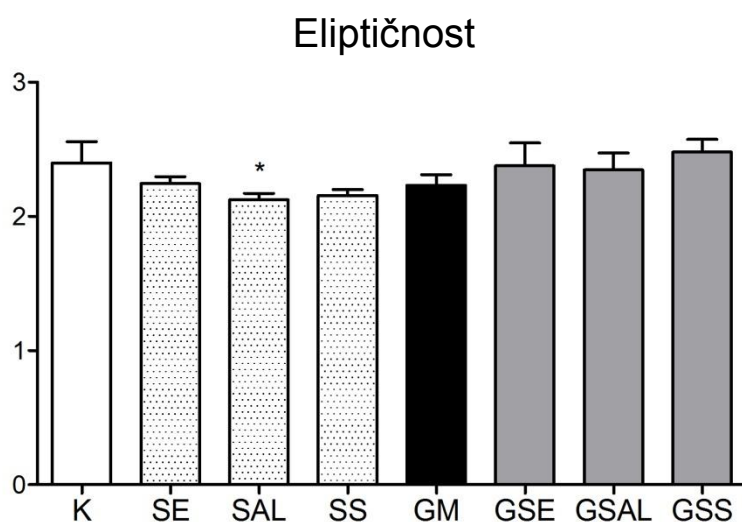
Rezultati jednofaktorskog ANOVA testa su ukazali da se prosečna integrirana gustina jedara ćelija intersticijuma ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.05$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna vrednost integrirane gustine jedara ćelija intersticijuma GSE grupe statistički značajno niža ($p < 0.01$) od istih vrednosti kod kontrolne grupe životinja.

medijanska optička gustina jedara



Grafikon 24. Prosečne vrednosti medijanske optičke gustine jedara ćelija intersticijuma bubrega kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu.

Rezultati jednofaktorskog ANOVA testa su ukazali da se prosečna vrednost medijanske optičke gustine jedara ćelija intersticijuma ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.05$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna vrednost medijanske optičke gustine jedara ćelija intersticijuma SE, SAL, SS i GSE grupa statistički značajno niža ($p < 0.05$) od istih vrednosti kod kontrolne grupe životinja.



*Grafikon 25. Prosečne vrednosti eliptičnosti jedara ćelija intersticijuma bubrege kontrolne i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu.*

Statističkom analizom dobijenih vrednosti eliptičnosti jedara ćelija intersticijuma pomoću jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečna vrednost ispitivanih grupa statistički značajno razlikuje ($p < 0.01$). Tukey-Kramer post hoc test je dodatno ukazao da je prosečna vrednost eliptičnosti jedara ćelija intersticijuma SAL grupe statistički značajno niža ($p < 0.05$) od istih vrednosti kod kontrolne grupe životinja.

6. DISKUSIJA

Korišćenje GM u kliničkoj praksi praćeno je dugotajnim postantibiotskim efektima (Craig i sar., 1987) uključujući organ-specifičnu toksičnost prema kohlearnim (ototoksičnost) i epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega. Nefrotoksičnost se može razviti i prilikom primene uobičajenih terapijskih doza, obično nakon nedelju dana (Malseed i sar., 1995). Od 8 do 26% pacijenata koji primaju ovaj antibiotik razvije oštećenje bubrega (Kahlmeter i sar., 1984). Manifestacije nefrotoksičnosti su dobro proučene kod eksperimentalnih životinja i kod ljudi. Početni znaci sastoje se u prisustvu enzima četkastog pokrova (γ -glutamil-transpeptidaza (γ -GT)) i lizozoma (β -galaktozidaza i N-acetil- β -D-glukozaminidaza (NAG)) u urinu praćenim poliurijom, hipoosmolarnošću urina i smanjenom sposobnošću bubrega da izlučuje koncentrovanu mokraću (Tilkian i sar., 1995). Posledično povećanje ureje u krvi i serumskog kreatinina povezano je sa smanjenjem glomerulske filtracije. Takođe, značajna oštećenja ćelija proksimalnih tubula su odgovorna za glikozuriju, proteinuriju, pojavu cilindra u mokraći i povećane vrednosti Na, K i Mg u urinu (Cojocel i sar., 1984a).

Pored nekoliko opisanih šema za administraciju GM, mi smo se opredelili za intraperitonealnu primenu u dozi od 100 mg/kg tokom osam dana, što je metoda koja potvrđeno izaziva značajnu nefrotoksičnost kod pacova (Stojiljkovic, 2006).

Rezultati naših ispitivanja pokazali su i potvrdili da GM u dozi od 100 mg/kg tokom osam dana kod pacova dovodi do izražene nefrotoksičnosti. Poremećaj ekskretorne funkcije bubrega verifikovan je određivanjem koncentracije natrijuma, kalijuma, kreatinina i ureje u serumu eksperimentalnih životinja.

Naši rezultati pokazuju da administracija GM izaziva ozbiljan poremećaj bubrežne funkcije koji dovodi do značajnog povećanja ureje i kreatinina u serumu tretiranih životinja, zajedno se značajnim smanjenjem nivoa kalijuma. Poznato je da gentamicinska nefrotoksičnost kod eksperimentalnih životinja izaziva akutnu bubrežnu insuficijenciju i smanjenje koncentracije kalijuma u serumu (Cronin i sar., 1991). Nekroza tubula izazvana GM uzrokuje smanjenje broja funkcionalnih nefrona, sa posledičnim smanjenjem glomerulske filtracije. Ovakav efekat može da pokrene kompenzatorne mehanizme u preostalim nefronima, kao na primer poremećaj u brojnim procesima transporta u tubulima uključujući reapsorpciju natrijuma i kalijuma (Abd-El i sar., 2008). Takođe, GM izaziva kontrakciju mezangijalnih ćelija što dovodi do smanjenja koeficijenta ultrafiltracije (Kf) i glomerulske filtracije (Martinez-Salgado i sar., 2007). Pokazano je da GM aktivira

kontrakciju mezangijalnih ćelija u kulturi i izolovanih glomerula pacova (Martinez-Salgado i sar., 2007). Navedena kontrakcija je posledica sinteze i/ili sekrecije nekoliko vazokonstriktora: faktor aktivacije trombocita (PAF) (Dos Santos i sar., 1991), endotelin-1 (Valdivielso i sar., 1999), tromboksan A2 (Papanicolau i sar., 1992) i SKR (Pedrza-Chaverri i sar., 2004). Ovi vazokonstriktori deluju parakrino na vaskularne miocite i izazivaju vazokonstrikciju. Sinteza nekih od nabrojanih supstanci je posredovana aktivacijom fosfolipaze A2 (PLA2). Ovaj enzim katalizuje oslobađanje arahidonske kiseline iz membranskih fosfolipida, iz koje nastaje tromboksan A2 koji dovodi do kontrakcije mezangijuma (Martinez-Salgado i sar., 1997). Aktivnošću PLA2 takođe nastaje PAF iz slobodnih fosfolipida (Lopez-Novoa i sar., 1999). Faktor aktivacije trombocita je važan medijator mezangijalne kontrakcije i dovodi do redukcije Kf i glomerulske filtracije (Lopez-Novoa i sar., 2011). Ovakav nalaz potvrđen je primenom antagonista PAF-a koji su delimično inhibirali kontrakciju izolovanih glomerula i mezangijalnih ćelija u kulturi, kao i smanjenje glomerulske filtracije izazvane GM (Dos Santos i sar., 1991; Rodriguez-Barbero i sar., 1997). Pored stimulacije sekrecije vazokonstriktora, GM takođe blokira sintezu vazodilatatornih prostaglandina (Assael i sar., 1985). Nastala hipoksija dalje stimuliše pojačanu ekspresiju iNOS sa posledičnom hiperprodukcijom NO koji reaguje sa superoksidnim anjonom i formira peroksinitrit, koji dodatno stimuliše vazokonstrikciju i doprinosi smanjenju glomerulske filtracije (Forstermann i sar., 2010).

Jedan od glavnih razloga za smanjenje glomerulske filtracije kod životinja koje su dobijale GM jeste upravo smanjenje bubrežnog protoka krvi. Dokazano je da GM dovodi do značajne redukcije protoka krvi kroz bubrežni protok krvi (Morales i sar., 2002). Takođe, smanjen protok krvi smanjuje i dostupnost kiseonika i ATP ćelijama tubula i ima važnu ulogu u toksičnom oštećenju izazvanom GM. Pošto GM izaziva smanjenje reapsorpcije u tubulima, kao posledica aktivacije tubulo-glomerulske povratne sprege nastaje porast vaskularnog otpora u bubrežnom. To je homeostatski mehanizam koji sprečava veliki gubitak vode i elektrolita urinom u uslovima smanjene tubulske reapsorpcije.

Rezultati laboratorijskih parametara bili su skladu sa morfološkim promenama u tkivu bubrega eksperimentalnih životinja koje su primale gentamicin. Patohistološkom analizom preparata tkiva bubrega GM grupe uočene su promene histoarhitekture u vidu nekroze, naročito u proksimalnim tubulima, što je u skladu sa rezultatima drugih autora (El Mouedden i sar., 2000). Tretman eksperimentalnih životinja sa GM dovodi do apoptoze i nekroze ćelija tubula (Li i sar., 2009). Slična pojava je opisana i u in vitro uslovima (Pessoa i sar., 2009).

Iako je akumulacija GM u lizozomima smatrana za najvažniji faktor njegove tubulske toksičnosti, danas se zna da koncentracija GM u citoplazmi najverovatnije ima presudnu ulogu (Servais i sar., 2008). Najveća količina GM ulazi u ćelije pomoću kompleksa megalin/kubilin, dok manji deo ulazi nezavisno od ovog mehanizma (Myrdal i sar., 2005). Najvažniji korak pretstavlja trenutak kada koncentracija GM u lizozomima, Goldžijevom kompleksu i ER pređe određeni prag i destabiliše njihove membrane (Ngaha i sar., 1983). Oslobođeni GM u citoplazmi deluje na mitohondrije i aktivira mitohondrijalni put apoptoze, dovodi do oksidativnog stresa i smanjuje sintezu ATP (Morales i sar., 2010). Sa druge strane, pucanje lizozoma dovodi do oslobađanja proteaza u citoplazmu, kao što su katepsini, koji indukuju ćelijsku smrt (Schnellmann i sar., 1998). Katepsini katalizuju proteolitičku aktivaciju kaspaza 3 i 7 i aktiviraju mitohondrijalni put apoptoze (Yin i sar., 2006). Iako je na mikroskopskim preparatima GM grupe uočena i apoptoza pojedinih ćelija tubula, dominantan oblik ćelijske smrti koji je zapažen bila je nekroza. Vrsta ćelijske smrti zavisi od koncentracije leka i prisustva drugih potpomažućih faktora, kao što je ishemija ili količina ATP u ćeliji. Hipoksija inhibiše ćelijsko disanje, proizvodnju ATP i povećava osetljivost ćelije na Fas ligand (Steinbach i sar., 2005) i indukuje ćelijsku smrt (Khan i sar., 1999; Modis i sar., 2009). Apoptoza je proces koji zahteva ATP. Kada ćelijske rezerve ATP opadnu, ćelijska smrt gubi tipične karakteristike apoptoze i poprima oblik nekroze (Chiarugi i sar., 2005). Poznato je da GM u ćelijama inhibira sintezu ATP zbog smanjenja količine receptora aktiviranih peroksizomalnim proliferatorom α (PPAR- α). Inače aktivacija PPAR- α stimuliše sintezu ATP preko oksidacije masnih kiselina, i smanjuje apoptozu ćelija tubula izazvanu GM (Hsu i sar., 2008). Najčešće se u in vitro uslovima viđa apoptoza, verovatno zato što je neophodno izložiti ćelije visokim koncentracijama leka (većim od 1 mg/ml) da bi dobili umereni citotoksični efekat (Servais i sar., 2006; Wu i sar., 2009). Zapažena nekroza tubula izazvana GM se može objasniti i preko inhibicije membranskog transporta. Smanjen transport natrijuma iz ćelija izazvan GM indirektno smanjuje količinu glukoze u ćelijama jer se glukoza reapsorbuje kotransportom sa natrijumom iz lumena tubula u ćelije. To dalje smanjuje količinu sintetisanog ATP u ćelijama i smanjuje aktivnost Na/K pumpe. Ova pumpa je glavna komponenta u regulisanju zapremine ćelija. Njena smanjena aktivnost dovodi do nakupljanja natrijuma i vode intraćelijski, ćelijskog otoka i nekroze (Lieberthal i sar., 1996).

Pored masivne nekroze proksimalnih tubula, uočeno je i prisustvo hijalinih cilindara u pojedinim tubulima. Ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima drugih autora (Morales i sar., 2010). Pojava hijalinih cilindara u tubulima se može objasniti pojavom proteinurije u

uslovima smanjene tubulske reapsorpcije, što i jeste slučaj kod akutnog oštećenja bubrega izazvanog GM. Proteinurija je posledica gubitka selektivnosti glomerulske bazalne membrane izazvane GM, najverovatnije zbog neutralizacije negativnog naelektrisanja (De Barros i sar., 1992). Značajnu ulogu u proteinuriji imaju oštećenja tubulskih ćelija i pojedinih transportnih mehanizama vezanih za proksimalne tubulske strukture. Ta područja su upravo i ledirana pri gentamicinskoj nefrotoksičnosti.

Patohistološkom analizom tkiva bubrega grupe životinja kojoj je administriran GM uočena je masivna periglomerulska i peritubulska infiltracija zapaljenskih ćelija kao normalan odgovor tkiva na oštećenje. Ovakav nalaz potvrđen je i morfometrijskom analizom jedara ćelija intersticijuma GM grupe. Naši rezultati su pokazali da je cirkularnost jedara ćelija u intersticijumu nakon primene GM bila značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu. Veća cirkularnost jedra u intersticijumu navodi na zaključak da to nisu vretenasta jedra fibroblasta, koja se tu normalno nalaze, već jedra nekih drugih ćelija, verovatno ćelija bele loze koje su tu dospеле usled oštećenja tubula.

Poznato je da gentamicinska nefrotoksičnost uključuje zapaljenski odgovor kod eksperimentalnih životinja (Bledsoe i sar., 2006; Kalayarasan i sar., 2009) i kod ljudi (Kourilsky i sar., 1982), sa infiltracijom ćelija, aktivacijom rezidentnih ćelija, povećanom produkcijom citokina (Geleilate i sar., 2002; Park i sar., 2009) i povećanom propustljivošću kapilara (Goto i sar., 2004). Zapaljenski odgovor, koji započinje kao odbrambeni mehanizam, na kraju doprinosi napredovanju bubrežnog oštećenja. U svakom slučaju, logično je da zapaljenski odgovor pojačava stepen oštećenja. U početku, destrukcija ćelija putem nekroze vodi ka zapaljenskom odgovoru. Tkivni debri i ćelijski sadržaj u ekstraćelijskom prostoru započinje inflamaciju, zatim akutno zapaljenje doprinosi daljem oštećenju koje pojačava zapaljenski proces (Karkar i sar., 2008). Inflamaciju takođe aktiviraju brojne ćelije u glomerulu, kao što su mezangijalne, epitelne, endotelne ćelije, podociti i leukociti. One proizvode citokine i faktore rasta koji utiču na patofiziološki proces na različite načine, uključujući amplifikaciju tubulskog oštećenja (Garcia-Sanchez i sar., 2010). Dakle, zapaljenje i oksidativni stres čine vezu između nekroze tubula i kontrakcije mezangijalnih ćelija glomerula i krvnih sudova, što dalje doprinosi smanjenju protoka krvi u glomerulu i oštećenju tubula. Strategije kojima se smanjuje oštećenje bubrega izazvano GM obično inhibiraju zapaljenski odgovor organizma (Sue i sar., 2009). U tom smislu, SKR učestvuju u započinjanju i signalizaciji zapaljenja (Cachofeiro i sar., 2008). Ovom činjenicom može da se objasni zašto su antioksidansi veoma efikasni u ublažavanju gentamicinske nefrotoksičnosti

(Maldonado i sar., 2003; Kadkhodaei i sar., 2005). Slobodni kiseonički radikali kao što su superoksid anjon (Schreck i sar., 1991) i vodonik peroksid (Meyer i sar., 1993) aktiviraju nuklearni faktor κ B, koji ima glavnu ulogu u započinjanju zapaljenskog procesa. Nuklearni faktor κ B indukuje ekspresiju prozapaljenskih citokina (Markewitz i sar., 1993) i iNOS (Xie i sar., 1994). Inhibitori nuklearnog faktora κ B štite bubrege od oštećenja izazvanog GM (Tugcu i sar., 2006).

