

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milan S. Ivanov

**ULOGA ANGIOTENZINA II I REAKTIVNIH VRSTA
KISEONIKA TOKOM RAZVOJA AKUTNE BUBREŽNE
INSUFICIJENCIJE U EKSPERIMENTALNOJ
HIPERTENZIJ**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milan S. Ivanov

**THE ROLE OF ANGIOTENSIN II AND REACTIVE
OXYGEN SPECIES DURING THE ACUTE RENAL
FAILURE DEVELOPMENT IN EXPERIMENTAL
HYPERTENSION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

MENTORI:

dr Zoran Miloradović, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja;

dr Jelena Đorđević, vandredni profesor, Univerziteta u Beogradu, Biološki fakultet;

ČLAN KOMISIJE:

dr Nevena Mihailović- Stanojević, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja;

Datum _____,

ZAHVALNICA

Ovom prilikom želeo bih da izrazim veliku zahvalnost svim kolegama iz moje grupe, kako pojedinačno, tako i grupno, jer oni zaista predstavljaju skup sjajnih profesionalaca okupljenih u odličan tim. Pored toga što su izuzetni naučnici, izuzetne kolege i dobri prijatelji, oni su i moja druga porodica.

Hvala dr Đurđici Jovović, rukovodiocu grupe, što je od samog početka verovala u mene, usmeravala me i davala pravovremene savete vezane za izradu doktorske disertacije, ali i za lični razvoj kao naučnika.

Posebno hvala dr Neveni Mihailović-Stanojević na pokazanom strpljenju, savetima i pomoći u mom radu, a pre svega hvala na iskrenom osmehu, neverovatnoj količini pozitivne energije kojom zrači i kojom me je prosto inspirisala i gurala napred i kada nije išlo.

Takođe želim da se zahvalim i dr Jelici Grujić Milanović na idejama, predlozima i korekcijama koji su ovu disertaciju sigurno učinili kvalitetnijom. Radeći na doktoratu sa jednom takvom predanom naučnicom uspeo sam da savladam brojne metode neophodne za rad u laboratoriji. Uvek je bila spremna da me sasluša i posavetuje

Specijalnu zahvalnost dugujem prof dr Jasmini Marković-Lipkovski na izdvojenom vremenu i stručnoj pomoći oko izrade dela histopatoloških studija, prilikom rada na mojoj doktorskoj disertaciji.

Jedno drugarsko hvala mojim kolegamicama Danijeli Karanović i Una Jovani Vajić na pomoći i odmeni u laboratorijskim obavezama kada mi je to bilo najpotrebnije.

Veliko hvala dugujem i svojoj mentorki prof dr Jeleni Djordjević, ne samo na pomoći oko izrade moje teze, već i na pravilnom usmeravanju i praćenju moje naučne karijere za vreme mojih kompletnih doktorskih studija.

Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru dr Zoranu Miloradoviću koji je bio uz mene od samog početka izrade ove disertacije. Hvala mu što je svo svoje znanje nesebično delio sa mnom, davao mi mudre savete, oštru, ali pravilnu kritiku, što je sveukupno dovelo do ovog uspešnog završetka našeg zajedničkog putovanja. Svesno se trudio da me učini boljim naučnikom, pored toga me učinio i boljim čovekom.

Zahvaljujem se mojim roditeljima, Stefanu i Brankici, koji su celog života bili tu za mene i zato što su na pravi način i upravo vreme kada god je trebalo dali vetar u leđa

Mojoj supruzi, Vladani, hvala na strpljenju, ljubavi i pomoći, koju je neprestano pružala za vreme izrade ove teze, njen osmeh i zagrljaj uklanjao je sve poteškoće na ovom putu.

Ovaj doktorat posvećujem mojoj ćerki Vanji, jer je titula oca, koju sam od nje dobio, titula na koju ću biti najponosniji celog života.

Ova doktorska disertacija urađena je na Institutu za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta osnovnih istraživanja ON 175096 pod nazivom: „Ispitivanje antihipertenzivnog i renoprotektivnog potencijala supstanci prirodnog i sintetskog porekla u eksperimentalnim modelima kardiovaskularnih i bubrežnih oboljenja.“

ULOGA ANGIOTENZINA II I REAKTIVNIH VRSTA KISEONIKA TOKOM RAZVOJA AKUTNE BUBREŽNE INSUFICIJENCIJE U EKSPERIMENTALNOJ HIPERTENZIJI

REZIME

Akutna bubrežna insuficijencija (ABI) se definiše kao nagli gubitak bubrežne funkcije. Uzroci nastanka ABI su mnogobrojni, a mehanizmi razvoja još uvek nedovoljno jasni. Karakterišu je iznenadna pojava, brzi tok, neizvesna i često loša prognoza krajnjeg ishoda bolesti. ABI je česta pojava kod hospitalizovanih pacijenata, a učestalost njenog nastanka na odeljenjima intenzivne nege se kreće do 30%. Udružena sa drugim oboljenjima, poput hipertenzije, uzrokuje visok stepen mortaliteta.

Savremena istraživanja pokazuju da hipertenzija i oksidativni stres imaju važnu ulogu u progresiji bubrežnih oboljenja, što je usmerilo i stavilo akcenat naših istraživanja na uloge ova dva patogenetska faktora u nastanku i progresiji ABI.

Sistem renin angiotenzin aldosteron (RAAS) ima značajnu ulogu u održanju krvnog pritiska i homeostatskih mehanizama bubrega. On u velikoj meri reguliše bubrežnu hemodinamiku i vaskularnu reaktivnost, a kako je intrarenalna vazokonstrikcija jedan od glavnih mehanizama razvoja ABI, očita je njegova uloga u patogenetskim mehanizmima nastanka ove bolesti.

Oksidativni stres predstavlja disbalans između produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) i sposobnosti biološkog sistema da ih uklanja ili da reparira oštećenja nastala produkcijom ovih molekula. Reaktivne vrste kiseonika su izuzetno reaktivne supstance usled postojanja nesparenih elektrona, i kao takve mogu da uzrokuju oštećenja na DNK, RNK, kao i nekim proteinima koji imaju ulogu u procesu starenja. Pokazano je da oksidativni stres ima veliku ulogu u razvoju mnogih oboljenja, kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest, i neki kardiovaskularni poremećaji. Takođe je dokazano da, prilikom ishemičnih povreda organa i tkiva, nakon hipoksije, a tokom reperfuzije, dolazi do povećane produkcije molekula RVK. Iz pomenutih razloga, sasvim je izvesno da u ishemičnoj formi ABI povećana koncentracija ovih molekula, doprinosi nastanku i razvoju ovog teškog oboljenja.

Kako je poslednjih godina u svetu sve veći broj hipertenzivnih pacijenata, a sa druge strane nastanak ABI predstavlja ozbiljan klinički problem, postavili smo za cilj da ispitamo

ulogu angiotenzina II (AngII) i RVK u mehanizmima nastanka ishemične ABI u uslovima hipertenzije. Time bi bar delimično doprineli razumevanju nastanka ABI u pomenutim uslovima, što posledično može dovesti do uspešnijeg terapijskog pristupa u lečenju ove bolesti kod hipertenzivnih pacijenata, koji dožive epizodu sa razvojem ABI.

Radi ostvarivanja postavljenih ciljeva koristili smo pacove sa urođenom hipertenzijom (SHR – engl. Spontaneously hypertensive rat) odgajane u Institutu za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu. Životinje, muškog pola, su bile telesne mase od oko 300g, hranjene su standardnom hranom za laboratorijske životinje (Veterinarski zavod Subotica, Srbija), i imale su slobodan pristup vodi. Akutna bubrežna insuficijencija, ishemičnog tipa, izazivana je klemovanjem leve bubrežne arterije, dok je desni bubreg bio hirurški odstranjivan.

Životinjama smo davali:

Losartan (Antagonist AT1 receptora za angiotenzin II), u dozi od 10mg/kg t.m., rastvaran u 4 ml fiziološkog rastvora

Tempol (4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-¹⁵N-oksil, mimetik enzima superoksid dismutaze) 40mg/kg/h t.m., rastvaran u 4 ml fiziološkog rastvora

Životinje su podeljene u četiri grupe: 1. kontrolna grupa lažno operisanih pacova (SHAM); 2. kontrolna grupa sa akutnom bubrežnom insuficijencijom (ABI); 3. grupa životinja koje su dobijale infuziju losartana u toku i posle ABI (ABI+LOS); 4. grupa životinja koje su dobijale infuziju tempola za vreme i posle ABI (ABI+TEMP); Kontrolne grupe SHAM i ABI primale su infuziju 4 ml fiziološkog rastvora. Infuzija je otpočinjala 5 min pre uklanjaanja netraumatske kleme i trajala narednih 175 min.

Sva hemodinamska merenja kao i uzorci za biohemijska i histopatološka ispitivanja uzimana su 24 časa nakon završenog tretmana.

Naši rezultati su pokazali da se kod pacova sa ABI bubrežni protok smanjuje, a bubrežni otpor naglo povećava u odnosu na grupu lažno operisanih životinja. Ovi rezultati ukazuju na snažnu intrarenalnu vazokonstrikciju u postishemičnom bubregu, što predstavlja jedan od glavnih uzroka razvoja ABI. Blokada receptora za Ang II dovela je do povećanja protoka i smanjenja otpora kroz bubrežnu arteriju. Tretman tempolom snizio je otpor protoku krvi kroz bubrežnu arteriju, što je rezultiralo blagim povećanjem protoka.

Biohemijski pokazatelji bubrežne funkcije (kreatinin, urea i neorganski fosfati u plazmi), značajno su povećani u odnosu na fiziološke okvire nakon izazivanja ishemičnog tipa ABI. Tretman blokatorom AT1 receptora u značajnoj meri snižava ove biohemijske parametre, što poboljšava bubrežnu funkciju u odnosu na grupu kod koje je izazvana ishemična ABI. Uklanjanje superoksidnog anjona, sa druge strane, nije dovelo do značajnih promena u ovim parametrima u postishemičnom modelu ABI, udružene sa hipertenzijom.

ABI dovodi do povećanja lipidne peroksidacije u plazmi hipertenzivnih pacova 24h nakon reperfuzije. Blokada RAAS, kao i uklanjanje RVK dovodi do smanjenja lipidne peroksidacije u plazmi SHR sa razvijenom ishemičnom ABI.

Naši rezultati pokazuju da postishemično povećanje nivoa AngII u hipertenzivnim uslovima ima značajnu ulogu u nastanku tubulo-intersticijskih oštećenja. Blokada AT1 receptora dovodi do značajnog poboljšanja morfološkog izgleda postishemičnog bubrega. Sa druge strane, upotreba sakupljača superoksidnog anjona - tempola, nije imala bitan efekat na histološku sliku postishemičnog hipertenzivnog bubrega pacova.

Opšti zaključak našeg rada ukazuje da postishemično povećanje nivoa AngII u hipertenzivnim uslovima, značajno utiče na razvoj renalne vazokonstrikcije i regulaciju glomerulske filtracije, kao i u nastanku tubulo-intersticijskih oštećenja u bubregu.

Superoksidni anjon nema posebno izražen efekat u nastanku i održanju ABI kod hipertenzivnih pacova, ali zbog prirode ishemično-reperfuzionih oštećenja, svakako treba ispitati ulogu ostalih RVK.

U cilju potpunijeg razumevanja uloge AngII i RVK kod hipertenzivnih pacijenata kod kojih dolazi do razvoja ishemične ABI, neophodno je uzeti u obzir i druge okolnosti kao što su godine života, vaskularna oboljenja, prethodno nastala bubrežna oštećenja, druge individualne karakteristike pacijenta i sprovesti mnogo detaljnija klinička istraživanja.