Naši rezultati pokazuju da aplikacija GM dovodi do značajnog porasta površine, obima, cirkularnosti i Feret-ovog dijametra glomerula. Iako se do skoro smatralo da GM ne dovodi do značajnih morfoloških promena u glomerulima, nedavna istraživanja su pokazala da u visokim dozama GM indukuje blago uvećanje glomerula sa izmenom njihovog okruglog oblika i optičke gustine (Stojiljkovic i sar., 2008). Naši rezultati pokazuju da primena GM nije dovela do značajne promene celularnosti u glomerulu. Navedeni rezultat upućuje da se uvećanje glomerula može objasniti porastom ćelijske populacije u glomerulu. Drugim rečima, sa porastom glomerula došlo je i do proporcionalnog porasta broja ćelija u glomerulu. Martinez-Salgado i sar. (2004) su pokazali da tretman pacova GM dovodi do povećanja proliferacije u glomerulu. U istoj studiji je GM paralelno sa proliferacijom stimulisao i apoptozu. Pažljiviji pogled ukazuje da je u eksperimentalnim uslovima pri primenjenoj dozi GM proliferacija bila veća od apoptoze. Takođe je zapaženo neto povećanje broja ćelija nakon tretmana GM. Ovo povećanje nije bilo statistički značajno.

Dosadašnje studije su pokazale da GM aktivira proliferaciju mezangijalnih ćelija *in vitro* bez promene u broju ćelija (Rodriguez-Barbero i sar., 1995; Martinez-Salgado i sar., 2004). Zbog toga se smatralo da GM može da indukuje proliferaciju i apoptozu u isto vreme u mezangijumu, i tako održi broj ćelija na normalnom nivou. Međutim, nijedna studija nije dokazala povećanje broja mezangijalnih ćelija nakon tretmana GM. Takva pojava nije specifična samo za GM. Istovremena proliferacija i apoptoza ćelija tubula, intersticijuma i glomerula je opisana u modelu hronične opstruktivne uropatije (Truong i sar., 1996) i u subtotalnoj nefrektomiji (Thomas i sar., 1998). To navodi na zaključak da proliferacija i/ili apoptoza mogu da budu posledica tkivne homeostaze kao odgovor na oštećenje, pre nego direktan efekat oštećenja na ćelije. U slučaju GM, situacija se komplikuje dvostrukim dejstvom (proliferacija i apoptoza) na mezangijalne ćelije (Martinez-Salgado i sar., 2004). Može se spekulirati da bi sa povećanjem doze GM porasla i citotoksičnost (apoptoza), pa bi određena doza dovela do ravnoteže između proliferacije i apoptoze. Porast doze bi povećao citotoksičnost. Međutim, takve studije nisu objavljene. Analizom radova koji se tiču ove

tematike dolazi se do zaključka da doza GM i uslovi eksperimenta nemaju uticaj na promenu broja ćelija u glomerulu. Logično objašnjenje bi bilo da GM ne izaziva direktni proliferativni efekat na mezangijalne ćelije in vivo. Suprotno, GM izaziva dozno zavisnu apoptozu mezangijalnih ćelija, što aktivira homeostatski, proliferativni odgovor. Poslednjih godina je pokazano da GM izaziva apoptozu tubulocita tako što povećava propustljivost lizozoma i aktivira kaspazu 3 (Servais i sar., 2005), što je u vezi sa snažnim toksičnim dejstvom na tubule in vivo. Jedan od razloga zašto GM slabije izaziva apoptozu u mezangijalnim ćelijama može biti manje preuzimanje GM u ove ćelije, i time nedovoljna intraćelijska koncentracija za započinjanje apoptoze. Citotoksični efekti GM na mezangijalne ćelije verovatno uključuju i aktivaciju CaSR, kao što je slučaj sa ćelijama tubula (Ward i sar., 2002). Imajući u vidu navedene činjenice, moguća su dva mehanizma gentamicinske citotoksičnosti: 1) Odlučujući faktor citotoksičnosti je koncentracija GM u okolini CaSR (ne preuzimanje u ćelije); 2) preuzimanje GM je neophodno za aktivaciju drugih ko-stimulatornih signalnih puteva neophodnih za apoptozu nakon stimulacije CaSR.

Analizom rezultata površine epitela proksimalnih tubula bubrega pokazano je da GM ne dovodi do statistički značajnih promena ovog parametra u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Ovakav rezultat treba uzeti sa rezervom, obzirom na to da su analizom bili obuhvaćeni samo oni proksimalni tubuli koji su bili jasno uočljivi. Imajući u vidu prisutnu masivnu nekrozu tubula kod životinja koje su primale GM, jasno je da takvi tubuli nisu mogli biti analizirani zbog gubitka ćelijskih kontura. Dakle, kod GM grupe analizirani su oni proksimalni tubuli koji nisu bili zahvaćeni nekrozom. Površina epitela ovih tubula bila je čak i veća, doduše ne statistički značajno u odnosu na kontrolu. Najverovatnije se radilo o ćelijama zahvaćenim edemom, početnom fazom oštećenja izazvanog GM u čijoj osnovi stoji smanjenje aktivnosti Na/K pumpe (Lieberthal i sar., 1996).

Površina epitela distalnih tubula kod GM grupe nije se statistički razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu, pa možemo zaključiti da GM ne remeti bitno ćelije distalnih tubula bubrega, što je u skladu sa opšteprihvaćenim stavom da GM dominantno oštećuje ćelije proksimalnih tubula (Quiros i sar., 2011).

Iako tačan mehanizam ćelijskog oštećenja izazvanog GM nije potpuno jasan, smatra se da u osnovi stoji oksidativni stres izazvan prekomernom produkcijom SKR (Cuzzocrea i sar., 2002). Ovi visokoreaktivni molekuli direktno reaguju sa ćelijskim komponentama, uključujući lipide, proteine i DNK, i remete njihovu funkciju i strukturu. U cilju određivanja

oksidativnog stresa i njegove uloge u oštećenju bubrega izazvanog GM u našoj studiji mereni su krajnji produkti oksidativnog oštećenja lipida i proteina, MDA i karbonilne grupe proteina. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da tretman GM tokom 8 dana u dozi od 100 mg/kg dovodi do značajnog porasta koncentracije MDA u tkivu bubrega. Ovakav nalaz sugerije da GM dovodi do oksidativnog stresa u bubregu tretiranih životinja. Poznato je da oksidativni stres ima važnu ulogu u gentamicinskoj nefrotoksičnosti (Ali i sar., 2011). Tretman GM stimuliše oksidativni stres u ćelijama tubula kako in vivo (Karatas i sar., 2004) tako i u kulturi ćelija (Juan i sar., 2007). Slobodni kiseonički radikali, uglavnom superoksidni anjoni i hidroksilni radikali, izazivaju oštećenje ćelija i smrt putem različitih mehanizama. Pomenuti mehanizmi uključuju inhibiciju transportnog lanca elektrona, ćelijskog disanja i sinteze ATP (Cuzzocrea i sar., 2004). Takođe, SKR stimulišu otpuštanje citohroma C iz mitohondrijalog intermembranskog prostora, lipidnu peroksidaciju, aktiviraju receptore smrti (Fas i dr.) i stvaraju proapoptotske lipidne metabolite (4-hidroksionenal i ceramid) (Morgan i sar., 2007; Ott i sar., 2007; Ryter i sar., 2007; Santos i sar., 2009). Pored toga, bubrenje ćelija, gubitak integriteta membrane i nekroza mogu nastati inhibicijom transporta natrijuma putem oksidativne inhibicije Na/K pumpe i kanala za natrijum od strane SKR (Yokouchi i sar., 2008).

Pored ćelijskih lipida i proteini takođe mogu biti oštećeni u višku slobodnih radikala. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je koncentracija karbonilnih grupa proteina u tkivu bubrega pacova tretiranih GM bila značajno veća u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijeni rezultati su u skladu sa eksperimentima u kojima je dokazano da karbonilni derivati proteina nastaju tokom nefrotoksičnosti kao posledica oksidativnog stresa (Orozco-Ibarra i sar., 2007). Opšte je poznato da su proteini osetljivi na oštećenje od strane SKR in vitro i in vivo, i da oksidativna modifikacija proteina može da dovede do strukturnih poremećaja i funkcionalne inaktivacije mnogih enzima (Sitte i sar., 2000). Među brojnim oksidativnim modifikacijama amino kiselina u proteinima, formiranje karbonilnih grupa proteina pretstavlja rani marker oksidacije proteina (Dursun i sar., 2005). To se može desiti u različitim fiziološkim ili patološkim procesima, koji mogu biti primarni ili sekundarni. Primarne modifikacije se dešavaju u oksidacijama koje katalizuju metali, oksidaciji izazvanoj radijacijom, ozonom ili oksidima azota (Stadtman i sar., 1986). Sekundarne modifikacije nastaju kada molekuli stvoreni oksidacijom drugih supstanci modifikuju proteine. Visokoreaktivni hidroksilni radikal, jedan od SKR nastalih u procesu koji vodi ka oksidativnom stresu, se smatra odgovornim za formiranje karbonilnih grupa u proteinima (Oliver i sar., 1987). Oksidacija

proteina može dovesti do gubitka ključnih sulfidrilnih grupa, što dalje vodi ka proteolitičkoj degradaciji, koja može da zahvati strukturu, funkciju i integritet ćelije (Carney i sar., 1991).

6.1. Protektivno dejstvo salicilne kiseline na akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvanu gentamicinom

Rezultati naših laboratorijskih analiza krvi pacova GSAL grupe pokazali su da suplementacija salicilnom kiselinom u dozi od 100 mg/kg normalizuje serumske vrednosti K, ureje i kreatinina, i štiti bubrežnu funkciju od poremećaja izazvanog GM. Protektivni efekat SAL na razvoj akutne bubrežne slabosti izazvane GM može se tumačiti antioksidativnim svojstvima SAL. U nefrotoksičnosti izazvanoj primenom GM raste koncentracija SKR. Porast SKR izaziva oksidativni stres i sledstvena oštećenja pojedinih struktura bubrega (proksimalni tubuli, glomeruli) (Hughes i sar., 1996). Primena SAL smanjuje koncentraciju SKR u bubregu a samim tim umanjuje efekte oksidativnog stresa. Azot oksid (NO) igra glavnu ulogu u lokalnoj regulaciji protoka krvi u bubregu i utiče na intraglomerulsku dinamiku. Rivas-Cabanero i sar. (1994) su dokazali pojačano stvaranje NO u glomerulima pacova tretiranih GM. Slični rezultati su dobijeni i u kulturi mezangijalnih ćelija inkubiranih sa GM (Rivas-Cabanero i sar., 1997). Novije studije su pokazale da GM dovodi do povećane ekspresije inducibilne NO sintaze (iNOS) u glomerulima tretiranih pacova (Martinez-Salgado i sar., 2005). Povećana aktivnost iNOS je odgovorna za povećanje sinteze NO a verovatno i za povećanje koncentracije SKR nakon tretmana GM (Martinez-Salgado i sar., 2004). Smatra se da NO u malim količinama reguliše fiziološku vazodilataciju. Blagi porast NO u bubregu daje vazodilatatorni efekat. Neke eksperimentalne studije koje se odnose na ispitivanje ishemijske nefropatije su pokazale da primena vazodilatatora umanjuje nefrotoksičnost izazvanu ishemijom bubrega. Koncentracije NO koje imaju vazodilatatorni efekat u bubregu ispoljavaju benefični efekat kod nefrotoksičnosti uzrokovane GM. Sa druge strane, povećana koncentracija NO, nastala kao rezultat pojačane ekspresije iNOS, dovodi do citotoksičnih efekata u okolnim ćelijama. Oštećenje ćelija u višku NO može nastati putem nekoliko mehanizama. Oni uključuju: poremećaj mitohondrijalnog disanja, inhibiciju enzima, nitrozilaciju proteina i lipidnu peroksidaciju preko metabolita kao što je peroksinitrit, nastao reakcijom između NO i O_2^- (Gordge i sar., 1998). Imajući ove činjenice u vidu, od posebne važnosti su studije u kojima je pokazano da SAL inhibira ekspresiju iNOS (Kepka-Lenhart i sar., 1996; Aeberhard i sar., 1995). Ova inhibicija može biti posledica dejstva na transkripcijom (Farivar, 1996) ili translacionom nivou (Sakitani i sar., 1997). Protektivno

dejstvo SAL na funkciju bubrega u našem istraživanju je u skladu sa podacima iz literature o nefroprotektivnom dejstvu SAL na nefrotoksičnost cisplatina (Li i sar., 2002).

Rezultati patohistološkog ispitivanja tkiva bubrega GSAL grupe su pokazali da SAL pored protektivnog dejstva na poremećaj funkcije bubrega izazvan GM slično deluje i na morfološka oštećenja. Uočene mikromorfološke promene u tkivu bubrega životinja koje su tretirane GM i SAL bile su značajno blaže u odnosu na promene izazvane samo GM. Važno je istaći da u ovoj grupi nisu zabeleženi znaci ireverzibilnog oštećenja u vidu nekroze i prekida bazalne membrane tubula. Morfometrijska analiza glomerula GSAL grupe pokazala je da SAL deluje protektivno na promene opisane kod GM grupe. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da su u ovoj grupi površina glomerula, perimetar i Fervov dijametar značajno manji u odnosu na životinje tretirane samo GM. Vrednost celularnosti glomerula u ovoj grupi bila je značajno veća u odnosu na kontrolu. Obzirom na to da je došlo do uvećanja broja ćelija bez bitnog uvećanja glomerula, možemo zaključiti da je u ovom slučaju došlo do proliferacije mezangijalnih ćelija ali bez uvećanja mezangijalnog matriksa prisutnog u GM grupi.

Postoji nekoliko mehanizama kojima se može objasniti značajno ublažavanje mikromorfoloških oštećenja bubrega kao posledica suplementacije SAL. Jedan od njih se zasniva na činjenici da u mnogim bolestima i akutnim zapaljenskim poremećajima, neutrofili imaju sposobnost da sekretuju agense koji mogu da oštete zdrave ćelije i vezivno tkivo (Reiter i sar., 2000). Brojni dokazi ukazuju da u stanju oksidativnog stresa mezangijalne ćelije i neutrofili luče hemotoksične supstance. To dalje stimuliše migraciju novih neutrofila u bubrege i povećava oštećenje tkiva (Reiter i sar., 2000). U tkivu bubrega životinja tretiranih GM i SAL uočena je blaga infiltracija zapaljenskih ćelija koja je bila značajno manja u odnosu na infiltraciju u GM grupi. Značajno smanjenje infiltracije mononuklearnih ćelija potvrđeno je i rezultatima morfometrijskog ispitivanja jedara ćelija intersticijuma u ovoj grupi. Salicilna kiselina na više načina inhibira infiltraciju zapaljenskih ćelija u bubrege i time sprečava oštećenje tkiva.