Ključne reči: Akutna bubrežna insuficijencija; Hipertenzija; Renin angiotenzin aldosteron sistem; Angiotenzin II; Reaktivne vrste kiseonika; Losartan; Tempol; Pacovi sa urođenom hipertenzijom

Naučna oblast: Biologija; Fiziologija životinja i čoveka

UDK: 591.112.3 : 611.61] : 599.45(043.3)

THE ROLE OF ANGIOTENSIN II AND REACTIVE OXYGEN SPECIES DURING THE ACUTE RENAL FAILURE DEVELOPMENT IN EXPERIMENTAL HYPERTENSION

SUMMARY

Acute renal failure (ARF) is defined as a sudden loss of renal function. It's multifactorially caused, but the mechanism of pathogenesis and development of this disease is still uncompletely defined. ARF is characterized by sudden appearance, rapid progression of disease and very uncertain and often fatal outcome. ARF frequently occurs with hospitalized patients. The frequency of its occurrence in the intensive care units moves up to 30%. Associated with other diseases, such as hypertension, it causes high rate mortality.

Recent studies show that hypertension and oxidative stress have an important role in the renal disease progression. This fact directed the focus of our study towards the influence of these two pathogenetic factors in development and progression of ARF.

The system rennin angiotensin aldosterone (RAAS) has a great role in blood pressure control and kidney homeostatic mechanisms. It mostly regulates the renal hemodynamic, but considering the fact that the intrarenal vasoconstriction is one of the major mechanisms of ARF development, it obviously influences the pathogenetic mechanisms in the development of this disorders.

Oxidative stress is defined as a disbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and an ability of biological system to remove or fix the damage made due to production of these molecules. Reactive oxygen species are highly reactive due to presence of unpaired electrons and consequently lead to damage of DNA, RNA and some other ageing related proteins. There is evidence that the oxidative stress has a great influence in the progression of numerous diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's, as well as some cardiovascular disorders. Furthermore, during the ischemia/reperfusion injuries of organs and tissues, there is increased reactive oxygen species molecule production. Thus, the ischemic type of ARF is characterized by a high concentration of these molecules which contribute to the development of this devastating illness.

Considering the rising number of hypertensive patients in the world, as well as the fact that the ARF is a serious clinical problem, we believe that it is important to investigate the

role of angiotensin II and reactive oxygen species in the development of ischemic ARF, during the hypertension. The goal of our research is to contribute to understanding the occurrence of ARF in these conditions which can lead to more successful therapeutic approach to treating this disease.

In our study we used male adult spontaneously hypertensive rats (SHR), 24 weeks old, weighing about 300 g, which were bred in the Institute for Medical Research, Belgrade, Serbia, and fed with a standard chow for laboratory rats (Veterinary Institute JSC Subotica). The ischemic type of acute renal failure was induced by clamping the left renal artery, while the right kidney was surgically removed.

Animals were given:

- Losartan (angiotensin II type 1 receptor antagonist), at a dose of 10mg/kg body weight, dissolved in 4 ml saline;
- Tempol (4-Hydroxy- 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-15N-oxyl, superoxide dismutase mimetic) 40mg/kg/h tm, dissolved in 4 ml of saline;

The animals were divided into four groups: 1- group of sham operated rats (SHAM); 2 - group with acute renal failure (ARF); 3 - group of animals that received an infusion of losartan during and after ARF (ABI+LOS); 4 - group of animals that received the infusion of tempol during and after ARF (ABI+TEMP). SHAM and group with ARF were treated by infusion of 4 ml of saline. The infusion began 5 minutes before removing nontraumatic clamps and took the next 175 min. All hemodynamic measurements and samples for biochemical and histopathological examination were taken 24 hours after completion of treatment.

Twenty-four hours after ARF induction renal blood flow (RBF) was significantly reduced followed as consequence increased renal vascular resistance (RVR) in postischemic SHR. These results indicate a strong intrarenal vasoconstriction in the ischemic kidney, which is one of the main factors involved in the initiation and maintenance of ARF. Blockade of Ang II leads to an increase in RBF and reduced RVR through the renal artery. Tempol treatment reduces RVR, but only slightly affects the increasing of flow through the renal artery.

Biochemical markers of renal function (creatinine, urea and inorganic phosphates in plasma), were extremely aggravated after causing the ischemic type of ARF. AT1 receptor blocker treatment significantly improved the biochemical parameters of renal function.

Removal of superoxide anions, on the other hand, has not led to significant changes in these parameters in the present model of ischemic ARF, associated with hypertension.

Development of ARF in SHR causes the increase of lipid peroxidation in plasma, 24 h after reperfusion. RAAS blockade and scavenging of ROS decreased lipid peroxidation in plasma of SHR rats with developed ischemic ARF.

Our results indicate that postischemic increase of AngII in hypertensive conditions has a significant role in the development of tubulo-interstitial damage. AngII AT1 receptor antagonist, losartan, significantly improved patho-morphological appearance of postischemic kidney. Using scavenger of superoxide anion, the tempol, did not have a significant effect on the histology of postischemic hypertensive rat's kidney.

The general conclusion of our work would suggest that increasing levels of ischemic AngII in hypertensive conditions has a significant role in the development of renal vasoconstriction and regulation of glomerular filtration, as well as development of tubulo-interstitial damage in the kidney.

On the other hand, our results indicate superoxide anion had not particularly distinguished effects in the development and maintenance of ARF in hypertensive rats, but considering the nature of the ischemic-reperfusion injury, it is needed to examine the role of other ROS form.

For the understanding the full effects of AngII and ROS in hypertensive patients with the ischemic episode of ARF, we should take into account many other factors (for example, age, vascular disease, pre-formed kidney damage and other individual characteristics of patients), and conduct much more detailed clinical investigation.

Key words: Acute renal failure; Hypertension; Renin angiotensin aldosterone system; Angiotensin II; Reactive oxygen species; Losartan; Tempol; Spontaneously hypertensive rat (SHR).

Scientific area: Biology; Animal and human physiology

UDC: 591.112.3 : 611.61] : 599.45(043.3)

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Akutna bubrežna insuficijencija	1
1.1.1	Definicija akutne bubrežne insuficijencije	1
1.1.2	Patofiziološki mehanizmi ABI	3
1.1.2.1	Smanjenje propustljivosti glomerulskih kapilara	3
1.1.2.2	Vraćanje glomerulskog filtrata u intersticijum	3
1.1.2.3	Opstrukcija tubula	4
1.1.2.4	Intrarenalna vazokonstrikcija	4
1.1.3	Vrste bubrežnih oštećenja tokom nastanka ABI.....	5
1.1.3.1	Subletalna oštećenja	5
1.1.3.2	Letalna oštećenja: nekroza.....	5
1.1.3.3	Letalna oštećenja: apoptoza.....	6
1.1.4	Model postishemične eksperimentalne ABI.....	7
1.2	Sistem renin – angiotenzin aldosteron i njegova uloga u bubrežnim mehanizmima.....	9
1.2.1	Osnovne komponente i fiziološka uloga sistema renin-angiotenzin-aldosteron	9
1.2.2	Regulacija sekrecije renina.....	11
1.2.3	Fiziološka uloga sistema renin-angiotenzina-aldosteron.....	12
1.2.4	Uloga sistema renin-angiotenzin-aldosteron u vaskularnim oboljenjima i bubrežnoj insuficijenciji	13
1.3	Reaktivne vrste kiseonika.....	15
1.3.1	Antioksidativna zaštita	19
1.3.2	Oksidativni stres u humanoј patologiji	19
1.3.3	Značaj oksidativnog balansa.....	20
1.3.4	Reaktivne vrste kiseonika u hipertenziji.....	21
1.3.5	ROS u ishemiji i reperfuziji.....	22
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	25
3	MATERIJAL I METODE.....	26

3.1.1	Ekperimentalni protokol i model akutne bubrežne insuficijencije	26
3.1.2	Merenje hemodinamskih parametara 24 časa nakon reperfuzije.....	27
3.1.3	Određivanje biohemijskih parametara.....	28
3.1.4	Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima	29
3.1.4.1	Određivanje hemoglobina metodom Drabkina i Austina.....	29
3.1.4.2	Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	30
3.1.4.3	Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	30
3.1.4.4	Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px)	31
3.1.4.5	Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)	32
3.1.5	Određivanje stepena lipidne peroksidacije	33
3.1.6	Histopatološke studije	33
3.1.7	Statistička obrada rezultata.....	34
4	REZULTATI.....	35
4.1.1	Hemodinamski parametri	35
4.1.2	Biohemijski parametri	40
4.1.3	Oksidativni stres	46
4.1.4	Histopatološki parametri	50
5	DISKUSIJA.....	56
6	ZAKLJUČAK.....	64
7	LITERATURA.....	67

1 UVOD

1.1 Akutna bubrežna insuficijencija

1.1.1 Definicija akutne bubrežne insuficijencije

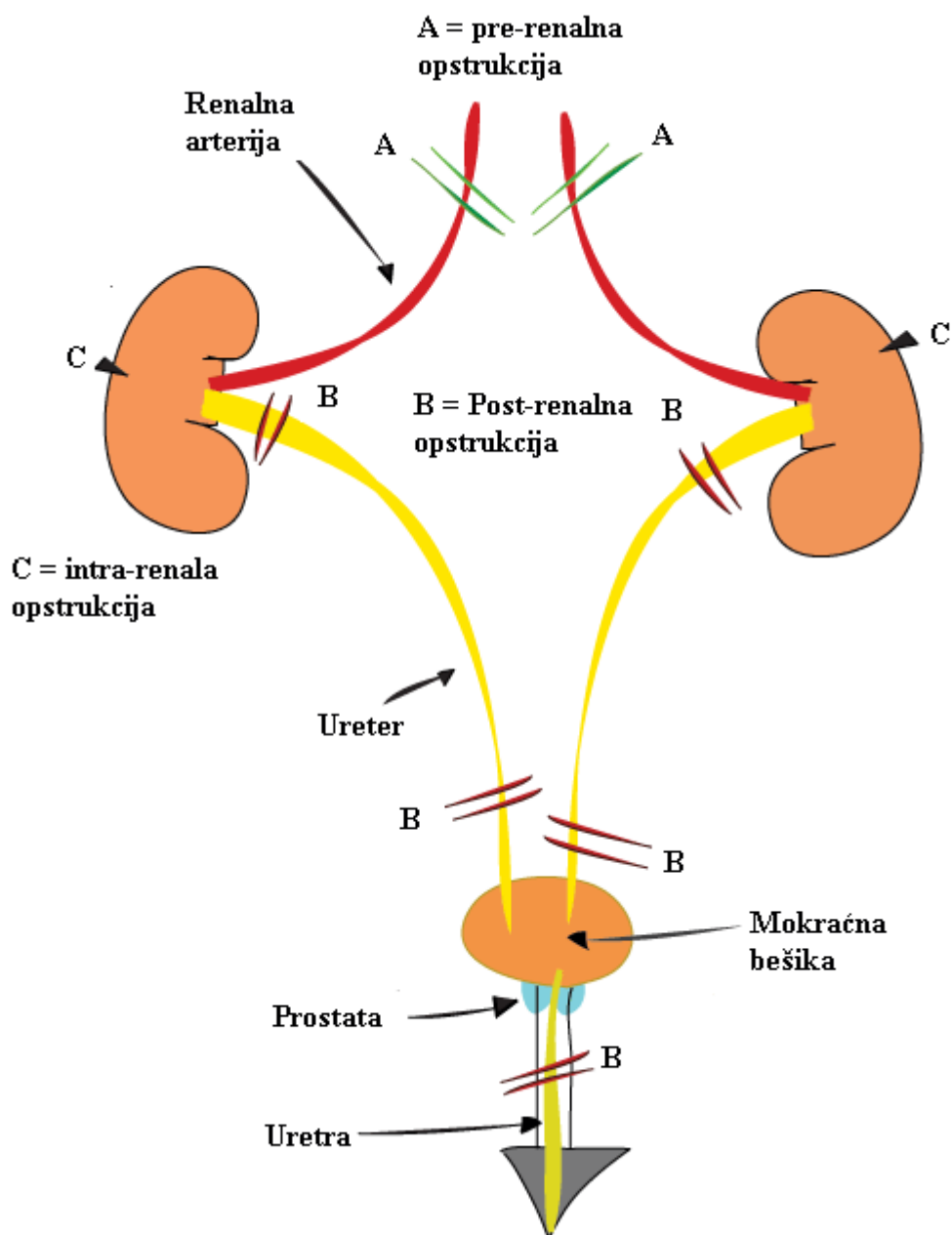
Akutna bubrežna insuficijencija (ABI) nastaje kao posledica ishemičnog ili toksičnog oštećenja bubrega. Karakteristike ove bolesti su iznenadno i trajno smanjenje glomerulske filtracije, koje je obično praćeno azotemijom, oligurijom, ili ređe anurijom (1). Na značaj nastanka ABI ukazuju i statistički podaci stope smrtnosti, koja se u opštoj populaciji kreće od 7-23%, a na odeljenjima intenzivne nege taj procenat se povećava i do 50-80% (2, 3).

U zavisnosti od mesta nastanka ABI se deli na:

- prerenalnu;
- parenhimsku (renalnu);
- postrenalnu. (4); (slika 1)

Pojedini autori (5 i 6) akutno otkazivanje bubrega klasifikuju u pet kategorija:

- prerenalna azotemija;
- akutna tubularna nekroza sa oligurijom;
- neoligurična akutna tubularna nekroza;
- opstrukcija urinarnog trakta i
- akutni glomerulonefritis.



Slika 1 klasifikacija ABI po mestu nastanka A = prerenalna; B = postrenalna; C = renalna

Preuzeto sa <http://healthcarediary.com/acute-renal-failure/>

Prerenalna akutna bubrežna insuficijencija (fiziološka oligurija) nastaje usled redukcije renalne perfuzije izazvane hipovolemijom. Hipovolemija može biti posledica hemoragije, dijareje, povraćanja, srčane insuficijencije usled kardiogenog šoka, kardijalne dekompezacije, hipotenzije, smanjene periferne cirkulacije (pareza vazomotornih neurona), začepjenja bubrežnih arterija i različitih drugih poremećaja (7). U pomenutim stanjima bubrežna autoregulacija postaje potpuno neefikasna.

Postrenalna oligurija predstavlja nemogućnost ekskrecije normalno stvorenog urina usled različitih mehaničkih prepreka. Ovaj tip ABI nastaje usled začepljenja uretra, vrata mokraćnog mehura, začepljenja uretre kamencem, tumora, povećane prostate i dr (8).

Posmatrana u užem smislu ABI se naziva akutnom tubularnom nekrozom, jer je S3 segment proksimalnih tubula najosetljivije mesto oštećenja, kako i u ishemičnom tako i u nefrotoksičnom obliku ABI.

1.1.2 Patofiziološki mehanizmi ABI

Za razvoj i održanje ABI odgovorna su četiri patofiziološka mehanizma:

- smanjenje propustljivosti glomerulskih kapilara;
- vraćanje (engl.-backleak) glomerulskog filtrata u intersticijum;
- opstrukcija tubula;
- intrarenalna vazokonstrikcija.

1.1.2.1 Smanjenje propustljivosti glomerulskih kapilara

Istraživanja su pokazala da su promene glomerularne membrane uključene u mehanizme odgovorne za smanjenje glomerulske filtracije u oba modela ABI (9). Povećanje njene propustljivosti za proteine i/ili smanjenje koeficijenta ultrafiltracije vodi do promene glomerulske permeabilnosti. Koeficijent ultrafiltracije zavisi od permeabiliteta glomerulskih kapilara i veličine korisne površine za glomerulsku filtraciju. Nastanak i razvoj ovog mehanizma i njegov uticaj na patofiziologiju ABI još uvek nije jasno definisan. Bubrenje endotelnih ćelija, naročito nakon ishemičnog oštećenja predstavlja moguće objašnjenje ovog fenomena (1).

1.1.2.2 Vraćanje glomerulskog filtrata u intersticijum

Kako u eksperimentalnim modelima, tako i u kliničkoj praksi, u patogenezi ABI je dokazan značaj vraćanja glomerulskog filtrata u intersticijum bubrega (10). Davanjem infuzije dekstrana i inulina pacijentima sa razvijenom ABI, dobijeni su znatno veći klirensi za

dekstran nego za inulin (11). Ovim se došlo do zaključka da se, kod pacijenata, sa ABI inulin (molekul sa značajno manjom molekulskom masom) vratio nazad kroz oštećeni epitel tubula u intersticijum bubrega. Ovaj mehanizam tesno je povezan sa hemodinamskim poremećajima prisutnim kod pacijenata sa ABI, a koji dovode do tubularne opstrukcije.

1.1.2.3 Opstrukcija tubula

Nakon ishemičnog ili toksičnog oštećenja u tubulima bubrega se nagomilavaju otpadni produkti („debris”) od oljuštenih tubulocita, koje se mešaju sa intratubularnim proteinima stvarajući cilindre (12). Formirajući čepove u tubulama, cilindri povećavaju unutartubularni pritisak, koji kada nadvlada glomerulski pritisak, dovodi do smanjenja i prestanka glomerulske filtracije. Daljim povećanjem ovog pritiska dolazi do ruptуре tubula i vraćanja sadržaja tubula u intersticijum bubrega. Savremena istraživanja (13) su pokazala da dugo godina korišćeni termin „akutna tubularna nekroza“ nije adekvatan, i da su polja direktne nekroze, nastale usled ABI, ograničena i relativno retka. Tubulociti reaguju na oštećenja nastala prilikom ABI na različite načine, pa i pored evidentnih letalnih oštećenja, u većini slučajeva dolazi i do znatnih subletalnih oštećenja ćelija (1).

1.1.2.4 Intrarenalna vazokonstrikcija

Intrarenalna vazokonstrikcija predstavlja jedan od najvažnijih patofizioloških mehanizama u nastanku ABI. Istraživanja su pokazala, kako na eksperimentalnim modelima, tako i u kliničkoj praksi, da prilikom ABI dolazi do značajnog smanjenja ukupnog protoka krvi kroz bubrege i to kao posledica renalne vazokonstrikcije. Protok krvi u proseku smanjuje se i do 50 % (1). Vaskularno oštećenje endotela bubrega ima značajnu ulogu u nastanku i održanju ABI. Oštećenjem endotelnih ćelija dolazi do poremećaja odnosa vazoaktivnih substanci u bubregu, a posebno se remeti odnos između vazodilatatornog molekula azot monoksida (NO) i endotelina 1 (ET-1), molekula sa najjačim vazokonstriktornim dejstvom (14). Renalna oštećenja pospešuju sintezu endogenog ET-1, dok ishemični uslovi dovode do smanjenja sinteze NO (15,16). Osim direktnog vazodilatatornog delovanja na zidove krvnih sudova, Liberthal (1997) je pokazao da NO inhibira transkripciju gena za endotelin i menja aktivnost endotelina na nivo receptora, čime dodatno pospešuje vazodilataciju (14).

1.1.3 Vrste bubrežnih oštećenja tokom nastanka ABI

1.1.3.1 Subletalna oštećenja

Molitoris i saradnici (1991-1994) su pokazali da subletalna oštećenja ćelija imaju značajnu ulogu u poremećenoj funkciji nefrona (17-20). Oni su pokazali da u ishemičnoj formi ABI dolazi do razaranja aktinskog citoskeleta, i posledične translokacije enzima Na^+/K^+ -ATP-aze sa bazolateralnog na apikalni deo tubulocita. Ovakav gubitak ćelijskog polariteta tubulocita dovodi do poremećaja transporta soli i vode (17-20). Takođe, ove promene remete propustljivost tubulocita koji gube svojstvo barijere dovodeći do pojave vraćanja filtrata u tkivo bubrega.

Subletalna oštećenja takođe dovode i do gubitka adhezije sa matriksom bazalne membrane tubulocita. Epitelne ćelije tubula se, preko receptornih proteina $\beta 1$ integrina, smeštenih na bazalnom delu ćelija, spajaju sa ekstracelularnim matriksom. Integrini se preko kompleksa proteina, nazvanih athezivni plak, vezuju za citoskelet tubularnih ćelija (21). Ekstracelularni domen integrina vezuje se sa matriksnim proteinima fibronektinom i kolagenom (21) na kojima prepoznaju tripeptidnu sekvencu arginin-glicin-asparagin (RGD). Prilikom nastanka ABI dolazi do gubitka polariteta ćelije i integrini se premeštaju sa bazalnog na apikalni domen subletalno oštećene tubulocite (22, 23). Morfološkim studijama (13) je pokazano da migracijom integrina dolazi do odlepljivanja (engl.- detachment) tubulocita sa bazalne membrane, kao i do njihovog ponovnog povezivanja, kako međusobnog, tako i sa zdravim, neoštećenim ćelijama, što sve doprinosi opstrukciji tubularnog lumena (23). Ovaj proces pospešuje vraćanje glomerulskog filtrata iz tubula u intersticijum bubrega, kao i pojavu tubulocita u urinu. Davanjem RGD sekvence u višku kod pacova sa ABI dobijeno je poboljšanje glomerulske filtracije najverovatnije preko smanjenja stepena tubularne opstrukcije (24, 25).

1.1.3.2 Letalna oštećenja: nekroza

Do nekroze tubulocita dolazi usled intenzivnog pražnjenja ćelijskih energetske rezerve, kao i ireverzibilnih oštećenja plazma membrane i ćelijskih organela. Razaranje membrane ćelije i remećenje transportne aktivnosti dovodi do bubrenja ćelije, usled ulaska natrijuma i

vode (26, 27). Oštećenjem plazmaleme tubulocita i izlivanjem citoplazmatskog sadržaja sa proteolitičkim enzimima u ekstracelularni prostor dolazi do mnogobrojnih zapaljenskih procesa okolnog tkiva bubrega.

Usled neregularne prirode i mnogostrukih mehanizama nastanka nekroze pokušaji terapijskog pristupa nakon nastalih promena u bubregu ograničenog su efekta (14).

1.1.3.3 Letalna oštećenja: apoptoza

Apoptoza je genetski programirana ćelijska smrt koja zahteva utrošak energije (26, 27). Prilikom apoptoze zapremina citoplazme ćelije se smanjuje, a nukleusni sadržaj se kondenzuje (30). U toku kondenzacije dolazi do fragmentacije nukleusa koji često obrazuje apoptotična tela od delova jedarnog materijala okruženim tankim slojem citoplazme i neoštećenom plazma membranom (30, 31). Apoptotične ćelije se ubrzo zatim fagocituju od strane makrofaga i susednih epitelnih ćelija, tako da brzo iščezavaju bez ikakvih oštećenja ili zapaljenja na okolnom tkivu. Iz ovih razloga apoptotične ćelije teško je uočiti (28, 30).