NF- κ B je jedan od glavnih transkripcionih faktora koji ima ulogu u procesima zapaljenja, apoptoze i rasta u hroničnim bolestima (Wardle i sar., 2001). U uslovima oksidativnog stresa dolazi do aktivacije NF- κ B i indukcije sinteze inflamatornih supstanci (citokina, faktora rasta i adhezionih molekula) (Li i sar., 1999). Dakle, blokada NF- κ B bi imala protektivni efekat na nefrotoksičnost. Dokazano je da SAL inhibira aktivaciju NF- κ B

(Kopp i sar., 1994). Nalaz da SAL inhibira NF- κ B ukazuje da je anti-inflamatorna aktivnost salicilata delimično povezana sa inhibicijom ovog transkripcionog faktora.

Poznato je da je adhezija cirkulišućih leukocita za endotel kapilara ključni korak u transendotelnoj migraciji (Springer i sar., 1995). Ekspresija adhezionih molekula na endotelnim ćelijama je regulisana preko NF- κ B (Collins i sar., 1995). Kao posledica inhibicije NF- κ B, SAL inhibira transendotelnu migraciju neutrofila (Pierce i sar., 1996).

Takođe je dokazano da natrijum salicilat inhibira ekspresiju P-selektina izazvanu IL-4 u humanim endotelnim ćelijama (Xia i sar., 1998). Inhibicija se odigrava na transkripcionom nivou koji je nezavisan od NF- κ B. P-selektin je prisutan na endotelu krvnih sudova i igra važnu ulogu u transmigraciji leukocita. Vezivanje P-selektina za glikoproteinske receptore na površini ćelije započinje marginaciju i kotrljanje leukocita na zidu krvnog suda i pomaže adheziju leukocita preko integrina (McEver i sar., 1997). Adherisani leukociti migriraju kroz zid krvnog suda i započinju zapaljensku reakciju (Zimmerman i sar., 1996; Kansas i sar., 1996). Pro-zapaljenski medijatori povećavaju broj molekula P-selektina na endotelu krvnih sudova i tako olakšavaju nakupljanje leukocita (Zimmerman i sar., 1996; Kansas i sar., 1996). Pored inhibicije migracije leukocita, SAL deluje inhibitoryno i na mijeloperoksidazu (MPO) preko svog glavnog metabolita gentizinske kiseline (Hermann i sar., 1999). U stanjima akutnog i hroničnog zapaljenja MPO se oslobađa iz neutrofilnih leukocita i može da dovede do ozbiljnih oštećenja makromolekula u ćelijskim membranama (Deby-Dupont i sar., 1999). Pored pobrojanog uticaja SAL na zapaljenske ćelije, u literaturi je opisana i sposobnost SAL da indukuje snažnu apoptozu neutrofila (Derouet i sar., 2006). Apoptoza efektornih ćelija imunskog sistema je neophodna za uspešnu rezoluciju zapaljenja. Neutrofili su jedinstveni među ćelijama imunskog sistema u tome da imaju izuzetno visoku stopu konstitutivne apoptoze, i imaju polu-život od samo 12 do 18 sati (Edwards i sar., 2003). Tokom zapaljenja, izlaganje neutrofila prozapaljenskim signalima kao što su citokini, može da odloži ali ne i zaustavi apoptozu tako da neutrofili na mestima zapaljenja imaju duže preživljavanje. U nekim zapaljenskim poremećajima neregulisana apoptoza neutrofila i njihovo produženo preživljavanje mogu da doprinesu oštećenju tkiva. Stimulacijom apoptoze neutrofila u našem eksperimentu, SAL smanjuje njihov polu-život u tkivu burega i smanjuje mogućnost da svojom aktivnošću doprinesu daljem oštećenju tkiva. Dakle, inhibicija aktivnosti neutrofila, MPO, kao i stimulacija apoptoze od strane SAL smanjuje oštećenje tkiva u gentamicinskoj nefrotoksičnosti.

Rezultati naše biohemijske analize parametara oksidativnog stresa u tkivu bubrega su pokazali da su vrednosti MDA i karbonilnih grupa proteina značajno manje u grupi životinja tretiranih GM i SAL u odnosu na životinje tretirane samo GM. Ovakav nalaz ukazuje da SAL smanjuje stvaranje slobodnih radikala u bubregu pod dejstvom GM i prevenira nastanak oksidativnog stresa kao jednog od glavnih uzroka GM nefrotoksičnosti. Razlozi za ovakvo dejstvo SAL su višestruki i uključuju sposobnost SAL da sakuplja slobodne radikale i vezuje jone metala bakra i gvožđa. Poznato je da SAL deluje kao sakupljač hidroksilnih radikala (Grootveld i sar., 1986). Među SKR, smatra se da je hidroksilni radikal najopasniji i najodgovorniji za oksidaciju proteina i lipida (Kaur i sar., 1994). Glavni dokaz o ovoj aktivnosti je sposobnost SAL da pretrpi proces aromatične hidroksilacije u reakciji sa HO⁻ (Aruoma i sar., 1988). Štaviše, aplikacija SAL kao hemijske zamke za HO⁻ predstavlja jednostavan i pouzdanu tehniku za određivanje stvaranja slobodnih radikala in vitro i in vivo (Sagone i sar., 1987). Glavni proizvodi reakcije SAL i HO⁻ u fiziološkim uslovima su 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina (2,5-DHBA, gentizinska kiselina) i 2,3-dihidroksibenzoeva kiselina (2,3-DHBA). Za 2,3-DHBA se zna da snažno vezuje gvožđe koje je neophodno za stvaranje HO⁻ kroz Fentonovu reakciju (Graziano i sar., 1974). Dokazano je i da SAL ima sposobnost vezivanja jona gvožđa i bakra (Cheng i sar., 1996). Gvožđe katalizuje proces lipidne peroksidacije u kome kao krajnji produkt nastaje MDA (Jomova i sar., 2011). Sa druge strane brojne studije su pokazale da u uslovima oksidativnog stresa dolazi do porasta slobodnog gvožđa u ćeliji otpuštanjem iz fizioloških depoa (Aroun i sar., 2012). Iz navedenih podataka može se zaključiti da su oksidativni stres i gvožđe tesno povezani i da na neki način stimulišu jedan drugog. Dakle, vezivanje tranzitornih metala na mestima zapaljenja smanjuje verovatnoću stvaranja HO⁻ kroz Fentonovu reakciju (Aruoma i sar., 1988). U ovom slučaju SAL ima dvostruko dejstvo na proces oksidativnog stresa tako što vezuje slobodno intraćelijsko gvožđe, kao i sam nastali hidroksilni radikal. Pored toga, nastali kompleks gvožđe-SAL poseduje aktivnost sličnu superoksid dismutazi (SOD), enzimu sa antioksidativnom aktivnošću (Jay i sar., 1999). Takođe, dokazano je da gvožđe i SAL-gvožđe kompleks inhibira ksantin oksidazu, što predstavlja još jedan mehanizam antioksidativnog dejstva SAL (Jay i sar., 1999). Zanimljivo je istaći još jedno svojstvo SAL koje je specifično za in vivo uslove. Primećeno je da kada se koristi u lečenju zapaljenskih procesa, SAL postiže visoke koncentracije u žarištima zapaljenja (Sholkoff i sar., 1967). To ukazuje da je SAL bolji in vivo sakupljač slobodnih radikala u odnosu na druge poznate antioksidante (npr. askorbinska kiselina, GSH) ne samo zbog specifičnog delovanja na mestu zapaljenja i

vezivanja gvožđa, već i zbog brze reakcije HO^- sa SAL ($6-10 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) (Shi i sar., 1999).

6.2. Protektivno dejstvo selena na akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvanu gentamicinom

U cilju utvrđivanja potencijalnih protektivnih efekata selena na nefrotoksičnost i oksidativni stres izazvan gentamicinom, analizirali smo da li suplementacija selenom u dozi od 1 mg/kg tokom 8 dana utiče na funkcionalna, morfološka i morfometrijska oštećenja bubrega opisana kod životinja tretiranih GM.

Rezultati naših laboratorijskih analiza krvi pacova GSE grupe pokazali su da suplementacija selenom normalizuje serumske vrednosti K, ureje i kreatinina, i štiti bubrege od poremećaja funkcije izazvanog GM. Protektivni efekat selena na vrednosti serumskih koncentracija ureje i kreatinina može se pripisati njegovom antioksidativnom svojstvu, pošto je poznato da su SKR uključeni u poremećaj glomerulske filtracije (Pedraza-Chaverri i sar., 2000). Selen ispoljava antioksidativna svojstva *in vivo* tako što povećava aktivnost antioksidativnih enzima GPx i TRx (Xia i sar., 2003). Aktivnost selenoenzima je direktno proporcionalna koncentraciji selena u krvi (Allan i sar., 1999). Pored navedene antioksidativne aktivnosti, selen popravlja narušenu hemodinamiku u bubregu i na druge načine. Nedavno je dokazano da suplementacija selena aktivira PPAR γ u kulturi ćelija (Vunta i sar., 2007). Ovaj receptor je prisutan u endotelnim ćelijama (Xin i sar., 1999) i vaskularnim glatko mišićnim ćelijama (Iijima i sar., 1998) gde ima ulogu u regulaciji tonusa. Produkcija nekoliko vazokonstriktora je povećana prilikom tretmana sa GM. Tu se primarno misli na endotelin-1 (Valdivielso i sar., 1999), PAF i metabolite arahidnoske kiseline, uglavnom prostaglandine i tromboksan A2 (Papanikolaou i sar., 1992; Assael i sar., 1985). Svi oni deluju parakrino na vaskularne miocite i izazivaju vazokonstrikciju. Pored stimulacije sinteze vazokonstriktora, GM takođe blokira sintezu vazodilatatornih prostaglandina (Papanikolaou i sar., 1992). Aktivatori PPAR γ inhibiraju sintezu endotelina-1 u endotelnim ćelijama (Delerive i sar., 1999). Aktivacija PPAR γ suprimira transkripciju receptora za angiotenzin 1 (AT1) (Sugawara i sar., 2001) i tromboksan sintazu (Ikeda i sar., 2000). Pored toga, dokazano je da aktivacija PPAR γ smanjuje krvni pritisak (Ogihara i sar., 1995) i umanjuje mikroalbuminuriju (Imano i sar., 1998). Navedeni podaci ukazuju na ulogu PPAR γ u regulaciji sistemske cirkulacije i hemodinamike. Ovu tvrdnju podupiru nalazi da PPAR γ ligandi smanjuju krvni pritisak (Buchanan i sar., 1995), inhibiraju kontrakciju aorte preko inhibicije

ulaska jona kalcijuma kroz voltažne kanale (Goud i sar., 1998) i smanjuju sekreciju endotelina iz endotelnih ćelija (Satoh i sar., 1999). Još jedan od mogućih mehanizama protektivnog dejstva selena na funkciju bubrega ogleda se u sposobnosti agonista PPAR γ da inhibiraju sistem renin-angiotenzin-aldosteron, obzirom na dokazanu aktivaciju ovog sistema putem GM (Ren i sar., 2011). Aktivacija PPAR γ je posredovana produkcijom 15-deoksi-delta12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) (Nosjean i sar., 2002). Jedno od brojnih svojstva ovog antizapaljenskog prostaglandina je da inhibira iNOS (Reilly i sar., 2001). Rivas-Cabanero i sar. (1994) su dokazali pojačno stvaranje NO u glomerulima pacova tretiranih GM. Produkcija NO je takođe povećana i u mezangijalnim ćelijama u kulturi kada se inkubiraju sa GM (Rivas-Cabanero i sar., 1997). Martinez-Salgado i sar. (2005) su pokazali povećanje ekspresije inducibilne (iNOS) i konstitutivne (cNOS) NO sintaze u glomerulima pacova tretiranih GM. U glomerulima netretiranih životinja cNOS je stalno eksprimirana, dok je ekspresija iNOS posledica tretmana GM. Povećana ekspresija NO sintaze je odgovorna za povećanje produkcije NO (Rivas-Cabanero i sar., 1997). Štaviše, povećana aktivnost iNOS je možda odgovorna za povećano stvaranje SKR koje je prisutno nakon tretmana GM (Martinez-Salgado i sar., 2004). Dakle, suplementacija selena i posledična produkcija 15d-PGJ2 smanjuje prekomernu sintezu NO u bubregu i na taj način doprinosi očuvanju njegove normalne ekskretorne funkcije.

Rezultati biohemijske analize krvi životinja tretiranih GM i Se bili su skladu sa patohistološkim i morfometrijskim nalazom u tkivu bubrega ove grupe. Uočene mikromorfološke promene bile su znatno blaže u odnosu na promene prisutne u grupi tretiranoj GM. Bazalna membrana tubula i glomerula bila je očuvana što ukazuje da nije bilo znakova ireverzibilnih promena. Od posebne važnosti je nalaz znatno manje infiltracije zapaljenskih ćelija u tkivu bubrega ove grupe. To se jasno vidi na preparatima bojenim HE i PAS metodom, dok je ova činjenica potvrđena i morfometrijskom analizom jedara intersticijuma. Makrofagi imaju centralnu ulogu kao efektorne ćelije u zapaljenskim reakcijama i imunskom odgovoru. Dok vrše svoju fiziološku ulogu, ove ćelije proizvode SKR u obliku superoksidnog anjona i vodonik peroksida zajedno sa velikim brojem prozapaljenskih supstanci (Speer i sar., 1989). Navedene reakcije predstavljaju potencijalno štetni događaj, koji ako se ne izbalansira, može da dovede do oštećenja membrana, DNK i inaktivacije proteina, što pretstavlja patofiziološki mehanizam u mnogim poremećajima i bolestima (Toyokuni i sar., 1999; Spector i sar., 2000). Postoje brojni dokazi da Se ima antizapaljensko dejstvo (Duntas i sar., 2009). U akutnom i hroničnom zapaljenju

koncentracija selen u serumu je po pravilu smanjena (Maehira i sar., 2002). Sa druge strane, suplementacija selenom u ovakvim stanjima dovela je do povećanja aktivnosti GPx, smanjenog oksidativnog stresa i boljeg kliničkog ishoda (Angstwurm i sar., 1999). Anti-zapaljensko dejstvo Se je vezano za njegov efekat na ćelije imunskog sistema, naročito na prenos signala u makrofagima. Jedna od studija je pokazala da suplementacija Se dovodi do značajnog umanjenja ekspresije glavnih proinflamatornih gena TNF- α i COX-2 nakon stimulacije bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) (Zamamiri i sar., 2002). Ovaj efekat je bio posredovan inhibicijom NF- κ B. U in vivo uslovima, količina Se reguliše aktivnost GPx koja smanjuje koncentraciju slobodnih radikala u ćeliji. Pojačana ekspresija GPx inhibiše aktivaciju NF- κ B putem inhibicije fosforilacije I κ B (Kretz-Remy i sar., 1996). Pored ovog, dokazano je da Se smanjuje afinitet vezivanja NF- κ B i AP-1 za DNK tako što indukuje oksidaciju cisteinskih ostataka u ovim transkripcionim faktorima (Jeong i sar., 2002). TNF- α je snažan stimulator adhezionih molekula kao što su intraćelijski adhezioni molekul-1 (ICAM-1), vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1 (VCAM-1) i endotelni leukocitni adhezioni molekul-1 (E-selektin). Ovi molekuli su neophodni za nakupljanje leukocita na mestima zapaljenja i prolaz kroz endotel (Vunta i sar., 2008). Dakle, povišen nivo Se može delovati inhibitorno na NF- κ B i umanjiti zapaljenje. Još jedan od mehanizama anti-zapaljenskog dejstva Se je posredovan stimulacijom sinteze antiinflamatornog prostaglandina 15d-PGJ₂, koji je takođe inhibitor NF- κ B (Vunta i sar., 2007). Kao što je ranije pomenuto, 15d-PGJ₂ predstavlja jedan od najvažnijih endogenih stimulatora jedarnog receptora PPAR γ (Forman i sar., 1995). Aktivatori PPAR γ su važni modulatori sa anti-zapaljenskim dejstvom i uticajem na aktivaciju NF- κ B. Ranije studije su pokazale da PPAR γ može da inhibira ekspresiju proinflamatornih gena na više načina. Pomenuti mehanizmi uključuju: kompeticiju za ograničen broj koaktivatora, direktnu interakciju sa NF- κ B, p65 i p50 podjedinicama i izmenu aktivnosti p38 MAPK (Ricote i sar., 2007). Nakon stimulacije endotelnih ćelija sa TNF- α , PPAR γ sprečava ekspresiju adhezionih molekula kao i adheziju leukocita (Sasaki i sar., 2005). U makrofagima agonisti PPAR γ blokiraju ekspresiju inflamatornih gena zavisnih od TLR (toll-like receptor) pomoću molekularnog mehanizma nazvanog transrepresija zavisna od liganda (Dasu i sar., 2009). Mnogi agonsti PPAR γ se uspešno koriste u terapiji zapaljenskih bolesti kao što su ateroskleroza (Francis i sar., 2003) i dijabetes (Staels i sar., 2005). Nedavno su opisani i protektivni efekti PPAR γ agonista u bubregu, i to na glomerulskom, tubulskom i vaskularnom nivou (Izzedine i sar., 2005). Pioglitazon, jedan od sintetskih PPAR γ agonista je u eksperimentalnim uslovima umanjio oksidativni stres u bubregu pacova (Gumieniczek i sar., 2003).

Morfometrijska analiza glomerula GSE grupe pokazala je da Se deluje protektivno na promene opisane kod GM grupe. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da su u ovoj grupi area glomerula, perimetar i Fertov dijametar značajno manji u odnosu na životinje tretirane samo GM. Vrednost celularnosti glomerula u ovoj grupi bila je značajno veća u odnosu na kontrolu i GM grupu. Ovakvi rezultati nas navode na zaključak da selen u dozi korišćenju u našem eksperimentu nema uticaj na proliferaciju ćelija u glomerulu izazvanu GM. Sa druge strane, suplementacija selenom je značajno umanjila produkciju mezangijalnog matriksa i posledično uvećanje glomerula, što verovatno predstavlja protektivni mehanizam koji je potvrđen drugim metodama. Jedno od mogućih objašnjenja za opisane efekte selena u glomerulima je indirektna aktivacija PPAR γ putem 15d-PGJ2, kao što je ranije spomenuto. Aktivacija PPAR γ u mezangijalnim ćelijama smanjuje prekomernu produkciju mezangijalnog matriksa u eksperimentalnom modelu dijabetesne nefropatije (Calkin i sar., 2006). Kod specijalne vrste pacova koji spontano razvijaju dijabetes tip 2 hipertrofija glomerula je u korelaciji sa pojačanom ekspresijom Bcl-2 proteina koji inhibira apoptozu u mezangijalnim ćelijama (Okada i sar., 2006). Ovakav nalaz ukazuje da povećana i produžena proliferacija mezangijalnih ćelija doprinosi abnormalnoj sekreciji matriksa prilikom oštećenja glomerula. Gen koji kodira Bcl-2 ima PPAR reagujući element preko koga PPAR γ povećava transkripciju mRNK za Bcl-2. Pored ovoga, PPAR γ ima direktni efekat na glavne regulatore ekstraćelijskog matriksa, kao što je inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1). Ovaj član superfamilije inhibitora serin proteaza može da inhibira proteolizu ekstraćelijskog matriksa i da dovede do nagomilavanja matriksa. Agonisti PPAR γ mogu da inhibiraju transkripciju PAI-1 supresijom aktivnosti AP-1 i NF- κ B (Isshiki i sar., 2000; Mantovani i sar., 2001).

Obzirom na dokazanu lipidnu peroksidaciju kao jedan od mehanizama GM nefrotoksičnosti, u našem istraživanju pratili smo uticaj selena na koncentraciju MDA kao parametra lipidne peroksidacije u tkivu bubrega. Rezultati naše biohemijske analize parametara oksidativnog stresa u tkivu bubrega su pokazali da su vrednosti MDA značajno manje u grupi životinja tretiranih GM i Se u odnosu na životinje tretirane samo GM. Ovakav efekat Se može biti posledica njegove sposobnosti da prekine širenje lančane reakcije stvaranja slobodnih radikala u membranskim lipidima lizozoma i drugih organela. Naši rezultati su u skladu sa radom Ngaha i sar. (1984) u kome su autori pokazali stabilizirajuće dejstvo Se na membrane lizozoma. Zbog svog dokazanog antioksidativnog dejstva Se je korišćen u tretmanu različitih poremećaja koji u osnovi imaju oksidativni stres, kao što su dijabetes (Kahler i sar., 1993), toksičnost olova (Abdollahi i sar., 2001) i benzena (Stankovic

i sar., 2001). Pokazana svojstva Se u redukciji oksidativnog stresa i peroksidacije lipida uglavnom potiču od njegovog direktnog uticaja na aktivnost selenoenzima, kao što je GPx (Allan i sar., 1999). Berggren i sar. (1999) su dokazali da povećana aktivnost selenoenzima GPx i TRx nakon suplementacije Se može biti posledica povećane ugradnje selenocisteina koji je neophodan za njihovo dejstvo. Iako sam Se nema antioksidativno dejstvo, on tu funkciju in vivo ostvaruje kao integralni deo enzima GPx. Atomi selena su locirani na površini enzima u obliku selenocisteina i predstavljaju katalitički centar (Forstrom i sar., 1978). Drugim rečima, Se potpomaže aktivnost antioksidativnih enzima zavisnih od glutaciona. Glutacion peroksidaza je prvi otkriveni selenoenzim za koji je pokazano da može da spreči oksidativno oštećenje ćelijskih membrana. Glutacion peroksidaza sakuplja vodonik peroksid i lipidne perokside, koristeći redukujuće ekvivalente iz glutaciona i štiti membranske lipide i makromolekule od oksidativnog oštećenja (Watanabe i sar., 1997). Ovaj enzim ne samo da štiti ćelije od oštećenja izazvanih SKR već omogućava i regeneraciju membranskih lipida (McPherson i sar., 1994). Pored opisanih mehanizama, selen može da umanja štetno dejstvo oksidativnog stresa u bubregu i preko stimulacije PPAR γ . Ovo je zbog toga što selen ima ulogu u aktivaciji ovog nuklearnog receptora (Vunta i sar., 2007). Dokazano je da ligandi PPAR γ povećavaju ekspresiju gena za superoksid dismutazu (SOD), koja je jedan od važnih endogenih antioksidativnih enzima. U istoj studiji, aktivacija PPAR γ smanjila je aktivnost NADPH oksidaze koja predstavlja jedan od glavnih izvora SKR u stanjima oksidativnog stresa (Inoue i sar., 2001). Agonisti PPAR γ takođe mogu da povećaju aktivnost katalaze u stanjima oksidativnog stresa u bubregu i na taj način doprinose umanjenju nefrotoksičnosti (Bagi i sar., 2004).

Nasuprot pokazanom protektivnom efektu na povećanu peroksidaciju lipida i koncentraciju MDA u tkivu bubrega, suplementacija Se nije umanjila oksidativnu modifikaciju proteina u tkivu bubrega pacova tretiranih GM. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je koncentracija karbonilnih grupa proteina u bubregu životinja GSE grupe bila značajno veća od vrednosti kontrolne grupe, a slična rezultatima u grupi tretiranoj samo GM. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da zavisno od koncentracije, Se može da ispolji i korisne i štetne efekte na ćeliju, i da ima i oksidativno i antioksidativno dejstvo. Koncentracije Se koje sprečavaju simptome deficita i dovoljne su za povoljne efekte su vrlo bliske koncentracijama koje dovode do toksičnosti. Pored toga, bezbednost doziranja zavisi od mnogih faktora kao što su starost, hemijski oblik Se, transportni kapacitet, efikasnost biokonverzije iz neorganskih u organske forme, zatim dužina, učestalost i način aplikacije

(Lee i sar., 2012). Zbog svega navedenog, veoma je teško odrediti tačno adekvatnu dozu Se koja je bez štetnih posledica. Imajući ovakve podatke u vidu, verovatno da je u našem eksperimentu izabrana doza i dužina suplementacije Se bila prevelika, što je dovelo do ispoljavanja pro-oksidativnih efekata Se. Poznato je da je Se sposoban da negativno utiče na ćelijski redoks status putem direktne oksidacije tiola i indirektno stvarajući SKR. Selen može da reguluje sa esencijalnim tiol grupama proteina i cisteinskim ostacima u redukovanom glutationu (GSH) i da formira međumolekulske disulfidne veze, selentrisulfidne (S-Se-S) i selenenilsulfidne (S-Se) veze (Ganther i sar., 1999). Takođe različiti oblici Se u reakciji sa GSH mogu da stvore superoksidni radikal koji u daljim reakcijama stvara druge slobodne radikale (Shen i sar., 1999). Reakcijom Se sa GSH smanjuje se koncentracija ovog važnog molekula u ćeliji. Opisanim mehanizmima Se potencira oksidativni stres i može da ošteti većinu biomolekula, od kojih su posebno važni proteini.

7. ZAKLJUČCI

Rezultati naših ispitivanja omogućavaju da donesemo sledeće zaključke:

- Vrednosti ureje u krvi kod GM i GSAL grupe životinja su bile statistički značajno više u odnosu na iste kontrolne grupe životinja. Vrednosti ureje grupa GSE, GSAL i GSS su bile statistički značajno niže ($p < 0,001$) od istih GM grupe.
- Vrednosti kreatinina u krvi GM grupe pacova su statistički značajno veće od vrednosti kreatinina kontrolne grupe ($p < 0,001$) i grupa GSE, GSAL i GSS.
- Vrednosti kalijuma u krvi kod GM grupe su statistički značajno niže od istih kontrolne grupe ($p < 0,001$). Vrednosti kalijuma GSE, GSAL i GSS grupe su statistički značajno veće od istih GM grupe ($p < 0,001$).
- Vrednosti malondialdehida u tkivu bubrega GM grupe su bile statistički značajno veće od istih kontrolne grupe ($p < 0,05$). Vrednosti MDA grupa GSE, GSAL i GSS su bile statistički značajno niže od vrednosti MDA GM grupe ($p < 0,05$).
- Koncentracije karbonilnih grupa proteina u tkivu bubrega GM i GSE grupa su bile statistički značajno veće od istih kontrolne grupe ($p < 0,01$). Koncentracija karbonilnih grupa proteina GSAL grupe je bila statistički značajno niža u odnosu na isti parameter GM grupe ($p < 0,05$).
- Mikroskopske promene i oštećenja u tkivu bubrega bile su najizraženije kod GM grupe, dok je suplementacija selenom i salicilnom kiselinom značajno ublažila i gotovo neutralisala navedene promene kod GSE, GSAL i GSS grupa.
- Površina i perimeter glomerula GM grupe su statistički značajno veći od istih kontrolne grupe i grupa GSE, GSAL i GSS ($p < 0,05$).
- Cirkularnost glomerula kontrolne grupe je bila statistički značajno niža od iste vrednosti u GM grupi ($p < 0,05$). Vrednost cirkularnosti glomerula GSE, GSAL i GSS grupe je bila niža od iste GM grupe i približavala se vrednostima kontrolne grupe.
- Prosečne vrednosti Feretovog dijametra glomerula grupa GSE, GSAL i GSS su bile statistički značajno niže od istih GM grupe ($p < 0,05$) (i približavale su se vrednostima kontrolne grupe).
- Celularnost glomerula grupa GSE, GSAL i GSS je bila veća od istih kontrolne i GM grupe. Vrednosti celularnosti GSE, GSAL i GSS grupa su bliže vrednostima kontrolne nego GM grupe.

- Površine epitela proksimalnih tubula grupa GSE, GSAL i GSS su statistički značajno niže u odnosu na površinu epitela proksimalnih tubula GM grupe ($p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,01$).
- Površina jedara ćelija intersticijuma GSS i GSE grupe je bila statistički značajno niža u odnosu na istu GM grupe ($p < 0,05$ i $p < 0,01$).
- Cirkularnost jedara ćelija intersticijuma bubrega GM grupe je bila statistički značajno veća u odnosu na istu kontrolne grupe ($p < 0,01$), i statistički značajno manja u odnosu na cirkularnost jedara GSS grupe ($p < 0,05$).
- Integralna i medijanska optička gustina jedara ćelija intersticijuma GSE grupe je statistički značajno niža od istih parametara kontrolne grupe ($p < 0,05$).
- Naši rezultati ne ukazuju da istovremena primena selena i salicilne kiseline dodatno umanjuje gentamicinsku nefrotoksičnost.
- Sumarno možemo zaključiti da primena selena i salicilne kiseline kod pacova sa akutnom bubrežnom slabošću izazvanom gentamicinom deluje zaštitno i umanjuje stepen morfoloških i funkcionalnih promena.

8. LITERATURA

- Abd-El Latif HA, Ibrahim SS, El-Yamany MF, Ali MA, Abass MM. Amelioration of gentamicin-induced nephrotoxicity by vitamin B6 in wistar rats. *Egypt J Biochem Mol Biol* 2008;26:133–49.
- Abdel-Gayoum AA, Ali BH, Ghawarsha K, Bashir AA. Plasma lipid profile in rats with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 1993;12(5):371–5.
- Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Attia FF. Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 1999;40:183–7.
- Abdollahi M, Rahmat-Jirdeh N, Soltaninejad K. Protection by selenium of lead-acetate-induced alterations on rat submandibular gland function. *Hum Exp Toxicol* 2001;20(1):28–33.
- Abramson SB, Leszczynska-Piziak J, Clancy RM, Philips M, Weissmann G. Inhibition of neutrophil function by aspirin-like drugs (NSAIDS): requirement for assembly of heterotrimeric G proteins in bilayer phospholipid. *Biochem Pharmacol* 1994;47:563–72.
- Abramson SB, Weissmann G. The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum* 1989;32:1.
- Aceves M, Duenas A, Gomez C, San Vicente E, Crespo MS, Garcia-Rodriguez C. A new pharmacological effect of salicylates: inhibition of NFAT-dependent transcription. *J Immunol* 2004;173(9):5721–9.
- Aeberhard EE, Henderson SA, Arabolos NS, Griscavage JM, Castro FE, Barrett CT et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208:1053–9.
- Ali BH, Al Za'abi M, Blunden G, Nemmar A. Experimental Gentamicin Nephrotoxicity and Agents that Modify it: A Mini-Review of Recent Research. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;109(4):225–32.
- Ali BH. Agents ameliorating or augmenting experimental gentamicin nephrotoxicity: some recent research. *Food Chem Toxicol* 2003;41:1447–52.
- Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol* 1995; 26:1477–87.
- Allan CB, Lacourciere GM, Stadtman TC. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu Rev Nutr* 1999;19:1–16.
- Angstwurm MW , Shottdorf J , Schopohl J , Gaertner R. Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome. *Crit Care Med* 1999;27:1807–13.
- Apostolou S, Klein JO, Mitsuuchi Y, Shetler JN, Poulidakos PI, Jhanwar SC et al. Growth inhibition and induction of apoptosis in mesothelioma cells by selenium and dependence on selenoprotein SEP15 genotype. *Oncogene* 2004;23:5032–40.
- Appel GB. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Am J Med* 1990;88 Suppl 3C:16S–20.
- Arner ES. Selenoproteins—what unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res* 2010;316:1296– 303.
- Aroun A, Zhong JL, Tyrrell RM, Pourzand C. Iron, oxidative stress and the example of solar ultraviolet A radiation. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11(1):118–34.