Kao vid programirane ćelijske smrti, apoptoza se javlja tokom umerene ishemije ili oštećenja ćelija toksinima u koncentracijama u kojima ne dolazi do drastičnih metaboličkih poremećaja ili nekroze (28, 32). Pokretač apoptoze u ABI predstavlja gubitak "faktora preživljavanja", kao što su solubilni faktori rasta i signalni molekuli odgovorni za ćelijsko-ćelijsku i ćelijsko-substratnu adheziju (33). Prilikom nedostatka renotrofičnih hormona kao što su epidermalni faktor rasta (EGF) i faktori rasta slični insulinu 1 (IGF1)), tubulocite u kulturi ćelija umiru apoptozom (34). Nakon nastanka ABI u septičnim uslovima kada je povećana produkcija makrofaga, faktor nekroze tumora α (TNF- α) može da doprinese pojavi apoptoze (28). Na biohemijskom nivou, aktiviranje endonukleaza predstavlja značajan korak u apoptotskom fragmentisanju DNK (29). U slučaju nekroze DNK se raspada u manje fragmente baznih parova različitih veličina, dok kod apoptoze endonukleaze formiraju nukleozome veličine do 200 baznih parova (28).

Savremena istraživanja pokazuju da kaskadnom aktivacijom proteaza sličnih interleukin-1 β konvertujućem enzimu (ICE), dolazi do proteolitičkog cepanja citoplazmatskog i nukleusnog sadržaja i apoptoze ćelije (35, 36).

1.1.4 Model postishemične eksperimentalne ABI

Mnogobrojni su životinjski modeli koji se koriste za eksperimentalno proučavanje ABI. Prvi kompletan opis modela klemovanja hilusa pacova, dao je Klotesky 1954. godine (37). Najčešće korišćen model je unilateralna okluzija renalne arterije, uglavnom leve, sa uklanjanjem desnog bubrega. Vreme izazivanja ishemijske kod različitih autora varira od 40-70 minuta, a u pacovskim modelima ono najčešće traje od 40-45 min (38-42). Tok ishemijske ABI možemo podeliti na tri faze: inicijalna faza, faza održavanja i faza oporavka (43). Tokom nastanka ishemijske ABI dolazi do značajnog pada klirensa kreatinina, povećanja frakcione ekskrecije natrijuma, kao i koncentracije uree u krvi (44), u periodu nakon 24h. Takođe, pacovi kojima je izazvana ABI pokazuju značajno sniženje izlučivanja urina, 15-30 % od kontrolne vrednosti (45,46). Malis i saradnici (45) su pokazali značajnu redukciju glomerulske filtracije kod pacova kojima je 40 minuta klemovan hilus levog bubrega. Kod ovih životinja klirens inulina, 3 sata nakon ishemijske iznosio je $4,2 \pm 0,9$ % preishemijske vrednosti (45).

U ishemijskom tipu ABI dolazi do značajnog smanjenja ukupnog renalnog protoka krvi sa izrazitom spoljašnjom kortikalnom ishemijskom. Nakon 45-ominutne okluzije renalne arterije pacova, pored izrazite kortikalne ishemijske, javlja se i poremećaj cirkulacije spoljašnjeg medularnog područja, koji dostiže maksimum 24-48 h nakon uspostavljanja recirkulacije.

Solez je 1983. godine pokazao sličnosti između eksperimentalne postishemijske ABI sa bubrežnom insuficijencijom zabeleženom u kliničkoj praksi (44). Pomoću elektronske mikroskopije na glomerulima su opisane karakteristične promene na filtracionoj barijeri. ABI dovodi do značajnog smanjenja glomerulskih endotelnih, epitelnih i mezengijelnih ćelija koje su dovoljne da zatvore kapilarni lumen (47). Površine endotela prilikom oštećenja jasno pokazuju smanjenje veličine i gustine pora (fenestri). U prvom satu ishemijske, tela i pedicela podocita se šire i postaju spljošteni, a nakon toga se smanjuje opsežnost promena (48). Bubrenje tubulocita dešava se još u toku okluzije renalne arterije, da bi nekoliko minuta nakon skidanja kleme otpočelo propadanje i ljuštenje mikrovila četkastog pokrova tubulocita u lumenu proksimalnih tubula (49). Tako oljušteni mikrovili spajaju se i dalje bubre u tubularnom lumenu, postizujući dijametar od nekoliko mikrometara. Putujući dalje kroz nefron, mogu da začepi silazni i ravni deo Henleove petlje. Ova proksimalna opstrukcija prolaznog je karaktera usled lize oljuštenih fragmenata mikrovila. Međutim istovremeno se formiraju i

cilindri u distalnim delovima nefrona, tako da, nakon 24 časa, većina distalnih tubula i sabirnih cevčica sadrži cilindre (10). Sporadično pojavljivanje nekrotičnih tubulocita u lumenu počinje već u prvim minutima recirkulacije, a potom i u izuvijanom delu distalnih tubula. Nakon 60 minuta recirkulacije, uočljivo je postojanje hijalnih cilindara, a nakon 18 sati, posebno u težim oblicima ABI, u proksimalnim tubulima su prisutne ekstezivne nekroze, dok je lumen proksimalnih tubula i Henleove petlje ispunjen oljuštenim ćelijama (50). Ispunjavanje debljeg uzlaznog kraja lumena Henleove petlje i distalnih tubula dovodi do dilatacije istih, što predstavlja jedan od najočiglednijih histoloških znakova nastanka ABI.

1.2 Sistem renin – angiotenzin aldosteron i njegova uloga u bubrežnim mehanizmima

Renin-angiotenzin-aldosteron sistem (RAAS), predstavlja složeni koordinisani hormonski sistem koji ima dominantnu ulogu u kontroli kardiovaskularnih i bubrežnih funkcija. Ovu ulogu postiže regulacijom količine telesnih tečnosti i elektrolita, kao i arterijskog pritiska (51). Glavni efektorni peptid RAAS je Angiotenzin II (AngII) koji, vezivanjem za AT1 receptore, posreduje u nizu fizioloških reakcija kao što su vazokonstrikcija, otpuštanje aldosterona i vazopresina, retencija natrijuma i vode, kao i aktivacija simpatičkog nervnog sistema. U patološkim uslovima preterana sinteza ovog oktapeptida može dovesti do pojave hipertenzije, hemodinamskih poremećaja i razvoja srčanih oboljenja (51).

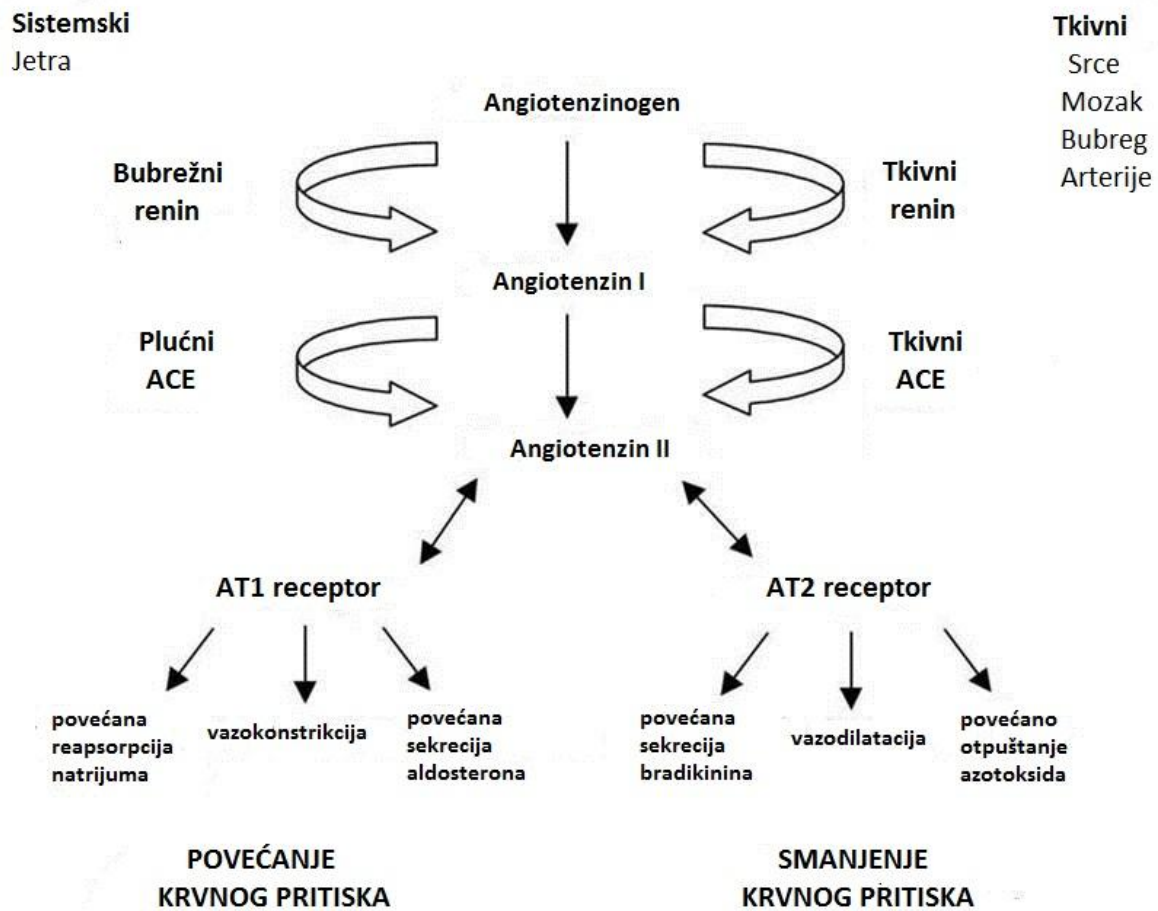
Renin-angiotenzin-aldosteron sistem je izazivao interesovanja naučnika još u 19. veku kada su Tigerstedt i Bergmann (52) pokazali da ekstrakt kore bubrega izaziva povećanje krvnog pritiska. Iako su još tada ova dvojica naučnika dali ekstraktu ime renin, tek prvi radovi Goldblatt-a i saradnika 1934. godine ukazali su na moguću fiziološku ulogu renina (53). Dalja istraživanja su pokazala da eksperimentalno suženje bubrežne arterije dovodi do hipertenzije, što je ukazalo na mogućnost da poremećaj bubrežne cirkulacije može da dovede do sekrecije neke vazopresorne supstance, i od tada opisan je čitav niz enzima, peptida i kofaktora koji zajedno čine ovaj sistem.

1.2.1 Osnovne komponente i fiziološka uloga sistema renin-angiotenzin-aldosteron

Osnovne komponente koje čine ovaj sistem su:

- 1) **angiotenziogen**, veliki globularni protein;
- 2) **renin**, enzim koji katalizuje proteolitičko pretvaranje angiotenzinogena u dekaeptid **angiotenzin I**;
- 3) **enzim konverzije angiotenzina (ACE- engl. angiotensine converting enzyme)**, karboksipeptidaza koja pretvara angiotenzin I u AngII
- 4) oktapeptid **angiotenzin II**, i

5) receptor za angiotenzin II, tipa 1 i tipa 2 (AT1 i AT2) (slika 2).