- Aruoma OI, Halliwell B. The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica* 1988;18:459-70.
- Assael BM, Chiabrando C, Gagliardi L, Nosedà A, Bamonte F, Salmona M. Prostaglandins and aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;78:386-94.
- Assmann A, Briviba K, Sies H. Reduction of methionine selenoxide to selenomethionine by glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1998;349(1):201-3.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
- Bagi Z, Koller A, Kaley G. PPAR activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(2):H742-8.
- Basnakian AG, Kaushal GP, Shah SV. Apoptotic pathways of oxidative damage to renal tubular epithelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:915-24.
- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:493-506.
- Bayon Y, Alonso A, Sanchez Crespo M. 4-Trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal and its main metabolite 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid, are potent inhibitors of nuclear factor kappaB activation. *Br J Pharmacol* 1999;126:1359-66.
- Beauchamp D, Gourde P, Bergeron MG. Subcellular distribution of gentamicin in proximal tubular cells, determined by immunogold labeling. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2173-79.
- Beauchamp D, Laurent G, Maldague P, Abid S, Kishore BK, Tulkens PM. Protection against gentamicin-induced early renal alterations (phospholipidosis and increased DNA synthesis) by coadministration of poly-L-aspartic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:858-66.
- Behne D, Kyriakopoulos A. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr* 2001;21:453-73.
- Behne D, Pfeifer H, Rothlein D, Kyriakopoulos A. Cellular and subcellular distribution of selenium and selenium-containing proteins in the rat. In: Roussel AM, Favier AE, Anderson RA, editors. *Trace Elements in Man and Animals 10*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2000. p. 29-34.
- Bennett WM, Burdmann EA, Andoh TF, Houghton DC, Lindsley J, Elzinga LW. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:141-5.
- Bennett WM. Mechanisms of aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol* 1989;16(1):1-6.
- Berggren MM, Mangin JF, Gasdaka JR, Powis G. Effect of selenium on rat thioredoxin reductase activity: increase by supranutritional selenium and decrease by selenium deficiency. *Biochem Pharmacol* 1999;57(2):187-93.
- Berry MJ, Tujebajeva RM, Copeland PR, Xu XM, Carlson BA, Martin GW 3rd, et al. Selenocysteine incorporation directed from the 3'UTR: characterization of eukaryotic EFsec and mechanistic implications. *BioFactors* 2001;14:17-24.
- Bertolaso L, Bindini D, Previati M, Falgione D, Lanzoni I, Parmeggiani A, et al. Gentamicin-induced cytotoxicity involves protein kinase C activation, glutathione extrusion and malondialdehyde production in an immortalized cell line from the organ of corti. *Audiol Neurootol* 2003;8:38-48.

- Birringer M, Pilawa S, Flohé L. Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep* 2002;19(6):693-718.
- Blantz RC, Deng A, Miracle CM, Thomson SC. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007;118:23-43.
- Bledsoe G, Crickman S, Mao J, Xia CF, Murakami H, Chao L, et al. Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:624-33.
- Bohler T, Waiser J, Hepburn H, Gaedeke J, Lehmann C, Hambach P, et al. TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine* 2000;12:986-91.
- Bosl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (*Trsp*). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5531-4.
- Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, et al. Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 1998;273:5279-87.
- Brigelius-Flohe R, Flohe L. Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? *Biofactors* 2003;17:93-102.
- Brüne B. Nitric oxide and apoptosis in mesangial cells. *Kidney Int* 2002;61:786-9.
- Buchanan JH, Stevens A, Sidhu J. Aminoglycoside antibiotic treatment of human fibroblasts: intracellular accumulation, molecular changes and the loss of ribosomal accuracy. *Eur J Cell Biol* 1987;43:141-7.
- Buchanan TA, Meehan WP, Jeng YY, Yang D, Chan TM, Nadler JL, et al. Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vascular effect. *J Clin Invest* 1995;96(1):354-60.
- Burk RF, Levander OA. Selenio. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross A, editors. *Nutrición en Salud y Enfermedad*. 9th ed. vol I. Madrid: MacGraw-Hill Interamericana; 2002. p. 305-18.
- Cabañero AI, Madrid Y, Camara C. Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an in vitro digestion method. *Biol Trace Elem Res* 2007;119:195-211.
- Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Lahera V, Luño J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int* 2008;111 Suppl: S4-9.
- Calkin AC, Giunti S, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ, Cooper ME, Thomas MC. PPAR- α and - γ agonists attenuate diabetic kidney disease in the apolipoprotein E knockout mouse. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(9):2399-405.

- Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Landum RW, Cheng MS, Wu JF et al. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3633-6.
- Catania A, Arnold J, Macaluso A, Hiltz ME, Lipton JM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8544-7.
- Cheng F, Zhao CP, Amolins A, Galazka M, Doneski L. A hypothesis for the in vivo antioxidant action of salicylic acid. *Bio metals* 1996;9:285-90.
- Cheng M, Razzaque MS, Nazneen A, Taguchi T. Expression of the heat shock protein 47 in gentamicin-treated rat kidneys. *Int J Exp Pathol* 1998;79(3):125-32.
- Chiarugi A. 'Simple but not simpler': toward a unified picture of energy requirements in cell death. *FASEB J* 2005;19:1783-8.
- Choi KH, Kim TI, Chong DL, Lee HY, Han DS. Gentamicin induced apoptosis of renal tubular epithelial (LLC-PK1) cells. *Korean J Intern Med* 2000;15:218-23.
- Chung CK, Koo HN, Chung KY, Shin T, Kim HR, Chae HJ, et al. Inhibitory effect of sodium salicylate on nitric oxide production from TM4 sertoli cells. *Int J Immunopharmacol* 2000;22:685-92.
- Chwieralski CE, Welte T, Buhling F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* 2006;11:143-9.
- Cianferoni A, Schroeder JT, Kim J, Schmidt JW, Lichtenstein LM, Georas SN, et al. Selective inhibition of interleukin-4 gene expression in human T cells by aspirin. *Blood* 2001;97:1742-9.
- Cojocel C, Dociu N, Ceacmacudis E, Baumann K. Nephrotoxic effects of aminoglycoside treatment on renal protein reabsorption and accumulation. *Nephron* 1984a;37:113-9.
- Cojocel C, Docius N, Maita K, Smith JH, Hook JB. Renal ultrastructural and biochemical injuries induced by aminoglycosides. *Environ Health Perspect* 1984b;57:293-9.
- Colantoni A, de Maria N, Caraceni P, Bernardi M, Floyd RA, Van Thiel DH. Prevention of reoxygenation injury by sodium salicylate in isolated-perfused rat liver. *Free Radic Biol Med* 1998;25:87-94.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9(10):899-909.
- Comasseto JV. Selenium and tellurium chemistry: historical background. *J Braz Chem Soc* 2010;21:2027-31.
- Combs GF Jr, Gray WP. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* 1998;79:179-92.
- Combs GF Jr, Lu J. Selenium as a cancer preventive agent. In: Hatfield DL, editor. *Selenium*. Maine, Hingham: Kluwer Academic Publishers; 2001. p. 205-17.
- Craig WA, Vogelman B. The postantibiotic effect. *Ann Intern Med* 1987;106(6):900-2.
- Cronin RE, Thompson JR. Role of potassium in the pathogenesis of acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1991;17:100-5.

- Cronstein BN, Montesinos MC, Weissmann G. Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6377-81.
- Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG. Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 1993;87:963-71.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Britti D, et al. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2002;450:67-76.
- Cuzzocrea S, Thiernemann C, Salvemini D. Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. *Curr Med Chem* 2004;11(9):1147-62.
- Dangl J. Innate immunity. Plant just say NO to pathogens. *Nature* 1998;394:525-7.
- Dasu MR, Park S, Devaraj S, Jialal I. Pioglitazone inhibits toll-like receptor expression and activity in human monocytes and db/db mice. *Endocrinology* 2009;150:3457-64.
- De Broe ME, Paulus GJ, Verpooten RA, Roels F, Buysens N, Wedden R, et al. Early effects of gentamicin, tobramycin and amikacin on the human kidney. *Kidney Int* 1984;25:643-52.
- De-Barros-e-Silva ML, Varanda WA, Lachat JJ, Alves-da-Silva CG, Coimbra TM. Glomerular permeability to macromolecules in gentamicin-treated rats. *Braz J Med Biol Res* 1992;25:409-17.
- Deby-Dupont G, Deby C, Lamy M. Neutrophil myeloperoxidase revisited: Its role in health and disease. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 1999;36:500-13.
- Deglin JH, Vallerand AH. *Guide des médicaments*. Editions du Renouveau Pédagogiques Inc.; 1995.
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999;85(5):394-402.
- Dempsey DA, Klessing DF. Salicylic acid, active oxygen species and system acquired resistance in plants. *Trends Cell Biol* 1994;4:334-8.
- Deng A, Wead LM, Blantz RC. Temporal adaptation of tubuloglomerular feedback: effects of COX-2. *Kidney Int* 2004;66:2348-53.
- Derouet M, Thomas L, Moulding DA, Akgul C, Cross A, Moots RJ, et al. Sodium salicylate promotes neutrophil apoptosis by stimulating caspase-dependent turnover of Mcl-1. *J Immunol* 2006;176(2):957-65.
- Dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, Schor N. Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1991;40:742-7.
- Dragomir E, Manduteanu I, Voinea M, Costache G, Manea A, Simionescu M. Aspirin rectifies calcium homeostasis, decreases reactive oxygen species, and increases NO production in high glucose-exposed human endothelial cells. *J Diabetes Complications* 2004;18:289-99.
- Drake EN. Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. *Med Hypotheses* 2006;67:318-22.
- Du XH, Yang CL. Mechanism of gentamicin nephrotoxicity in rats and the protective effect of zinc-induced metallothionein synthesis. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:135-40.

- Duntas LH. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. *Horm Metab Res* 2009;41(6):443-7.
- Duque I, Garcia-Escribano C, Rodriguez-Puyol M, Díez-Marqués ML, López-Novoa JM, Arribas I, et al. Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 1992;263(3 Pt 2):F466-73.
- Dursun E, Dursun B, Suleymanlar G, Ozben T. Carbonyl stress in chronic renal failure: the effect of haemodialysis. *Ann Clin Biochem* 2005;42:64-6.
- Edwards JR, Diamantakos EA, Peuler JD, Lamar PC, Prozialeck WC. A novel method for the evaluation of proximal tubule epithelial cellular necrosis in the intact rat kidney using ethidium homodimer. *BMC Physiol* 2007;7:1.
- Edwards SW, Moulding DA, Derouet M, Moots RJ. Regulation of neutrophil apoptosis. *Chem Immunol Allergy* 2003;83:204-24.
- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper HS, Cumps J, Tulkens PM. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:665-75.
- El-Bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res* 2001;475:123-39.
- Farivar RS, Chobanian AV, Brecher P. Salicylate or aspirin inhibits the induction of the inducible nitric oxide synthase in rat cardiac fibroblasts. *Circ Res* 1996;78:759-68.
- Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R1-12.
- Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 1973;32:132-4.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83(5):803-12.
- Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 2010;459:923-39.
- Forstrom JW, Zakowski JJ, Tappel AL. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* 1978;17(13):2639-44.
- Foster JE, Harpur ES, Garland HO. An investigation of the acute effect of gentamicin on the renal handling of electrolytes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261:38-43.
- Francis GA, Annicotte JS, Auwerx J. PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:186-91.
- Fujiwara K, Shin M, Matsunaga H, Saita T, Larsson LI. Light-microscopic immunocytochemistry for gentamicin and its use for studying uptake of the drug in kidney. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3302-7.
- Ganther HE. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 1999;20:1657-66.
- García-Sánchez O, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM. An integrative view on the role of TGF- β in the progressive tubular deletion associated to chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010;77:950-5.

- Gasche C. Review Article: The chemoprevention of colorectal carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:31–5.
- Geleilate TJ, Melo GC, Costa RS, Volpini RA, Soares TJ, Coimbra TM. Role of myofibroblasts, macrophages, transforming growth factor-beta endothelin, angiotensin- II, and fibronectin in the progression of tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *J Nephrol* 2002;15:633–42.
- Gergawy M, Vollrath B, Cook D. The mechanism by which aminoglycoside antibiotics cause vasodilation of canine cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 1998;125:1150–7.
- Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33–45.
- Giuliano RA, Paulus GJ, Verpooten RA, Pattyn V, Ponet DE, Nouwen EJ, et al. Recovery of cortical phospholipidosis and necrosis after acute gentamicin loading in rats. *Kidney Int* 1986;26(6):838–47.
- Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, Motoshima H. Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1021–31.
- Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007;32:37–43.
- Gordge MP. How cytotoxic is nitric oxide? *Exp Nephrol* 1998;6:12–6.
- Goto T, Fujigaki Y, Sun DF, Yamamoto T, Hishida A. Plasma protein extravasation and vascular endothelial growth factor expression with endothelial nitric oxide synthase induction in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Virchows Arch* 2004;444:362–74.
- Goud C, Pitt B, Webb RC, Richey JM. Synergistic action of insulin and troglitazone on contractility in endothelium-denuded rat aortic rings. *Am J Physiol* 1998;275 (5 pt 1):E882–7.
- Graziano JH, Grady RW, Cerami A. The identification of 2,3- dihydroxybenzoic acid as a potentially useful iron-chelating drug. *J Pharmacol Exp Ther* 1974;190(3):570–5.
- Grootveld M, Halliwell B. Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl-radical formation in vivo. Identification of hydroxylated derivatives of salicylate in human body fluids. *Biochem J* 1986;237(2):499–504.
- Grosser N, Schroder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidant damage via the nitric oxide-cGMP pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1345–51.
- Gumieniczek A. Effect of the new thiazolidinedione-pioglitazone on the development of oxidative stress in liver and kidney of diabetic rabbits. *Life Sci* 2003;74:553–62.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: Packer L, Glazer AN, editors. *Methods in Enzymology*, Vol. 186. California: Academic Press; 1990. p. 1–5.
- Hermann M, Kapiotis S, Hofbauer R, Seelos C, Held I, Gmeiner B. Salicylate promotes myeloperoxidase-initiated LDL oxidation: antagonization by its metabolite gentisic acid. *Free Radic Biol Med* 1999;26(9–10):1253–60.
- Hines J, Vinos SA, Campochiaro PA. Evolution of morphologic changes after intravitreal injection of gentamicin. *Curr Eye Res* 1993;12:521–9.
- Hishida A, Nakajima T, Yamada M, Kato A, Honda N. Roles of hemodynamic and tubular factors in gentamicin-mediated nephropathy. *Ren Fail* 1994;16:109–16.

- Hori R, Okuda M, Ohishi Y, Yasuhara M, Takano M. Surface binding and intracellular uptake of gentamicin in the cultured kidney epithelial cell line (LLC-PK.). *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261(3): 1200-5.
- Horibe T, Matsui H, Tanaka M, Nagai H, Yamaguchi Y, Kato K, et al. Gentamicin binds to the lectin site of calreticulin and inhibits its chaperone activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:281-7.
- Houghton OC, Hartnett M, Campbell-Boswell M, Porter G, Bennett W. A light and electron microscopic analysis of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Pathol* 1976;82:589-612.
- Housby JN, Cahill CM, Chu B, Prevelige R, Bickford K, Stevenson MA, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit the expression of cytokines and induce HSP70 in human monocytes. *Cytokine* 1999;11:347-58.
- Hsu YH, Chen CH, Hou CC, Sue YM, Cheng CY, Cheng TH, et al. Prostacyclin protects renal tubular cells from gentamicin-induced apoptosis via a PPARalpha-dependent pathway. *Kidney Int* 2008;73(5):578-87.
- Hughes AK, Stricklett K, Padilla E, Kohan DE. Effect of reactive oxygen species on endothelin-1 production by human mesangial cells. *Kidney Int* 1996;49(1):181-9.
- Ibrahim S, Van der Auwera P, Meunier F, Tulkens PM. Effects of netilmicin and amikacin on urinary phospholipid excretion in humans. *Arch Toxicol Suppl* 1989;13:413-6.
- Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Wang L, Oyama C, Sato K, et al. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol* 2004;172:728-32.
- Iijima K, Yoshizumi M, Ako J, Eto M, Kim S, Hashimoto M, et al. Expression of peroxisome proliferator activated receptor γ in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247(2):353-6.
- Ikeda Y, Sugawara A, Taniyama Y, Uruno A, Igarashi K, Arima S, et al. Suppression of rat thromboxane synthase gene transcription by peroxisome proliferator activated receptor γ in macrophages via an interaction with NRF2. *J Biol Chem* 2000;275(42):33142-50.
- Imano E, Kanda T, Nakatani Y, Nishida T, Arai K, Motomura M, et al. Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1998;21(12):2135-9.
- Inoue T, Goto S, Matsunaga T, Nakajim T, Awata T, Hokari S, et al. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha and PPARgamma increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 2001;50(1):3-11.
- Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH. Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. *J Orthop Trauma* 2003;17:212-6.
- Ishikawa Y, Kitamura M. Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention of the JKN- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int* 2000;58:1078-87.
- Isshiki K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, Kikkawa R. Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes* 2000;49(6):1022-32.
- Izzedine H, Launay-Vacher V, Buhaescu I, Heurtier A, Baumelou A, Deray G. PPAR-gamma-agonists' renal effects. *Minerva Urol Nefrol* 2005;57:247-60.

- Jaattela M, Wissing D, Bauer PA, Li GC. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J* 1992;11:3507-12.
- Jacoby GA, Gorini L. The effect of streptomycin and other aminoglycoside antibiotics on protein synthesis. In: *Antibiotics I. mechanism of action*. Gottlieb D, Shaw P, editors. New York: Springer-Verlag; 1967. p. 726-47.
- Jay D, Jay EG, Medina MA. Superoxide dismutase activity of the salicylate-iron complex. *Arch Med Res* 1999;30(2):93-6.
- Jeong DW, Yoo MH, Kim TS, Kim JH, Kim IY. Protection of mice from allergen-induced asthma by selenite: prevention of eosinophil infiltration by inhibition of NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002;277:17871-6.
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;283(2-3):65-87.
- Juan SH, Chen CH, Hsu YH, Hou CC, Chen TH, Lin H, et al. Tetramethylpyrazine protects rat renal tubular cell apoptosis induced by gentamicin. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:732-9.
- Jurivich DA, Pachetti C, Qiu L, Welk JF. Salicylate triggers heat shock factor differently than heat. *J Biol Chem* 1995;270:24489-95.
- Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI. Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* 1992;255:1243-5.
- Kadkhodae M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M. Effects of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol* 2005;90:571-6.
- Kahler W, Kuklinski B, Ruhlmann C, Plotz C. Diabetes mellitus-a free radical-associated disease. Results of adjuvant antioxidant supplementation. *Z Gesamte Inn Med* 1993;48(5):223-32.
- Kahlmeter G, Dahlager JJ. Aminoglycoside toxicity - a review of clinical studies published between 1975 and 1982. *J Antimicrob Chemother* 1984;13 Suppl A:9-22.
- Kalayarasan S, Prabhu PN, Sriram N, Manikandan R, Arumugam M, Sudhandiran G. Diallyl sulfide enhances antioxidants and inhibits inflammation through the activation of Nrf2 against gentamicin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 2009;606:162-71.
- Kaloyanides GJ. Drug-phospholipid interactions: role in aminoglycoside nephrotoxicity. *Ren Fail* 1992;14:351-7.
- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.
- Kappus H, Sies H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* 1981;37(12):1233-41.
- Karasawa T, Wang Q, Fu Y, Cohen DM, Steyger PS. TRPV4 enhances the cellular uptake of aminoglycoside antibiotics. *J Cell Sci* 2008;121:2871-9.
- Karatas Y, Secxilmisx MA, Karayaylali I, Doran F, Buyukafsxar K, Singirik E, et al. Effect of tempol (4-hydroxy tempo) on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18:79-83.
- Karkar A. Modulation of renal inflammation: therapeutic strategies. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008;19: 1-19.

- Kaur H, Halliwell B. Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation. *Methods Enzymol* 1994;233:67–82.
- Kepka-Lenhart D, Chen LC, Morris SM. Novel actions of aspirin and sodium salicylate: discordant effects on nitric oxide synthesis and induction of nitric oxide synthase mRNA in a murine macrophage cell line. *J Leukoc Biol* 1996;59:840-6.
- Khan S, Cleveland RP, Koch CJ, Schelling JR. Hypoxia induces renal tubular epithelial cell apoptosis in chronic renal disease. *Lab Invest* 1999;79:1089–99.
- Kibriya MG, Jasmine F, Argos M, Verret WJ, Rakibuz-Zaman M, Ahmed A, et al. Changes in gene expression profiles in response to selenium supplementation among individuals with arsenic-induced pre-malignant skin lesions. *Toxicol Lett* 2007;169:162–76.
- Kim YS, Jhon DY, Lee DY. Involvement of ROS and JNK1 in selenite-induced apoptosis in Chang liver cells. *Exp Mol Med* 2004;36:157–64.
- Kishore BK, Kallay Z, Lambricht P, Laurent G, Tulkens PM. Mechanism of protection afforded by polyaspartic acid against gentamicin-induced phospholipidosis. I. Polyaspartic acid binds and displaces gentamicin from negatively-charged phospholipid layers. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;255:867-74.
- Klotman PE, Yarger WE. Reduction of renal blood flow and proximal bicarbonate reabsorption in rats by gentamicin. *Kidney Int* 1983;24:638–43.
- Kohn S, Fradis M, Ben-David J, Zidan J, Robinson E. Nephrotoxicity of combined treatment with cisplatin and gentamicin in the guinea pig: glomerular injury findings. *Ultrastruct Pathol* 2002;26:371–82.
- Komlosi P, Bell PD, Zhang ZR. Tubuloglomerular feedback mechanisms in nephron segments beyond the macula densa. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:57–62.
- Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994;265:956–9.
- Korsmeyer SJ, Yin X-M, Oltvai Z, Veis-Novack DJ, Linette GP. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the bcl2-gene family. *Biochem Biophys Acta* 1995;1271:63–6.
- Kotrly S, Sucha L. *Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry*. Chichester: Ellis Horwood Limited; 1985. p. 163.
- Kourilsky VO, Salez K, Morel-Maroger L, Whelton A, Dubour P, Sraer ID. The pathology of acute renal failure due to intestinal nephritis in man with comments on the role of intestinal inflammation and sex in gentamicin nephrotoxicity. *Medicine (Baltimore)*. 1982;61:258-62.
- Kretz-Remy C, Mehlen P, Mirault ME, Arrigo AP. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J Cell Biol* 1996;133:1083–93.
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003;300:1439–43.
- Laurent G, Bellamkonda K, Tulkens K, Tulkens PM. Aminoglycosides-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1990;40(11):2383-92.
- Laurent G, Carlier MB, Rollman B, Van Hoof F, Tulkens P. Mechanism aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem Pharmacol* 1982;31:3861–70.

- Le DT, Liang X, Fomenko DE, Raza AS, Chong CK, Carlson BA, et al. Analysis of methionine/selenomethionine oxidation and methionine sulfoxide reductase function using methionine-rich proteins and antibodies against their oxidized forms. *Biochemistry* 2008;47:6685–94.
- Lee KH, Jeong D. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: the selenium paradox (Review). *Mol Med Report*. 2012;5(2):299-304.
- Lee SR, Bar-Noy S, Kwon J, Levine RL, Stadtman TC, Rhee SG. Mammalian thioredoxin reductase: oxidation of the Cterminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2521–6.
- Leung JC, Marphis T, Craver RD, Silverstein DM. Altered NMDA receptor expression in renal toxicity: protection with a receptor antagonist. *Kidney Int* 2004;66:167–76.
- Levi M, Cronin RE. Early selective effects of gentamicin on renal brushborder membrane Na-Pi cotransport and Na-H exchange. *Am J Physiol* 1990;258:F1379–87.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1994;233:346–57.
- Li G, Sha SH, Zotova E, Arezzo J, Van de Water T, Schacht J. Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. *Lab Invest* 2002;82(5):585-96.
- Li GC, Li L, Liu RY, Rehman, M, Lee WM. Heat shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2036-40.
- Li J, Li QX, Xie XF, Ao Y, Tie CR, Song RJ. Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin induced renal tubular toxicity in rats. *Eur J Pharmacol* 2009;620:97–104.
- Li N, M. Karin. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 1999;13(10):1137–43.
- Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 1996;271:F477–88.
- Lin L, Grenier L, Bergeron Y, Simard M, Bergeron MG, Labrecque G, et al. Temporal changes of pharmacokinetics, nephrotoxicity, and subcellular distribution of tobramycin in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:54-60.
- Lis J, Wu C. Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell* 1993;74:1-4.
- Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 2011;79(1):33-45.
- Lopez-Novoa JM. Potential role of platelet activating factor in acute renal failure. *Kidney Int* 1999;55:1672–82.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- Madeja Z, Sroka J, Nystrom C, Bjorkhem-Bergman L, Nordman T, Damdimopoulos A, et al. The role of thioredoxin reductase activity in selenium-induced cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1765–72.

- Maehira F, Luyo GA, Miyagi I, Oshiro M, Yamaneb N, Kuba M, et al. Alterations of serum selenium concentrations in the acute phase of pathological conditions. *Clin Chim Acta* 2002;316:137–46.
- Maita K, Cojocel C, Docu N, Sleight SD, Hook JB. Effects of aminoglycosides on glomerular ultrastructure. *Pharmacology* 1984;29:292–300.
- Maldonado PD, Barrera D, Rivero I, Mata R, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, et al. Antioxidant S-allylcysteine prevents gentamicin-induced oxidative stress and renal damage. *Free Radic Biol Med* 2003;35:317–24.
- Malseed RT, Goldstein FJ, Balkon N. *Pharmacology: Drug therapy and nursing considerations*. 4th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1995.
- Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol* 2001;22(6):328–36.
- Markewitz BA, Michael JR, Kohan DE. Cytokine-induced expression of a nitric oxide synthase in rat renal tubule cells. *J Clin Invest* 1993;91:2138–43.
- Martin J, Horwich AL, Hartl FU. Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperonin Hsp60. *Science* 1992;258:995–8.
- Martinez-Salgado C, Eleno N, Morales AI, Pérez-Barriocanal F, Arévalo M, López-Novoa JM. Gentamicin treatment induces simultaneous mesangial proliferation and apoptosis in rats. *Kidney Int* 2004;65:2161–71.
- Martinez-Salgado C, Eleno N, Tavares P, Rodríguez-Barbero A, García-Criado J, Bolaños JP, et al. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. *Kidney Int* 2002;62:1682–92.
- Martinez-Salgado C, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;223:86–98.
- Martinez-Salgado C, Rodríguez-Barbero A, Eleno N, López-Novoa JM. Gentamicin induces Jun-AP1 expression and JNK activation in renal glomeruli and cultured mesangial cells. *Life Sci* 2005;77:2285–98.
- Martinez-Salgado C, Rodríguez-Barbero A, Rodríguez-Puyol D, Pérez de Lema G, López-Novoa JM. Involvement of phospholipase A2 in gentamicin-induced rat mesangial cell activation. *Am J Physiol* 1997;273:F60–6.
- Martinez-Salgado C, Rodriguez-Barbero A, Tavares P, Eleno N, Lopez- Novoa JM. Role of calcium in gentamicin-induced mesangial cell activation. *Cell Physiol Biochem* 2000;1:65–72.
- Mather M, Rottenberg H. Polycations induce the release of soluble intermembrane mitochondrial proteins. *Biochim Biophys Acta* 2001;1503:357–68.
- Matthew TH. Drug-induced renal disease. *Med J Australia* 1992;156:724–8.
- McEver RP, Cummings RD. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:485–91.
- McPherson A. Selenium vitamin E and biological oxidation. In: Cole DJ, Garnsworthy PJ, editors. *Recent advances in animal nutrition*. Oxford: Butterworth and Heinemann's; 1994. p. 3–30.

- Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, et al. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J* 1989;263:539–45.
- Mestril R, Chi SH, Sayen MR, O'Reilly K, Dillmann WH. Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury. *J Clin Invest* 1994;93:759-67.
- Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-κB and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant responsive factor. *EMBO J* 1993;12:2005–15.
- Mingeot-Leclercq MP, Bresseur R, Schanck A. Molecular parameters involved in aminoglycoside nephrotoxicity. *J Toxicol Environ Health* 1995;44:263–300.
- Monteil C, Leclere C, Fillastre JP, Morin JP. Characterization of gentamicin-induced dysfunctions in vitro: the use of optimized primary cultures of rabbit proximal tubule cells. *Ren Fail* 1993;15:475–83.
- Montero A, Rodríguez-López AM, Carretero J, González-Sarmiento R, Rodríguez-Barbero A, López-Novoa JM. Effect of verapamil on endothelin-1-induced proliferation in cultured rat mesangial cells. *Cell Physiol Biochem* 1995;5:155–66.
- Morales AI, Buitrago JM, Santiago JM, Fernández-Tagarro M, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. Protective effect of trans-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:893–98.
- Morales AI, Demaille D, Prieto M, Puente A, Briones E, Arévalo M, et al. Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. *Kidney Int* 2010;77:861–9.
- Morales AI, Rodríguez-Barbero A, Vicente-Sánchez C, Mayoral P, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. Resveratrol inhibits gentamicin-induced mesangial cell contraction. *Life Sci* 2005;78:2373–7.
- Moreno-Manzano V, Ishikawa Y, Lucio-Cazana J, Kitamura M. Selective involvement of superoxide anion, but not downstream compounds hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of rat mesangial cells. *J Biol Chem* 2000;275:12684–91.
- Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1471-83.
- Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993;259:1409-10.
- Morin I, Li WQ, Su S, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of stromelysin gene expression by tumor necrosis factor alpha is inhibited by dexamethasone, salicylate, and N-acetylcysteine in synovial fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(3):1634-40.
- Mousa SA, O'Connor L, Rossman TG, Block E. Pro-angiogenesis action of arsenic and its reversal by selenium-derived compounds. *Carcinogenesis* 2007;28:962–7.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. *Harper's Biochemistry*. Twenty-first Edition. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange; 1988.
- Myrdal SE, Johnson KC, Steyger PS. Cytoplasmic and intranuclear binding of gentamicin does not require endocytosis. *Hear Res* 2005;204:156–69.