Slika 2 Osnovne komponente renin-angiotenzin-aldosteron sistema (54)

Veživanje AngII za njegove receptore uzrokuje vazokonstrikciju i oslobađanje aldosterona i kateholamina (55). Angiotenzinogen je glikoprotein (α_2 globulin) koji se sintetizira u jetri. Delovanje renina na angiotenzinogen direktno zavisi od njegove koncentracije u plazmi. Angiotenzinogen se takođe proizvodi i u nekoliko drugih organa, tako da je njegovo prisustvo detektovano u bubrežnoj limfi pacova i tubulocitama proksimalnih kanalića bubrega (56). Renin je proteolitički enzim koji se sintetizira, deponuje i luči skoro isključivo u bubrezima. Iako su enzimi slični reninu nađeni i u drugim organima, nema podataka da imaju bilo kakve sistemske efekte. U sintezi renina prvi korak predstavlja stvaranje prekursora preprorenina, koji se pretvara u prorenin, a on u aktivni renin. Sintaza i deponovanje renina se odvijaju u jukstaglomerularnim ćelijama bubrežnih aferentnih arteriola koje se nastavljaju na

debeli uzlazni deo Henleove petlje. Jukstaglomerularne ćelije predstavljaju modifikovane glatke mišićne ćelije, a tubulocite na koje naležu ćelije makule dense (engl.-macula densa cells). Ove ćelije zajedno sa jukstaglomerularnim ćelijama i ekstra glomerularnim mezengijalnim ćelijama čine jukstaglomerularni aparat (57).

1.2.2 Regulacija sekrecije renina

Sekreciju renina regulišu::

- 1) ćelije macule dense;
- 2) baroreceptorni mehanizam;
- 3) simpatički nervni sistem.

Vander je 1967. godine precizno pokazao da postoji obrnut odnos između koncentracije natrijuma u regionu macula dense (tzv. tubularno opterećenje natrijumom) i sekrecije renina (58). Ovu teoriju dokazali su Scott i Briggs 1987. godine na perfundovanim preparatima jukstaglomerularnog aparata (59).

Eksperimentalne studije su ukazale da sekrecija renina direktno zavisi od renalnog perfuzionog pritiska, što je dovelo do zaključka da jukstaglomerularne ćelije mogu delovati kao baroreceptori koji reaguju na promene vaskularnog volumena, pritiska, ili oba zajedno (58). Istraživanja druge grupe autora (60), pokazala su da je smanjenje perfuzionog pritiska u bubrezima odgovorno za povećanje sekrecije renina, što je regulisano mehanizmom negativne povratne sprege.

Simpatički nervni sistem ima važnu ulogu u kontroli sekrecije renina. Ovu tezu potvrđuju podaci koji govore da stimulacija bubrežnih nerava ili infuzija kateholamina povećavaju sekreciju renina (61). Jukstaglomerularne ćelije su inervisane kateholaminskim nervnim završecima. Slaba elektrostimulacija β -adrenoreceptora na jukstaglomerularnim ćelijama dovodi do povećanja sekrecije renina, dok stimulacija α -receptora na istim ćelijama dovodi do njene inhibicije. Elektrostimulacija α -receptora visokim intenzitetom nadražaja dovodi do indirektno stimulacije sekrecije renina preko aktivacije baroreceptora ili ćelija macule dense (57).

1.2.3 Fiziološka uloga sistema renin-angiotenzina-aldosteron

Primarna uloga RAAS u fiziološkim uslovima je regulacija krvnog pritiska i metabolizma soli i vode. Angiotenzin II može učestvovati direktno i indirektno u regulaciji arterijskog pritiska. Direktno izaziva vazokonstrikciju u mišićnim arteriolama nosiocima otpora, a indirektno preko sekrecije aldosterona i retencije vode, što povećava volumen telesnih tečnosti. U fiziološkim uslovima, direktan vazokonstriktorni efekat AngII nema većeg uticaja na održanje pritiska, ali u slučajevima deficita soli u organizmu, povećana količina AngII u cirkulaciji značajan je mehanizam za održavanje arterijskog pritiska (61). AngII je u fiziološkim uslovima glavni regulator biosinteze i sekrecije aldosterona, koji stimulise reapsorpciju natrijuma u distalnim tubulima i sabirnim kanalčićima nefrona (62). Aldosteron se vezuje za svoje receptore u citoplazmi tubulocita i kompleks u jedru se vezuje za promotore gena za kanale Na^+ , K^+ , $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-aze}$. To sve pospešuje reapsorpciju natrijuma (62, 63), a time i vode, što dovodi do povećanja volumena tečnosti u organizmu.

Koncentracija natrijuma i kalijuma u plazmi, adrenokortikotropnog hormona (ACTH), kao i AngII predstavljaju činioce koji direktno stimulise biosintezu i sekreciju aldosterona (64). AngII je glavni fiziološki regulator sekrecije aldosterona. Ovo je dokazano blokadom enzima konverzije angiotenzina, koja u potpunosti blokira sekreciju aldosterona, čak i u stanjima sa deficitom natrijuma u plazmi, gde bi trebalo da dođe do stimulisane produkcije aldosterona (65).

AngII ima i direktan uticaj na bubrežnu ekskreciju natrijuma. Povećane doze renina i AngII stimulise diurezu i natriurezu, dok fiziološke doze, primarno imaju antinatriuretsko i antidiuretsko dejstvo.

Biohemijska i morfološka istraživanja su pokazala važnost uloge RAAS u bubrezima (61). Pored mnogostrukih dejstava AngII u bubrežnoj fiziologiji, izdvajaju se dva najvažnija, a to su regulacija protoka krvi i glomerulske filtracije kroz bubrege. Angiotenzin II dovodi do snažnije konstrikcije eferentne nego aferentne arteriole, što rezultuje povećanjem glomeruskog filtracionog pritiska. Ovakvo dejstvo omogućava održavanje glomerulske filtracije i u uslovima pada protoka krvi kroz bubrege. Pored toga, AngII deluje nezavisno na filtracioni koeficijent utičući na kontrakciju i funkciju mezengijalnih ćelija koje regulišu veličinu filtracione površine. Delovanje AngII kao promotera rasta mezengijalnih ćelija može biti značajno u nekim slučajevima glomerulonefritisa (66). Takođe, AngII deluje kao promoter

ćelijskog rasta i deobe u bubrežima (67). Mnoga dejstva AngII modifikovana su delovanjem prostaglandina i atrijskog natriuretskog peptida (ANP), koji predstavlja endogeni inhibitor RAAS. Nesteroidni anti-inflamatorni lekovi, inhibitori sinteze prostaglandina uklanjaju modulatorno dejstvo prostaglandina na vazokonstrukciju uzrokovanu AngII (68).

1.2.4 Uloga sistema renin-angiotenzin-aldosteron u vaskularnim oboljenjima i bubrežnoj insuficijenciji

Savremenim tehnikama molekularne biologije ostvaren je veliki napredak u istraživanjima sistema renin-angiotenzin, kao i njegove uloge u hipertenziji, restenozi, srčanoj hipertrofiji i bubrežnim bolestima. Inhibitori enzima konverzije angiotenzina se u kliničkoj praksi odavno koriste kao antihipertenzivni lekovi, što ukazuje na ulogu RAAS u kontroli krvnog pritiska.

Primenom ACE inhibitora ispitivana je uloga RAAS u proliferaciji miointimalnog sloja krvnih sudova pacova nakon angioplastike. Primena cilazaprila i losartana je pokazala značajno poboljšanje strukture zida krvnog suda kod pacova, međutim, upotreba ACE inhibitora na primatima i u kliničkim studijama nije dovela do rezultata, tako da se pretpostavlja da je uloga RAAS u restenozi specifična za vrstu (60, 65). Istraživanja su pokazala da primena ACE inhibitora sprečava ili umanjuje hipertrofiju srca, što je ukazalo na moguću ulogu RAAS u patološkom rastu srčanih ćelija (69). Iako je jasno dokazana uloga RAAS u ovim procesima, a pre svega AngII, mehanizmi koji dovode do poboljšanja slike kardijalne hipertrofije još uvek su nedovoljno istraženi. Na nivou bubrega, AngII pokazuje različita dejstva. Osim kontrole renalne hemodinamike i transporta u tubulima, AngII deluje i kao faktor rasta i profibrogeni citokin, a neretko pokazuje i inflamatorna svojstva (70). Ovi efekti su često nezavisni od hemodinamskih promena, naročito u modelima hronične bubrežne insuficijencije, ali u *in vivo* uslovima teško je odvojiti ta dva uticaja. Uloga RAAS je nedvosmisleno potvrđena u malignoj hipertenziji, ali je patogeneza ABI u ovakvim okolnostima veoma nejasna (71). Iako bi inhibicija Ang II, kao jakog vazokonstriktora, trebalo da dovede do poboljšanja, mnogobrojne studije pokazuju da ACE inhibicija ne dovodi do poboljšanja kliničke slike kod pacijenata sa malignom hipertenzijom (72-75). Nekoliko autora je pokazalo da RAAS deluje na oštećenja bubrega izazvana ishemijom i reperfuzijom. Naime oni su ukazali na uvećanu aktivnost renina u plazmi u inicijalnoj fazi kliničke i

eksperimentalne forme ABI (9, 76). Kontogiannis i Burns su 1998. godine pokazali da blokada receptora za angiotenzin II ubrzava oporavak u ishemičnom bubregu (77).

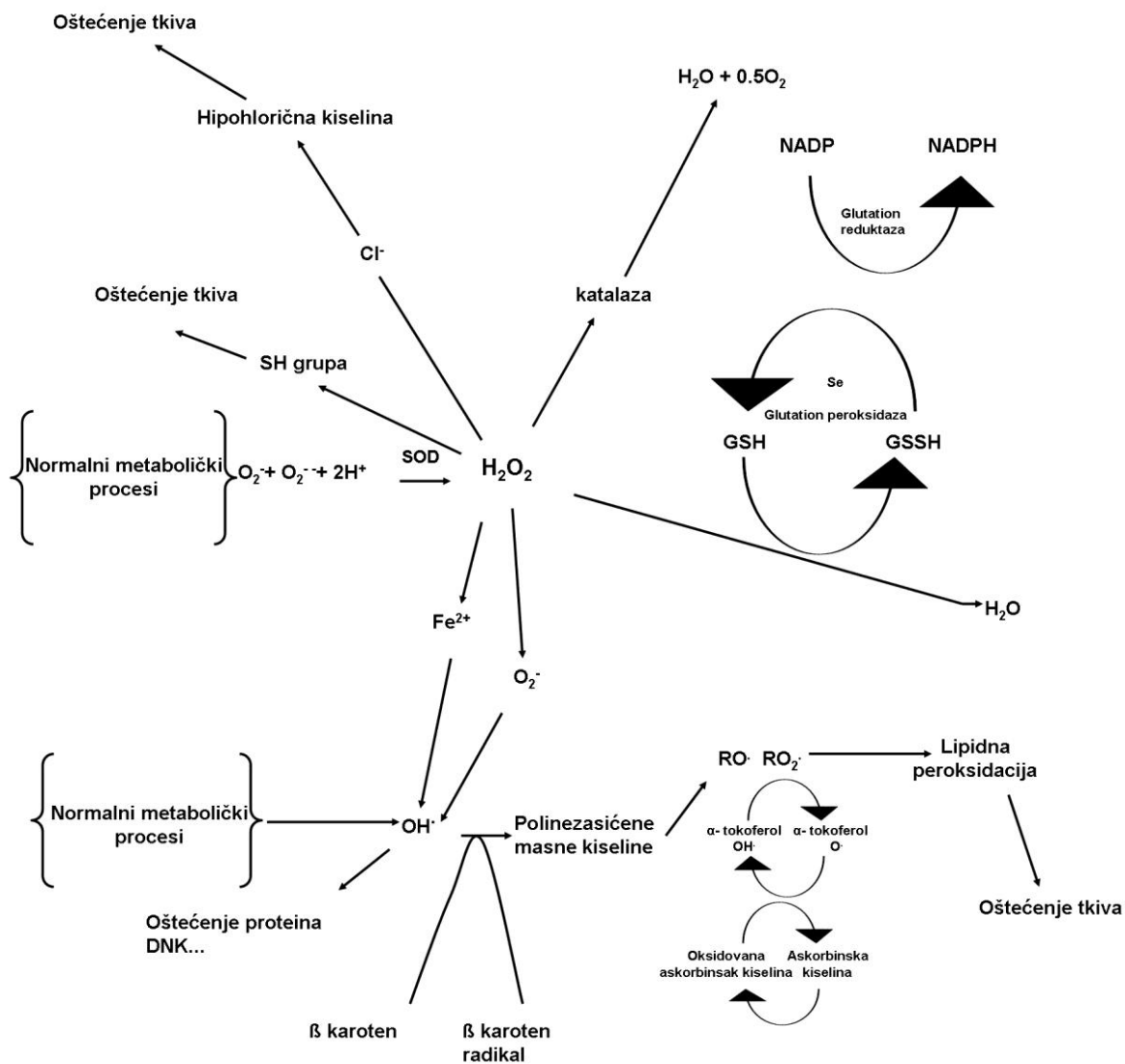
1.3 Reaktivne vrste kiseonika

Ljudski organizam koristi kiseonik da pretvara masti, ugljene hidrate i proteine u energiju, pri čemu može doći do neželjenih štetnih reakcija aktiviranih molekula kiseonika. Kiseonik je visoko reaktivan atom, koji može da postane deo potencijalno štetnih molekula koji se obično nazivaju reaktivne vrste kiseonika (RVK) ili „slobodni radikali“. Oni imaju sposobnost oštećenja zdravih ćelija, što dovodi do gubitka njihove strukture i funkcije. Reaktivne vrste kiseonika (engl. ROS - reactive oxygen species) je termin koji obuhvata sve visoko reaktivne molekule koji sadrže kiseonik.