- Nagai J, Katsube T, Murakami T, Takano M. Effect of gentamicin on pharmacokinetics of lysozyme in rats: interaction between megalin substrates in the kidney. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:1491–6.
- Nagai J, Saito M, Adachi Y, Yumoto R, Takano M. Inhibition of gentamicin binding to rat renal brush-border membrane by megalin ligands and basic peptides. *J Control Release* 2006;112:43–50.
- Nagai J, Takano M. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab Pharmacokineti* 2004;19:159-70.
- Nakajima T, Hishida A, Kato A. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* 1994;266(3 Pt 2):F425-31.
- Navarro-Alarcon M, Gil Hernández F, Gil Hernandez A. Selenio, manganeso, cromo, molibdeno, yodido y otros oligoelementos minoritarios. In: Gil Hernández A, editor. *Tratado de Nutrición Tomo I: Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. Madrid: Acción Medica; 2005. p. 997–1036.
- Neugarten J, Aynedjian HS, Bank N. Role of tubular obstruction in acute renal failure due to gentamicin. *Kidney Int* 1983;24:330–5.
- Ngaha EO, Ogunleye IO, Madusolumuo MA. Protection by selenium against gentamicin-induced acute renal damage in the rat. *J Biochem* 1984;95:831-7.
- Ngaha EO, Ogunleye IO. Studies on gentamicin-induced labilization of rat kidney lysosomes in vitro. Possible protection by selenium. *Biochem Pharmacol* 1983;32:2659–64.
- Nishio E, Watanabe Y. Aspirin and salicylate enhances the induction of inducible nitric oxide synthase in cultured rat smooth muscle cells. *Life Sci* 1998;63:429-39.
- Nonclercq D, Wrona S, Toubreau G, Zanen J, Heuson-Stiennon JA, Schaudies RP, et al. Tubular injury and regeneration in the rat kidney following acute exposure to gentamicin: a time-course study. *Ren Fail* 1992;14:507–21.
- Nosjean O, Boutin JA. Natural ligands of PPAR γ : are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cell Signal* 2002;14(7):573-83.
- Ogihara T, Rakugi H, Ikegami H, Mikami H, Masuo K. Enhancement of insulin sensitivity by troglitazone lowers blood pressure in diabetic hypertensives. *Am J Hypertens* 1995;8:316–20.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- Ohki S, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O. Prostaglandin hydroperoxidase, an integral part of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 1979;254: 829-36.
- Okada T, Wada J, Hida K, Eguchi J, Hashimoto I, Baba M, et al. Thiazolidinediones ameliorate diabetic nephropathy via cell cycle-dependent mechanisms. *Diabetes* 2006;55(6):1666–77.
- Oldfield JE. The two faces of selenium. *J Nutr* 1987;117:2002–8.
- Oliver CN. Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 1987;253:62-72.

- Orozco-Ibarra M, Medina-Campos ON, Sanchez-Gonzalez DJ, Martinez-Martinez CM, Floriano-Sanchez E, Santamaria A, et al. Evaluation of oxidative stress in D-serine induced nephrotoxicity. *Toxicology* 2007;229:123–35.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007;12:913–22.
- Padmaja S, Squadrito GL, Lemercier JN, Cueto R, Pryor WA. Rapid oxidation of DL-selenomethionine by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 1996;21:317–22.
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NFkappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853–66.
- Papanikolaou N, Peros G, Morphake P, Gkikas G, Maraghianne D, Tsipas G, et al. Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats? Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1992;45:131–6.
- Park JW, Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Choi C, Lee J, et al. Renoprotective effects of paricalcitol on gentamicin-induced kidney injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;298:F301–13.
- Parsons PP, Garland HO, Harpur ES, Old S. Acute gentamicin-induced hypercalciuria and hypermagnesiuria in the rat: dose-response relationship and role of renal tubular injury. *Br J Pharmacol* 1997;122:570–6.
- Pattyn VM, Verpooten GA, Giuliano RA, Zheng F, De Broe ME. Effect of hyperfiltration, proteinuria and diabetes mellitus on the uptake kinetics of gentamicin in the kidney cortex of rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:694–8.
- Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MA, Hernández-Pando R, et al. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 2000;29:602–11.
- Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macías-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, et al. S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. *BMC Clin Pharmacol* 2004;4:5.
- Perazella MA. Drug-induced renal failure: update on new medications and unique mechanisms of nephrotoxicity. *Am J Med Sci* 2003;325:349–62.
- Persson PB. Physiological regulation of renal blood flow and glomerular filtration rate by the endothelium and smooth muscle. *Blood Purif* 1997;15:219–27.
- Pessoa EA, Convento MB, Silva RG, Oliveira AS, Borges FT, Schor N. Gentamicin-induced preconditioning of proximal tubular LLC-PK1 cells stimulates nitric oxide production but not the synthesis of heat shock protein. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:614–20.
- Peyrou M, Hanna PE, Cribb AE. Cisplatin, gentamicin, and paminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. *Toxicol Sci* 2007;99:346–53.
- Pfeilschifter J, Huwiler A. Phospholipase A2 in mesangial cells: control mechanisms and functional importance. *Exp Nephrol* 1997;5:189–93.
- Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T. Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* 1996;156(10):3961–9.

- Pillinger MH, Capodici C, Rosenthal P, Kheterpal N, Hanft S, Philips MR, et al. Modes of action of aspirin-like drugs: salicylates inhibit erk activation and integrin-dependent neutrophil adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(24):14540-5.
- Polte T, Oberle S, Schröder H. Nitric oxide protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity: possible involvement of cyclic GMP. *FEBS Lett* 1997;409:46-8.
- Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin. *Toxicol Sci* 2011;119(2):245-56.
- Ramauge M, Pallud S, Esfandiari A, Gavaret JM, Lennon AM, Pierre M, et al. Evidence that type III iodothyronine deiodinase in rat astrocyte is a selenoprotein. *Endocrinology* 1996;137:3021-5.
- Ramsammy LS, Josepovitz C, Kaloyanides GJ. Gentamicin inhibits agonist stimulation of the phosphatidylinositol cascade in primary cultures of rabbit proximal tubular cells and in rat renal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;247:989-96.
- Ramsammy LS, Josepovitz C, Lane B, Kaloyanides GJ. Effect of gentamicin on phospholipid metabolism in cultured rabbit proximal tubular cells. *Am J Physiol* 1989;256:C204-13.
- Randal S E, Edson MD, Christine L, Terrell MD. The aminoglycosides: streptomycin, kanamycin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin, and sisomicin. *Mayo Clin Proc* 1987;62:916-20.
- Rayman MP. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc* 2005;64:527-42.
- Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000;356:233-41.
- Regec AL, Trump BF, Trifillis AL. Effect of gentamicin on the lysosomal system of cultured human proximal tubular cells. Endocytotic activity, lysosomal pH and membrane fragility. *Biochem Pharmacol* 1989;38:2527-34.
- Reilly CM, Oates JC, Sudian J, Crosby MB, Halushka PV, Gilkeson GS. Prostaglandin J(2) inhibition of mesangial cell iNOS expression. *Clin Immunol* 2001;98(3):337-45.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 2000;7(6):444-58.
- Ren L, Liu N, Zhi H, Li Y, Li Y, Tang R, et al. Vasculoprotective effects of rosiglitazone through modulating renin-angiotensin system in vivo and vitro. *Cardiovasc Diabetol* 2011;26;10(1):10.
- Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:926-35.
- Rivas-Cabanero L, Garcia-Bastos JL, Arevalo M, Rodríguez-Barbero A, López-Novoa JM. Effect of gentamicin treatment on glutamine and lactate metabolism by the renal cortex of the rat. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 1993;101:193-6.
- Rivas-Cabañero L, Montero A, López-Novoa JM. Increased glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin-induced renal failure. *Eur J Pharmacol* 1994;270:119-21.
- Rivas-Cabanero L, Rodriguez-Lopez AM, Martinez-Salgado C, Saura M, Lamas S, López-Novoa JM. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Exp Nephrol* 1997;5:23-30.

- Rodríguez-Barbero A, Bosque E, Rivas-Cabanero L, Arévalo M, López-Novoa JM. Effect of platelet activating factor antagonist treatment on gentamicin nephrotoxicity. *Mediators Inflamm* 1992;1:23–6.
- Rodríguez-Barbero A, L'Azou B, Cambar J, Lopez-Novoa JM. Potential use of isolated glomeruli and cultured mesangial cells as in vitro models to assess nephrotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 2000;16:145–53.
- Rodríguez-Barbero A, Lopez-Novoa JM, Arevalo M. Involvement of platelet-activating factor in gentamicin nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol* 1997;5:47–54.
- Rodríguez-Barbero A, Rodríguez-Lopez AM, Gonzalez-Sarmiento R, López-Novoa JM. Gentamicin activates rat mesangial cells. A role for platelet activating factor. *Kidney Int* 1995;47:1346–53.
- Rodríguez-López AM, Martínez-Salgado C, Eleno N, Arévalo M, López-Novoa JM. Nitric oxide is involved in apoptosis induced by thapsigargin in rat mesangial cells. *Cell Physiol Biochem* 1999;9:285–96.
- Romero F, Pérez M, Chávez M, Parra G, Durante P. Effect of uric acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats - role of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009;105(6):416-24.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179:588–90.
- Roy M, Kiremidjian-Schumacher L, Wishe HI, Cohen MW, Stotzky G. Supplementation with selenium restores age-related decline in immune cell function. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;209:369–75.
- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007;9(1):49-89.
- Ryu YS, Lee JH, Seok JH, Hong JH, Lee YS, Lim JH, et al. Acetaminophen inhibits iNOS gene expression in RAW 264.7 macrophages: differential regulation of NF-kappaB by acetaminophen and salicylates. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:758-64.
- Sagone AL Jr, Husney RM. Oxidation of salicylates by stimulated granulocytes: evidence that these drugs act as free radical scavengers in biological systems. *J Immunol* 1987;138:2177-83.
- Sakitani K, Kitade H, Inoue K, Kamiyama Y, Nishizawa M, Okumura T, et al. The anti-inflammatory drug sodium salicylate inhibits nitric oxide formation induced by interleukin-1beta at a translational step, but not at a transcriptional step, in hepatocytes. *Hepatology* 1997;25:416-20.
- Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J* 1992;11:2357-64.
- Sandau KB, Brune B. Up-regulation of Bcl-2 by redox signals in glomerular mesangial cells. *Cell Death Differ* 2000;7:118–25.
- Sanmuganathan PS, Ghahramani P, Jackson PR, Wallis EJ, Ramsay LE. Aspirin for primary prevention of coronary heart disease: safety and absolute benefit related to coronary risk derived from meta-analysis of randomised trials. *Heart* 2001;85:265–71.

- Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:2409–27.
- Sasaki M, Jordan P, Welbourne T, Minagar A, Joh T, Itoh M, et al. Troglitazone, a PPAR- γ activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF- α . *BMC Physiol* 2005;5(1):3
- Sassen MC, Kim SW, Kwon TH, Knepper MA, Miller RT, Frøkiaer J, et al. Dysregulation of renal sodium transporters in gentamicin-treated rats. *Kidney Int* 2006;70:1026–37.
- Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Hashimoto N, Togo M, Hara M, et al. Thiazolidinediones suppress endothelin-I secretion from bovine endothelial cells: a new possible role for PPARgamma on vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254(3):757–63.
- Schindler PE Jr, Fields WS. *Aspirin Therapy*. New York: Walker and Company; 1978.
- Schmitz C, Hilpert J, Jacobsen C, Boensch C, Christensen EI, Luft FC, et al. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *J Biol Chem* 2002;277:618–22.
- Schnellmann RG, Williams SW. Proteases in renal cell death: calpains mediate cell death produced by diverse toxicants. *Ren Fail* 1998;20:679–86.
- Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int* 1981;19:288–96.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247–58.
- Schwarz K, Foltz CM. Selenium as integral part of factor 3 against dietary liver degeneration. *J Am Chem Soc* 1957;79:3292–3.
- Seçilmiş MA, Karataş Y, Yorulmaz O, Buyukafşar K, Singirik E, Doran F, et al. Protective effect of L-arginine intake on the impaired renal vascular responses in the gentamicin-treated rats. *Nephron Physiol* 2005;100:13–20.
- Servais H, Jossin Y, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1213–21.
- Servais H, Ortiz A, Devuyst O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis* 2008;13:11–32.
- Servais H, Van der Smissen P, Thirion G, Van der Essena G, Van Bambeke F, Tulkensa PM, et al. Gentamicin induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;206:321–33.
- Shen HM, Yang CF, Ong CN: Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Int J Cancer* 1999;81:820-8.
- Shi X, Ding M, Dong Z, Chen F, Ye J, Wang S, et al. Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF- κ B activation, and TNF- α production. *Mol Cell Biochem* 1999;199(1-2):93-102.

- Sholkoff SD, Eyring EJ, Rowland M, Riegelman S. Plasma and synovial fluid concentrations of acetylsalicylic acid in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1967;10(4):348-51.
- Shultz PJ, Raij L. Inhibition of human mesangial cell proliferation by calcium channel blockers. *Hypertension* 1990;15 Suppl 2:176-80.
- Sies H, Jones D. Oxidative stress. In: Fink G, editor. *Encyclopedia of Stress*, vol. 3. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 45-8.
- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl* 1986;25(12):1058-71.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993;215(2):213-9.
- Silverblatt F. Pathogenesis of nephrotoxicity of cephalosporins and aminoglycosides: a review of current concepts. *Rev Infect Dis* 1982;4 Suppl:S360-5.
- Silverblatt FJ, Kuehn C. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* 1979;15:335-45.
- Simmons Jr CF, Bogusky RT, Humes HD. Inhibitory effects of gentamicin on renal mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;214:709-15.
- Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Davies KJ, Grune T. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II-aging of nondividing cells. *FASEB J* 2000;14:2503-10.
- Skopicki HA, Zikos D, Sukowski EJ, Fisher KA, Peterson DR. Gentamicin inhibits carrier-mediated dipeptide transport in kidney. *Am J Physiol* 1996;270:F531-8.
- Soncin F, Calderwood SK. Reciprocal effects of pro-inflammatory stimuli and anti-inflammatory drugs on the activity of heat shock factor-1 in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:479-84.
- Sorribas V, Halaihel N, Puttaparthi K, Rogers T, Cronin RE, Alcalde AI, et al. Gentamicin causes endocytosis of Na/Pi cotransporter protein (NaPi-2). *Kidney Int* 2001;59:1024-36.
- Spector A. Review: Oxidative stress and disease. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000;16(2):193-201.
- Speer CP, Gahr M. The monocyte-macrophage system in the human. *Monatsschr Kinderheilkd* 1989;137(7):390-5.
- Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827-72.
- Stadtman ER. Oxidation of proteins by mixed function oxidation system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem Sci* 1986;11:11-2.
- Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 2005;54:2460-70.
- Stankovic Z, Mihailovic D, Randjelovic P, Zivanov-Curlis J. Selenium effect upon the rats hematopoiesis in the subacute benzene intoxication. *Acta Medica Medianae* 2001;2:15-25.
- Stanley P, Hegedus R. Aspirin – the first hundred years. *Biologist* 2000;47:269-71.
- Steinbach JP, Wolburg H, Klumpp A, Weller M. Hypoxia sensitizes human malignant glioma cells towards CD95L-induced cell death. *J Neurochem* 2005;92:1340-9.