Oštećenje ćelija prouzrokovano slobodnim radikalima predstavlja jedan od glavnih uzroka starenja i nastanka raznih degenerativih oboljenja, kao što su: kancer, kardiovaskularne bolesti, katarakta, oboljenja imunskog i nervnog sistema (78). Slobodni radikali uključeni su u patogenezu najmanje 50 različitih oboljenja (79, 80). Ipak, njihovo formiranje prirodno je kontrolisano jedinjenjima poznatim kao antioksidanti (slika 3). Nedostatak antioksidanata dovodi do akumulacije tkivnih oštećenja i slabljenja organizma.

Reaktivne vrste kiseonika su negativno naelektrisani molekuli, koji imaju nesparene elektrone koji teže da se spajaju sa elektronima drugih molekula da bi postali elektro neutralni. Tokom tog procesa formiraju se novi RVK koji ulaze zatim u proces lančanih reakcija kreirajući nove RVK. Ukoliko se novonastali RVK ne deaktiviraju, hiljade molekula može da nastane za samo nekoliko sekundi od prvobitne reakcije. Antioksidanti imaju sposobnost stabilizacije odnosno deaktivacije RVK pre nego što oni napadnu ćelije.

Tipovi RVK (tabela 1) uključuju hidroksilne i superoksidne radikale, vodonik peroksid, nitrooksične radikale, hipohlorične radikale i različite lipidne peroksidne radikale. Svi oni imaju sposobnost reakcije sa membranom lipida, nukleinskim kiselinama, proteinima i enzimima, i drugim malim molekulima, što rezultira ćelijskim oštećenjem (81).



Slika 3. Interakcija reaktivnih vrsta kiseonika i antioksidanata (82)

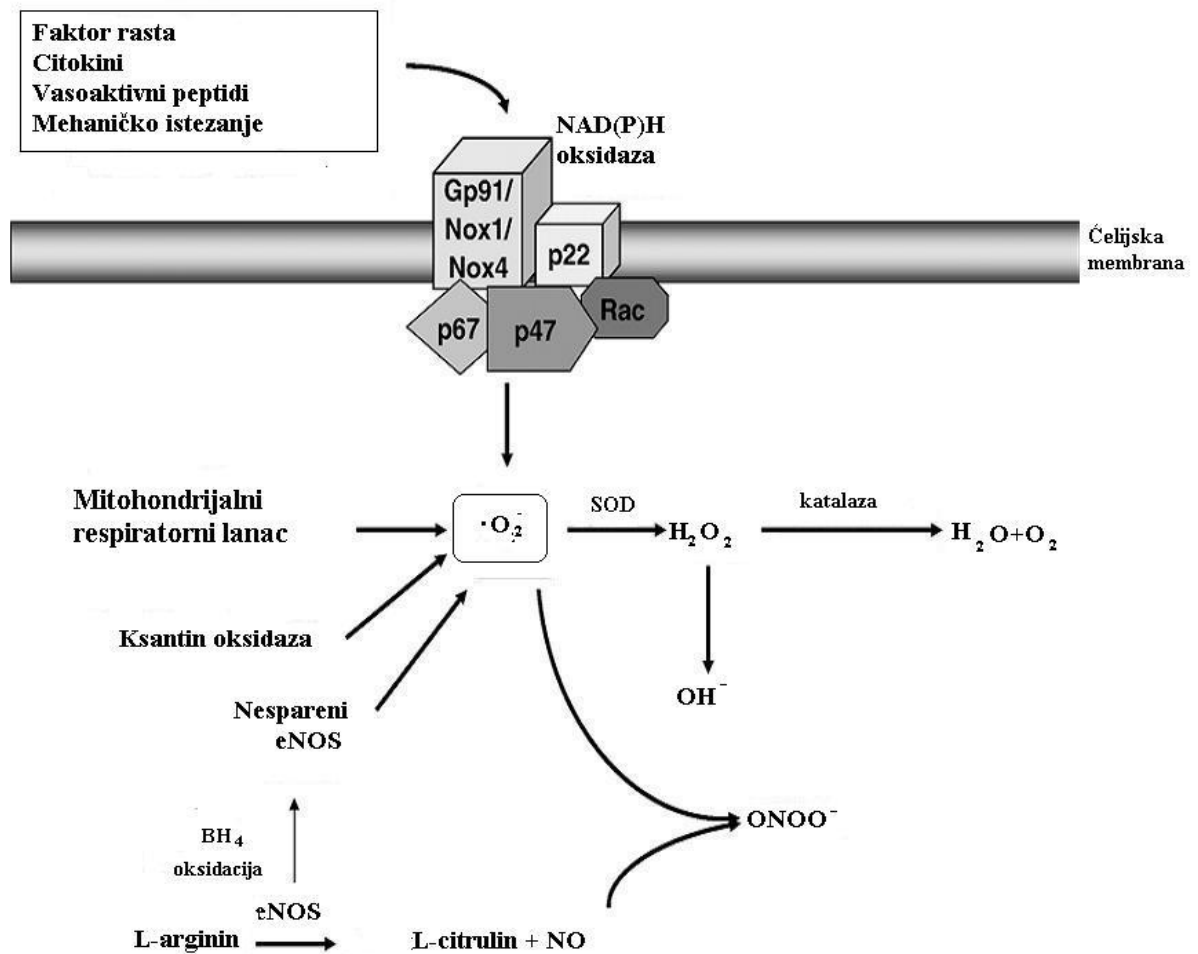
GSH-redukovani glutation; GSSG-oksidovani glutation; RO[·]-aloksi radikal; ROO[·]-peroksi radikal; SOD-suproksid dismutaza

Tabela 1. Reaktivne vrste kiseonika: 83, 84, 85

Oksidant	Opis
O_2^- , Superoksidni anjon	Ima jedan elektron manje od molekula kiseonika O_2 , formira se u brojnim autooksidativnim reakcijama i preko elektronskog transportnog lanca prevodi se preko SOD do H_2O_2 .
$\cdot OH$, Hidroksil radikal	Ekstremno reaktivan molekul, koji nastaje od H_2O_2 u Fentonovoj reakciji i u razgradnji peroksinitrita. Reaguje sa gotovo svim molekulima u ćeliji.
H_2O_2 , Hidrogen peroksid	Nastaje dismutacijom O_2^- ili direktnom redukcijom kiseonika. Liposolubiln je i lako difunduje kroz membrane.
$RO\cdot$, alkoksi radikal, $ROO\cdot$, peroksi radikal	Organski radikali sa kiseonikom koji zauzima centar molekula. Lipidne forme učestvuju u lipidnoj peroksidaciji.
$HOCl$, Hipohlorična kiselina	Formira se pomoću H_2O_2 u reakciji u kojoj učestvuje mieloperoksidaza. Visoko reaktivan i liposolubiln. Reaguje sa konstitutivnim proteinima, i to sa tiolnim i amino grupama, kao i sa metioninom.
$ROOH$, organski hidroperoksidi	Nastaju u reakciji slobodnih radikala sa komponentama kao što su lipidi i nukleotidne baze.
$ONOO^-$, peroksinitriti	Nastaju u reakciji $NO\cdot$ i O_2^- . Protonovana peroksinitritna kiselina u procesu razlaganja dovodi do formiranja hidroksil radikala i azotdioksida.

RVK nastaju na više načina. Većina oksidativnih produkata koje proizvodi ćelija javljaju se kao posledica:

- normalnog aerobnog metabolizma i fizioloških reakcija ćelija jer oko (Slika 4): 90% stvorenog kiseonika koristi mitohondrijalni sistem za transport elektrona
- dejstva fagocita prilikom odbrane organizma od virusa i bakterija
- detoksikacije organizma nakon trovanja različitim toksinima.



Slika 4 *Produkcija RVK. Velika količina reaktivnih vrsta kiseonika nastaje kao produkt reakcija brojnih enzima u organizmu kao što su: NAD(P)H oksidaza, ksantin oksidaza i azot monoksid sintaza (eNOS). Složena struktura pojedinih enzima kao što je npr. NAD(P)H oksidaza, dovodi do toga da brojni faktori, među kojima i vazoaktivne supstance, mogu uticati na generisanje reaktivnih vrsta kisonika. (86)*

SOD-superoksid dismutaza; BH₄-tetrahydrobiopterin; Gp91, Nox1, Nox4, p67, p47, p22, Rac-subjednice NAD(P)H oksidaze

Mnogobrojni faktori stresa, kao što su fizički napori koji ubrzavaju ćelijski metabolizam, hronična zapaljenja, infekcije, ishemija i druge bolesti, izlaganje alergenima,

drogama i toksinima poput duvanskog dima, zagađenjima, pesticidima i insekticidima, mogu da doprinesu disbalansu u odnosu stvaranja i uklanjanja RVK.

1.3.1 Antioksidativna zaštita

Da bi zaštitili ćelije i sisteme organa od RVK, čovečji organizmi poseduju visoko sofisticiran i kompleksan antioksidativni sistem zaštite. Taj sistem uključuje komponente endogenog i egzogenog porekla, koje funkcionišu interaktivno i sinergistički (87) :

- Prirodne antioksidante kao što su vitamin C, vitamin E, karotenoidi i druga jedinjenja niske molekulske mase, poput glutaciona i masnih kiselina.
- Antioksidativne enzime: superoksid dismutazu (SOD), glutation peroksidazu (GSH-Px), glutation reduktazu (GR), katalazu (CAT)...
- Metaloproteine poput feritina, laktoferina, albumina i cerulo plazmina koji vezuju slobodne jone gvožđa i bakra za dalje katalizovanje oksidativnih reakcija.
- Druge mnogobrojne antioksidante iz hrane biljnog porekla

1.3.2 Oksidativni stres u humanoј patologiji

Koliko god da je humani antioksidativni sistem kompleksan, nije uvek i dovoljno efikasan. Suštinski, oksidativni stres predstavlja prevagu pro-oksidativnih supstanci nastalih kao rezultat povećanja oksidativnog metabolizma, u odnosu na antioksidativne supstance u organizmu. Povećanje oksidativnog stresa na ćelijskom nivou može da bude posledica mnogih faktora, uključujući i konzumiranje alkohola, lekova, nastanak trauma, prehlade, infekcije, loše ishrane, toksina, radijacije ili napore fizičke aktivnosti. Zaštita od ovih štetnih procesa zavisi od adekvatnosti različitih antioksidantnih supstanci koje se izdvajaju direktno ili indirektno iz hrane. Neadekvatno uzimanje antioksidantnih sastojaka može da kompromituje antioksidantni potencijal, i na taj način poveća ukupni oksidativni stres.

Oksidativno oštećenje DNK, proteina i drugih makro molekula uključeno je u patogenezu širokog spektra bolesti, među kojima su najznačajnije srčane bolesti i kanceri (80). Sve više animalnih i epidemioloških studija, kao i radovi koji se bave kliničkim intervencijama,

sugerišu da antioksidanti mogu da igraju ključnu ulogu u prevenciji i usporavanju progresije, srčanih bolesti, i nekih vrsta kancera (88, 89).

1.3.3 Značaj oksidativnog balansa

Iako se mnoga dosadašnja istraživanja fokusiraju na potencijalnu efikasnost pojedinačnih antioksidantnih sastojaka, postalo je jasno da se najbolja zaštita od oksidativnog stresa postiže kombinovanjem različitih međusobno povezanih antioksidanata i antioksidantnih kofaktora (87). Studije su pokazale da smanjen unos antioksidanata kao što su vitamin C, vitamin E ili beta-karoten povećava rizik pojave kardiovaskularnih bolesti (81). Sa druge strane, pod određenim uslovima višak bilo kog tipa antioksidanta može da bude štetan po organizam (90). Ruano-Ravina i saradnici pokazali su 2006. godine da visoke doze beta-karotena povećavaju rizik nastanka kancera pluća kod pušača (91). Sa druge strane, postoje suprotna mišljenja o upotrebi vitamina E kod pacijenata sa Alchajmerovom bolešću (92, 93). Kontush i Schekatolina (2004. god) tvrde da tretman vitaminom E može usporiti razvoj Alchajmerove bolesti, tako što smanjuje oksidaciju lipoproteina cerebrosposinalne tečnosti i lipida mozga (92). Sa druge strane, Boothby i Doering (2005. god.) ne preporučuju upotrebu vitamin E ni kao primarnu, ni kao sekundarnu prevenciju kod Alchajmerove bolesti (93). Prasad je 2004. godine ukazao da oko 60% pacijenata obolelih od karcinoma koristi antioksidante kao dodatak ishrani tokom terapija zračenja, iako većina onkologa ne preporučuje upotrebu antioksidanata (94).

Treba imati u vidu da RVK, koje se u današnjim istraživanjima najčešće spominju kao uzročnici brojnih oboljenja imaju i bitnu ulogu u normalnom funkcionisanju organizma. U fiziološkim koncentracijama RVK su deo ključnih regulatornih molekularnih mehanizama, koji učestvuju u: imunskom odgovoru, ćelijskoj proliferaciji, inflamaciji, ćelijskoj adheziji, metaboličkim procesima, starenju i ćelijskoj smrti (95).

Iz svega navedenog, jasno je da narušavanje balansa antioksidativnih/prooksidativnih supstanci može dovesti do brojnih neželjenih efekata u organizmu. Takođe, prilikom primene antioksidativne terapije treba biti obazriv, jer njena efikasnost može da varira u zavisnosti od oboljenja, usled toga što u razvoju različitih oštećenja, učestvuju različiti tipovi RVK.

1.3.4 Reaktivne vrste kiseonika u hipertenziji

Jedna od ključnih karakteristika hipertenzije je povećanje perifernog vaskularnog otpora, usled smanjenja lumena rezistentnih krvnih sudova na periferiji tela (96). Kako je otpor suprotno proporcionalan prečniku suda na četvrti stepen, male promene prečnika značajno utiču na vaskularni otpor. Male arterije i arteriole koje određuju periferni otpor podležu strukturnim i funkcionalnim promenama u hipertenziji. Primeri ovih promena uključuju povećanje reaktivnosti na vazokonstriktorne supstance, smanjenje endotelne funkcije, rast vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, skladištenje komponenti ekstracelularnog matriksa i vaskularna zapaljenja (97).

Tokom prethodnih godina uloga RVK u kardiovaskularnom sistemu bila je predmet mnogih istraživanja. Porodica RVK obuhvata različite molekule koji imaju široko i različito dejstvo na funkciju ćelija. U okviru kardiovaskularnog sistema RVK utiču na ćelijski rast i diferencijaciju, modulaciju produkcije komponenti ekstracelularnog matriksa, inaktivaciju NO i stimulaciju mnogih kinaza (98). Mnogi od ovih efekata povezani su sa patološkim promenama u hipertenziji.

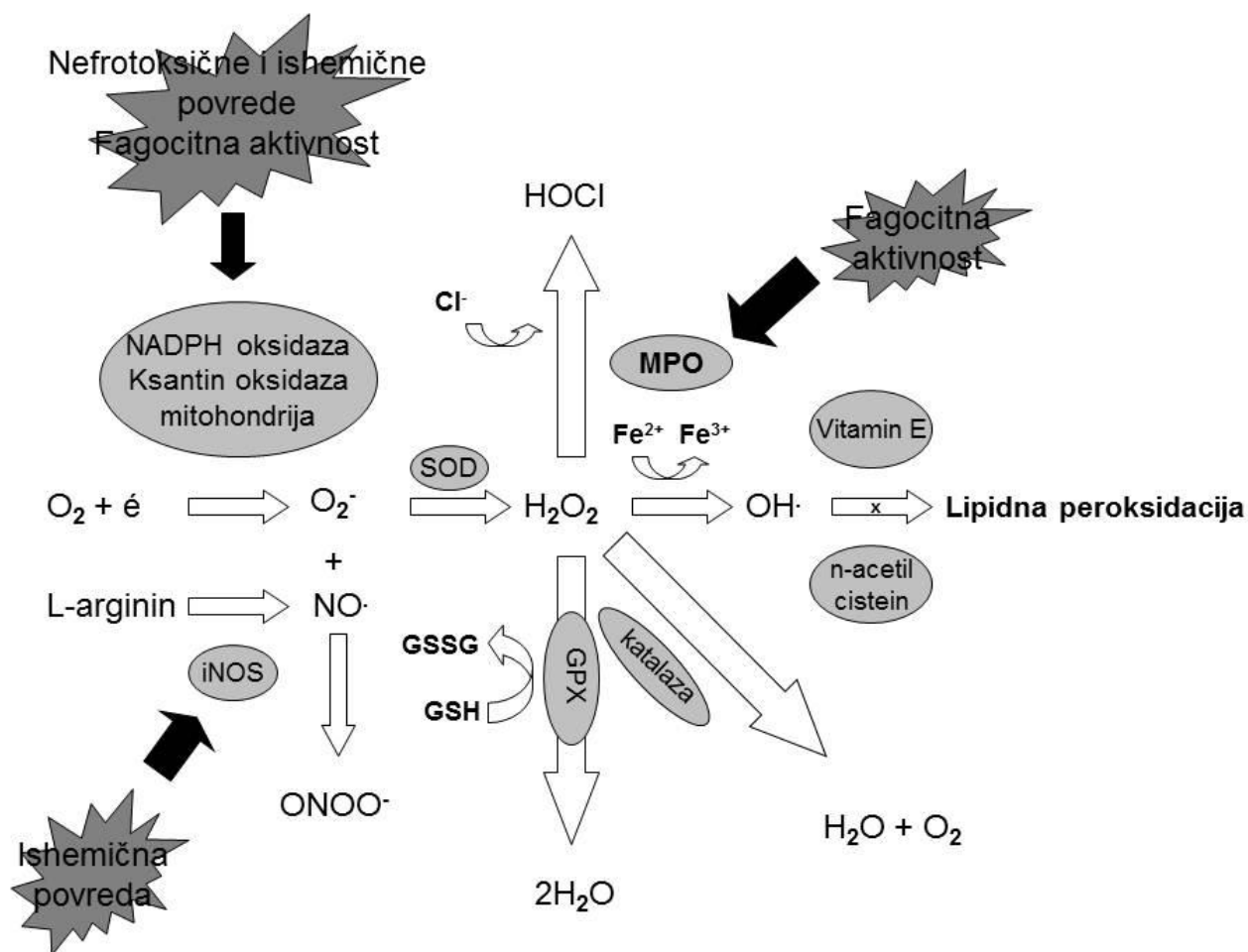
Stanje oksidativnog stresa u kardiovaskularnom sistemu uključuje hronično povećanje nivoa RVK, koje vodi kardiovaskularnim oboljenjima. Kod pacijenta sa hipertenzijom registrovan je povećan nivo RVK, i smanjena aktivnost antioksidantnih enzima u krvi i mononuklearnim leukocitima (99). Kod ovih pacijenta često se javlja slika povećanog oksidativnog oštećenja DNK, u poređenju sa osobama sa normalnim pritiskom (99). Mononuklearni leukociti izolovani iz hipertenzivnih pacijenata iskazuju povećanu produkciju O_2^- nakon stimulacije angiotenzinom II ili endotelinom-1, u poređenju sa stimulisanim ćelijama izolovanim iz normotenzivnih pacijenata (100). Takođe, pacijenti sa renovaskularnom hipertenzijom, koji imaju povećanu plazma-reninsku aktivnost i nivo AngII, pokazuju sklonost ka povećanju oksidativnog stresa, udruženu sa smanjenom endotel-zavisnom vazodilatacijom (101). Produkcija RVK u krvnim sudovima takođe je povećana u različitim eksperimentalnim modelima hipertenzije, kao što su hipertenzija indukovana AngII (102, 103), mineralokortikoidna hipertenzija (104) i renovaskularna hipertenzija (105, 106).

Iako sve reaktivne vrste kiseonika nastaju nakon redukcije molekularnog kiseonika, različite hemijske osobine individualnih RVK imaju važne uloge u ćelijskoj signalizaciji.

Superoksidani anjon i hidroksil radikal imaju relativno kratak poluživot. Hidroksil radikal je posebno reaktivan i stoga teško može delovati dalje od mesta gde je proizveden. Negativno naelektrisanje O_2^- čini ga nesposobnim da prolazi kroz ćelijske membrane, osim kroz jonske kanale. Nasuprot tome, H_2O_2 ima duži poluživot od O_2^- i $\cdot OH$, i sposoban je da prolazi kroz duple lipidne slojeve. Ove različite osobine ukazuju na to da su različite reaktivne vrste kisoika sposobne da aktiviraju različite signalne puteve, što može da dovede do suprotnih posledica. Odavno je poznato da povećanje nivoa O_2^- inaktivira vazodilatatorne molekule, dovodeći do endotelne disfunkcije i vazokonstrikcije, koja je važan patofiziološki faktor mnogih vaskularnih oboljenja, uključujući i hipertenziju (107). Sa druge strane, poznato je da se H_2O_2 ponaša kao vazodilatator u arterijama, kao što su cerebralna, koronarna i mezenterična (108, 109, 110). Iz ovih razloga, preuveličavanje uloge oksidativnog stresa, bez proučavanja individualnih RVK uključenih u ove procese, može dovesti do davanja pojednostavljene slike onoga što se dešava u *in vivo* uslovima.

1.3.5 ROS u ishemiji i reperfuziji

Reperfuziona oštećenja bubrežnog tkiva su povezana sa povećanom produkcijom RVK, što je potkrepljeno brojnim dokazima (slika 5). Tokom reperfuzije krvi u bubrege dolazi do povećane lipidne peroksidacije, koja je posledica reakcija RVK sa membranskim lipidima (39, 111). Sakupljači (engl.-Skavengers) RVK, poput SOD, glutationa i vitamina E, kao i nekih inhibitora RVK produkcije, pokazali su protektivan efekat tokom ishemičnih oštećenja (41, 112.). Takođe, izlaganje mikrozoma tubulocita, sistemima koji produkuju RVK, dovodi do njihovog oštećenja sličnog onom koje uzrokuju ishemične povrede (111, 113).