- Steinmann D, Nauser T, Beld J, Tanner M, Günther D, Bounds PL, et al. Kinetics of tyrosyl radical reduction by selenocysteine. *Biochemistry* 2008;47:9602–7.
- Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic Biol Med* 1999;26:42–8.
- Stojiljković N. Renoprotektivni efekti pentoksifilina, verapamila i vitamin c na akutnu bubrežnu insuficijenciju pacova izazvanu gentamicinom [disertacija]. Niš: Medicinski fakultet; 2006.
- Stojiljkovic N, Mihailovic D, Veljkovic S, Stoilkovic M, Jovanovic I. Glomerular basement membrane alterations induced by gentamicin administration in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2008;60:69–75.
- Stojiljkovic N, Stoilkovic M, Mihailovic D, Randjelovic P, Ilic S, Gocmanac-Ignjatovic M, Veljkovic M. Beneficial effects of calcium oral coadministration in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail.* 2012a;34(5):622-7.
- Stojiljkovic N, Stoilkovic M, Randjelovic P, Veljkovic S, Mihailovic D. Cytoprotective effect of vitamin C against gentamicin-induced acute kidney injury in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2012b;64(1-2):69-74.
- Stojiljković N, Veljković S, Mihailović D, Stoilković M, Radovanović D, Ranđelović P. The effect of calcium channel blocker verapamil on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Bosn J Basic Med Sci* 2008;8(2):170-6.
- Stratta P, Segoloni GP, Canavese C, Muzio G, Dogliani M, Serra A, et al. Oxygen free radicals are not the main factor in experimental gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail* 1994;16:445–55.
- Sue YM, Cheng CF, Chang CC, Chou Y, Chen CH, Juan SH. Antioxidation and anti-inflammation by haem oxygenase-1 contribute to protection by tetramethylpyrazine against gentamicin-induced apoptosis in murine renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:769–77.
- Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, et al. Transcriptional suppression of type-1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator activated receptor gamma in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2001;142(7):3125-34.
- Sunde RA. Selenium. In: Stipanuk MH, editor. *Biochemical and physiological aspects of human nutrition*. New York: W.B. Saunders Company; 2000. p. 782–809.
- Tajiri K, Miyakawa H, Marumo F, Sato C. Increased renal susceptibility to gentamicin in rat with obstructive jaundice. Role of lipid peroxidation. *Dig Dis Sci* 1995;40:1060–4.
- Tamura T, Stadtman TC. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1006–11.
- Tanaka N. Aminoglycosides antibiotics. In: Corcoran JW, Hahn FE, editors. *Antibiotics III, Mechanisms of action of antimicrobial and antitumor agents*. New York: Springer-Verlag; 1975. p. J40-364.
- Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J* 2001;15(12):2057-72.

- Tekos A, Prodromaki E, Papadimou E, Pavlidou D, Tsambaos D, Drainas D. Aminoglycosides suppress tRNA processing in human epidermal keratinocytes in vitro. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003;16:252–8.
- Teng J, Russell WJ, Gu X, Cardelli J, Jones ML, Herrera GA. Different types of glomerulopathic light chains interact with mesangial cells using a common receptor but exhibit different intracellular trafficking patterns. *Lab Invest* 2004;84:440–51.
- Tey BT, Singh RP, Piredda L, Piacentini M, Al-Rubeai M. Influence of Bcl-2 on cell death during cultivation of a Chinese hamster ovary cell line expressing a chimeric antibody. *Biotechnol Bioeng* 2000;68:31–43.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1005–28.
- Thomas GL, Yang B, Wagner BE, Savill J, El Nahas AM. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2216–26.
- Thorne R. Selenium. *Altern Med Rev* 2003;8:63–71.
- Tilkian SM, Conover MD, Tilkian AG. Clinical and nursing implications of laboratory tests. 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1995. p. 661.
- Todd JH, Sens DA, Hazen-Martin DJ, Bylander JE, Smyth BJ, Sens MA. Aminoglycoside antibiotics alter the electrogenic transport properties of cultured human proximal tubule cells. *Toxicol Pathol* 1992;20:608–16.
- Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999;49(2):91-102.
- Truong LD, Petrussevska G, Yang G, Gurpinar T, Shappell S, Lechago J, et al. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int* 1996;50:200–7.
- Tugcu V, Ozbek E, Tasci AI, Kemahli E, Somay A, Bas M, et al. Selective nuclear factor kappa-B inhibitors, pyrolium dithiocarbamate and sulfasalazine, prevent the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int* 2006;98:680–6.
- Tulkens PM. Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicol Lett* 1989;46:107–23.
- Valdivielso JM, Blantz RC. Acute renal failure: is nitric oxide the bad guy? *Antioxid Redox Signal* 2002;4:925–34.
- Valdivielso JM, Rivas-Cabanero L, Morales AI, Arévalo M, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. Increased renal glomerular endothelin-1 release in gentamicin-induced nephrotoxicity. *Int J Exp Pathol* 1999;80:265–70.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266:37–56.
- Vallon V. Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News Physiol Sci* 2003;18:169–74.
- Van Rooijen LA, Agranoff BW. Inhibition of polyphosphoinositide phosphodiesterase by aminoglycoside antibiotics. *Neurochem Res* 1985;10:1019–24.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231(25):232-5.

- Veljković S, Radenković M, Pavlović M, Dimitrijević O. Protektivni efekat verapamila na deskvamaciju tubularnog epitela u gentamicinskoj nefrotoksilnosti. *Acta Medica Medianae* 2000; 1:19-25.
- Verpooten GA, Giuliano RA, Verbist L, Eestermans G, De Broe ME. Once-daily dosing decreases renal accumulation of gentamicin and netilmicin. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45:22–7.
- Vunta H, Belda BJ, Arner RJ, Channa Reddy C, Vanden Heuvel JP, Sandeep Prabhu K. Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:1316–23.
- Vunta H, Davis F, Palempalli UD, Bhat D, Arner RJ, Thompson JT, et al. The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages. *J Biol Chem* 2007;282(25):17964-73.
- Walker PD, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1988;81:334–41.
- Wangher PD. Selenium and the brain: A review. *Nutr Neurosci* 2001;4:81–97.
- Ward DT, McLarnon SJ, Riccardi D. Aminoglycosides increase intracellular calcium levels and ERK activity in proximal tubular OK cells expressing the extracellular calcium-sensing receptor. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1481–9.
- Wardle EN. Nuclear factor κ B for the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(9):1764-8.
- Watanabe A, Nagai J, Adachi Y, Katsube T, Kitahara Y, Murakami T, et al. Targeted prevention of renal accumulation and toxicity of gentamicin by aminoglycoside binding receptor antagonists. *J Control Release* 2004;95:423–33.
- Watanabe T, Kiron V, Datoh S. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 1997;151:185–207.
- Whanger PD. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br J Nutr* 2004;91:11–28.
- Wickman G, Nessim MA, Cook DA, Vollrath B. The polycationic aminoglycosides modulate the vasoconstrictive effects of endothelin: relevance to cerebral vasospasm. *Br J Pharmacol* 2001;133:5–12.
- Wu Y, Connors D, Barber L, Jayachandra S, Hanumegowda UM, Adams SP. Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicol In Vitro* 2009;23:1170–8.
- Xia L, Nordman T, Olsson JM, Damdimopoulos A, Bjorkhem- Bergman L, Nalvarte I, et al. The mammalian selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress. *J Biol Chem* 2003;278:2141–6.
- Xia L, Pan J, Yao L, McEver RP. A proteasome inhibitor, an antioxidant, or a salicylate, but not a glucocorticoid, blocks constitutive and cytokine-inducible expression of P-selectin in human endothelial cells. *Blood* 1998;91:1625-32.
- Xia Y, Hill KE, Byrne DW, Xu J, Burk RF. Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. *Am J Clin Nutr* 2005;81(4):829-34.
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994;269:4705–8.

- Xu X-M, Sansores-Garcia L, Chen X-M, Matijevic-Aleksic N, Du M, Wu KK. Suppression of inducible cyclooxygenase-2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5292-7.
- Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998;396:77-80.
- Yin XM. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 2006;369:7-19.
- Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, Okamura M, Du S, Kasai A, et al. Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J Biol Chem* 2008;283(7):4252-60.
- Yoshiyama Y, Grenier L, Gourde P, Simard M, Lin L, Morin NJ, et al. Temporal variations in nephrotoxicity of low doses of isepamicin in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:802-6.
- Zamamiri-Davis F, Lu Y, Thompson JT, Prabhu KS, Reddy PV, Sordillo LM, et al. Nuclear factor-kappaB mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:890-7.
- Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, et al. Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4533-7.
- Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. *J Clin Invest* 1996;98:1699-702.
- Zurovsky Y, Haber C. Antioxidants attenuate endotoxin-gentamicin induced acute renal failure in rats. *Scand J Urol Nephrol* 1995;29:147-54.

PROTECTIVE EFFECTS OF SELENIUM AND SALICYLIC ACID IN GENTAMICIN-INDUCED NEPHROTOXICITY IN RATS

Gentamicin is a widely used antibiotic against serious and life-threatening infections, but its usefulness is limited by the development of nephrotoxicity. Salicylic acid is a phenolic compound present in plants with free radical-scavenging and iron chelation properties. It is a hydroxyl radical scavenger and can affect the activation of transcription factors. Selenium is a fundamental trace element that plays an important role in a number of physiological processes, including the elimination of reactive oxygen species. The present study was designed to determine the protective effect of selenium and salicylic acid in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Experiments were done on 64 adult Wistar rats divided into 8 groups of 8 animals each. The control group received only saline (1 ml/day) intraperitoneally (i.p.). Animals in the SE, SAL and SS groups, serving as positive controls, received only selenium (1 mg/kg), salicylic acid (100 mg/kg) and their combination, respectively. The GM group received gentamicin (100 mg/kg) i.p. The GSE group received the same dose of GM and selenium (1 mg/kg) by i.p. injections on a daily basis. The GSAL group received the same dose of GM and salicylic acid (100 mg/kg). The animals in GSS group received gentamicin with selenium and salicylic acid. All groups were treated during 8 consecutive days. Quantitative evaluation of GM-induced structural alterations and degree of functional alterations in the kidneys were performed by histopathological, biochemical and morphometric analyses in order to determine potential beneficial effects of selenium or salicylic acid coadministration with GM. Gentamicin was observed to cause a severe nephrotoxicity which was evidenced by an elevation of serum urea and creatinine levels. The significant increases in malondialdehyde levels and protein carbonyl groups indicated that gentamicin-induced tissue injury was mediated through oxidative reactions. Ultrastructural changes in kidney after gentamicin treatment included enlargement of glomeruli, infiltration of mononuclear cells, rupture of the basal membrane and necrosis of tubular cells. Selenium and salicylic acid administration protected kidney tissue against the oxidative damage and the nephrotoxic effect caused by gentamicin treatment. The results from our study indicate that selenium and salicylic acid attenuates oxidative-stress associated renal injury by reducing oxygen free radicals and lipid peroxidation in gentamicin-treated rats. Selenium and salicylic acid pretreatment results in significant reduction of morphological and functional kidney alterations induced by gentamicin.

PROTEKTIVNI EFEKTI SELENA I SALICILNE KISELINE KOD PACOVA SA AKUTNOM INSUFICIJENCIJOM BUBREGA IZAZVANOM GENTAMICINOM

Gentamicin je antibiotik koji se često koristi u lečenju ozbiljnih infekcija, međutim njegova upotreba je praćena razvojem nefrotoksičnosti. Salicilna kiselina je fenolna komponenta prisutna u biljkama, sa osobinama sakupljača slobodnih radikala i heliranja gvožđa. Može da utiče na aktivaciju nekih transkripcionih faktora i tako smanji proces zapaljenja. Selen je esencijalni mikroelement koji ima važnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima, uključujući eliminaciju slobodnih kiseoničkih radikala. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispituju protektivni efekti selena i salicilne kiseline kod pacova sa gentamicinskom nefrotoksičnošću. Eksperimenti su izvedeni na 64 odrasla Wistar pacova podeljena u 8 grupa po 8 životinja. Kontrolna grupa je dobijala fiziološki rastvor (1 ml/dan) intraperitonealno (i.p.). Životinje u SE, SAL i SS grupama su bile pozitivna kontrola i primale su i.p. selen (1 mg/kg), salicilnu kiselinu (100 mg/kg) i njihovu kombinaciju. Grupa GM je dobijala samo gentamicin i.p. (100 mg/kg). Životinje u GSE grupi tretirane su istom dozom gentamicina i selenom (1 mg/kg) i.p. injekcijom. Grupa GSAL je tretirana istom dozom gentamicina i salicilnom kiselinom (100 mg/kg) i.p. Grupa GSS je tretirana gentamicinom, selenom i salicilnom kiselinom u istim dozama kao kod drugih grupa. Sve grupe su tretirane tokom 8 uzastopnih dana. Kvantitativna evaluacija strukturnih i funkcionalnih oštećenja izazvanih gentamicinom je vršena pomoću patohistoloških, biohemijskih i morfometrijskih analiza sa ciljem da se odrede potencijalni protektivni efekti selena i salicilne kiseline. Tretman gentamicinom je doveo da izražene nefrotoksičnosti sa porastom serumskog kreatinina i ureje. Značajno povećanje malondialdehida i karbonilnih grupa proteina u tkivu bubrega GM grupe ide u prilog oksidativnog stresa kao jednog od mehanizama gentamicinske nefrotoksičnosti. Ultrastrukturne promene u bubregu nakon tretmana gentamicinom bile su u vidu uvećanja glomerula, infiltracije zapaljenskih ćelija, rupture bazalne membrane i nekroze tubulskih ćelija. Primena selena i salicilne kiseline je zaštitila bubreg od oksidativnog oštećenja i nefrotoksičnog dejstva gentamicina. Rezultati ove studije ukazuju da selen i salicilna kiselina umanjuju posledice oksidativnog stresa u bubregu kod pacova tretiranih gentamicinom. Primena selena i salicilne kiseline dovodi do značajnog smanjenja morfoloških i funkcionalnih oštećenja u bubregu izazvanih gentamicinom.

BIOGRAFIJA

Ime i prezime: Pavle Randelović

Datum i mesto rođenja: 06.07.1980. god., Zuara, Libija

Obrazovanje:

- Gimnaziju "Bora Stanković" u Nišu završio odličnim uspehom.
- Medicinski fakultet u Nišu upisao 1999/2000., diplomirao septembra 2006. sa prosečnom ocenom 10 i odbranio diplomski rad ocenom 10.
- Akademske doktorske studije molekularne medicine upisao 12.02.2007. na Medicinskom fakultetu u Nišu.

Profesionalna karijera:

- Marta 2008. izabran za saradnika u nastavi za UNO Fiziologija na Medicinskom fakultetu u Nišu.
- U zvanje asistenta za UNO Fiziologija na Medicinskom fakultetu u Nišu izabran 2010.

Stipendije u toku školovanja:

- stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka,
- stipendista Ministarstva Nauke za stipendiranje 100 mladih istraživača-doktoranata.

Projekti:

- U 2010. godini bio je saradnik na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Srbije „Istraživanje uzroka, mehanizma nastanka, prevencije i lečenja endemske nefropatije i tumora urotelijuma“ (Br. 145004).
- Od januara 2011. angažovan kao saradnik na dva projekta Ministarstva prosvete i nauke: „Monitoring elektromagnetnih zračenja mobilnih telekomunikacionih sistema u životnoj sredini, analiza molekularnih mehanizama i biomarkera oštećenja kod hronične izloženosti sa razvojem modela za procenu rizika i metoda za zaštitu“ (Br. 43012) i „Kombinatorne biblioteke heterogenih katalizatora, prirodnih proizvoda, modifikovanih prirodnih proizvoda i njihovih analoga: put ka novim“. (Br. 172061)

Pedagoški rad:

- Tokom studija pet godina demonstrator na predmetu Fiziologija.
- Pedagoško-metodičko usavršavanje u sklopu obuke nastavnika i saradnika na Medicinskom fakultetu u Nišu 2008. god.