Slika 5. Dešavanja u organizmu prilikom ishemičnih povreda. Na slici su prikazani procesi nastanka i uklanjanja reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i potencijalni krajnji ishodi prilikom ishemičnih povreda. Preuzeto iz (114)

SOD-superoksid dismutaza; GSSG-oksidovani glutation; GSH-redukovani glutation;GPX-glutation peroksidaza; iNOS-inducibilna NO sintaza; MPO-mijeloperoksidaza

Brojni eksperimenti su pokazali da reaktivne vrste kiseonika mogu dovesti do ozbiljnih promena, kao što su lipidna peroksidacija, promena propustljivosti plazma membrane (115), promena enzimske aktivnosti i funkcije jonskih pumpi (111), kao i direktno oštećenje molekula DNK (116, 117). Takođe, Fliss je 1988. godine pokazao da direktna oksidacija membranskih proteina utiče na enzime Na^+K^+ ATP-azu i Ca^{2+} ATP-azu (118). Ipak, značaj RVK u ishemičnim oštećenjima bubrega ostaje nedovoljno razjašnjen usled neslaganja različitih autora o protektivnom uticaju antioksidanata na reperfuziona oštećenja bubrega (119, 120). Paller i saradnici su 1984. godine pokazali da egzogeno dodata SOD štiti ishemični bubrež od reperfuzionih oštećenja (39). Paller je nakon četiri godine pokazao da razni antioksidanti, uključujući i inhibitor ksantin oksidaze - alopurinol, pokazuju protektivan

efekat u postishemičnom bubregu pacova, miševa, pasa, zečeva i svinja (121). Međutim, u radovima drugih istraživača antioksidant alopurinol se pokazao neefikasnim u modelu akutne bubrežne insuficijencije kod pacova (122). Aminokiselina glutacion, koja se normalno nalazi u tubulocitama, u fiziološkim uslovima neutrališe RVK. Međutim, prilikom ishemije (123), nivo glutaciona opada i smanjuje se prag osetljivosti ćelija na oksidativni stres (124). Iako je dokazan protektivni efekat glutaciona, nejasno je da li nivo glutaciona opada usled njegovog trošenja u oksido redukcionim reakcijama ili zbog smanjenog stvaranja glicina, njegovog metabolitičkog prekursora, tokom ishemije i reperfuzije. Kao i u slučaju drugih sakupljača RVK, egzogeno davanje glutaciona u ishemično reperfuzionim oštećenjima je pokazalo dvojake rezultate (125, 126), što je otvorilo potrebu daljeg proučavanja mehanizama njihovog dejstva u ovim uslovima.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Budući da je ustanovljeno da sistem renin-angiotenzin-aldosteron i reaktivne vrste kiseonika učestvuju u regulaciji krvnog pritiska i bubrežne funkcije postavljeni su ciljevi da se ispita:

- Uticaj sistema renin-angiotenzin-aldosteron na sistemske hemodinamske parametre, hemodinamske parametre u karotidnoj i bubrežnoj arteriji, biohemijske parametre, kao i histološke promene na bubregu pacova sa urođenom hipertenzijom, kojima je izazvana ishemična akutna bubrežna insuficijencija. U tu svrhu korišćen je blokator AT1 receptora za angiotenzin II, losartan.
- Efekat sintetskog mimetika enzima superoksid dismutaze, tempola, na sistemske hemodinamske parametre, hemodinamske parametre u karotidnoj i bubrežnoj arterij,i biohemijske parametre, kao i i histološke promene na bubregu pacova sa urođenom hipertenzijom, kojima je izazvana ishemična akutna bubrežna insuficijencija, kako bi se ustanovilo da li stvaranje reaktivnih vrsta ima uticaja na pomenute parametre.

3 MATERIJAL I METODE

Za potrebe našeg eksperimenta koristili smo pacove sa urođenom hipertenzijom (engl.-SHR-Spontaneously hypertensive rat) odgajane u Institutu za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu. Ovi pacovi predstavljaju potomke pacova uzgajanih na Taconic Farme, Germantown, NY, USA (pacovi soja Okamoto-Aoki). Životinje su bile prosečne telesne mase od oko 300g, hranjene su standardnom hranom za laboratorijske životinje (Veterinarski zavod Subotica, Srbija) i imale su slobodan pristup vodi. Svi eksperimenti na životinjama su izvođeni u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja („Službeni glasnik RS“ br. 41/09) i lokalnim pravilnikom instituta o upotrebi i čuvanju eksperimentalnih životinja, uz odobrenje etičkog komiteta Instituta za medicinska istraživanja (br 0148.1/10)

3.1.1 Eksperimentalni protokol i model akutne bubrežne insuficijencije

Životinjama je utvrđivana hipertenzija indirektnim merenjem krvnog pritiska na uređaju Physiograp Four (Narco Bio Systems Inc. Houston, TX, USA). Nakon toga, životinje sa potvrđenom hipertenzijom su uključivane u eksperiment i deljene u četiri grupe:

- grupa lažno operisanih pacova (SHAM);
- grupa kojoj je indukovana akutna bubrežna insuficijencija (ABI);
- grupa životinja koje su dobijale infuziju losartana u toku i posle ABI (ABI+LOS);
- grupa životinja koje su dobijale infuziju tempola za vreme i posle ABI (ABI+TEMP);

Životinje su zatim anestetizirane primenom anestetika natrijum-pentobarbitala (Nembutal), koji je davan intraperitonealno u dozi od 35mg/kg telesne mase.

Pacovima je urađena laparatomija abdominalnom incizijom. Hirurškim putem uklonjen je desni bubreg, a leva bubrežna arterija je klemovana netraumatskom klemom, u trajanju od 40 minuta, čime je izazvana akutna bubrežna insuficijencija ishemičnog tipa.

Lažno operisanim životinjama je uređena identična hirurška priprema, ali bez klemovanja leve bubrežne arterije.

Životinjama je preparovana i pomoću polietilenskog katetra (PE–50, Clay-Adams Parsippany, NY, USA) kanulirana desna femoralna vena. Preko ovog katetra vršena je infuzija, koja je otpočinjala 5 min. pre uklanjanja netraumatske kleme i trajala narednih 175 min. Davane su sledeće supstance:

- **Losartan** (Antagonist angiotenzin II tip1 receptora), (Du Pont, Wilmington, DE, USA) 10mg/kg t.m., rastvoren u 4 ml fiziološkog rastvora
- **Tempol** (4-Hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-¹⁵N-oxyl) mimetik enzima superoksid dismutaze Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 40mg/kg/h t.m., rastvoren u 4 ml fiziološkog rastvora

Kontrolne grupe SHAM i ABI primale su infuziju 4 ml fiziološkog rastvora.

Odmah nakon završenog tretmana životinje su hirurški obrađene i smeštane pojedinačno u metaboličke kaveze, radi kolekcije 24 časovnog urina i određivanja diureze koja je izražavana u ml/24h/kg telesne mase.

3.1.2 Merenje hemodinamskih parametara 24 časa nakon reperfuzije

Nakon 24 časa provedenih u metaboličkom kavezu životinjama su rađena hemodinamska merenja. Životinje su ponovo anestetizirane, a zatim su im na isti način preparovane i pomoću polietilenskog katetra kanulirane leve femoralne arterije. Kateter iz leve femoralne arterije je, preko elektro-mehaničkog pretvarača, povezivan za uređaj Cardiomax III (Columbus Instruments, OH, USA). Životinje su ostavljane da se odmore od hirurških zahvata 20 minuta. Nakon toga registrovan im je srednji arterijski pritisak (SAP) i frekvencija srčanog rada (FS) na gore pomenutom uređaju.

Minutni volumen srca (MVS) je određivan termodilucionom metodom na uređaju Cardiomax III. Polietilenskim katetrom ispunjenim fiziološkim rastvorom sa heparinom, kanulirana je desna jugularna vena. Preparovana je leva karotidna arterija i u nju je ubacivan termo-senzor za merenje temperature tela, dok je drugi termo-senzor u posudi merio temperaturu hladnog fiziološkog rastvora, koji je ujedno korišćen i za infuziju preko jugularne vene. Oba senzora bila su povezivana sa Cardiomax III uređajem. Preko katetera u jugularnoj veni, naglo je ubrizgavan hladan fiziološki rastvor temperature od 7-10 °C, a vrednost

minutnog volumena srca (ml/min/kg) očitavana je pomoću odgovarajućeg programa. Ukupni periferni vaskularni otpor (UPO) izračunavan je iz vrednosti SAP i MVS prema formuli:

$$\text{SAP/MVS}=\text{UPO} \text{ (UPO izražen u mmHg min kg/ml)}$$

Za merenje protoka krvi kroz vaskularna korita, karotidna i leva bubrežna arterija su pažljivo preparovane. Ultrazvučna sonda unutrašnjeg dijametra od 1 mm (1RB) je stavljana oko arterija i povezivana sa registratorom protoka (Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA). Protok krvi je izražavan u ml/min/kg telesne mase. Vaskularni otpor kroz karotidnu i bubrežnu arteriju, izračunavan je deljenjem SAP u trenutku merenja protoka, sa odgovarajućim protokom kroz krvni sud. Vaskularni otpor izražavan je u mmHg min kg/ml.

3.1.3 Određivanje biohemijskih parametara

Posle završenih hemodinamskih merenja, iz račve abdominalne aorte uzimana je krv koja je potom korišćena za određivanje biohemijskih parametara. Kao antikoagulant korišćen je litijum heparin u koncentraciji 120 µg/ml krvi. Sakupljena krv centrifugirana je na 4000 obrtaja (ultracentrifuga Heraeus Megafuge 1.0 R) u trajanju od 20 minuta, nakon čega je odvajana plazma. Ovako dobijen uzorak plazme čuvan je na -20 °C do momenta analize. Istaloženi eritrociti su resuspendovani i još tri puta isprani fiziološkim rastvorom uz centrifugiranje u trajanju od 10 minuta na 2000 obrtaja po minuti, a zatim zamrzavani na -80 °C. Iz plazme dobijene na prethodno opisan način određivani su sledeći biohemijski parametri:

- Koncentracija kreatinina - Kreatinin Jaffe metodom pomoću komercijalnog kita (Creatinine Jaffe Gen.2; Roche Diagnostics, Germany);
- Koncentracija uree - spektrofotometrijskom metodom pomoću komercijalnog kita (UREA/BUN, UREAL; Roche Diagnostics, Germany)
- Koncentracija proteina - kolorimetrijskom analizom pomoću komercijalnog testa TP2 (Total Protein Gen.2; Roche Diagnostics, Germany)
- Koncentracija neorganskog fosfata - spektrofotometrijskom metodom pomoću komercijalnog kita PHOS2 (Phosphate (Inorganic) ver.2; Roche Diagnostics, Germany)
- Koncentracija holesterola - kolorimetrijskom analizom uz pomoć komercijalnog testa CHOL2 (Cholesterol Gen.2; Roche Diagnostics, Germany)

- Određivanje koncentracije HDL holesterola - kolorimetrijskom analizom uz pomoć komercijalnog testa HDLC3 (Cholesterol+ Gen.3; Roche)
- Koncentracija triglicerida - kolorimetrijom uz pomoć komercijalnog testa TRIGL (triglycerides; Roche Diagnostics, Germany)

Svi ovi biohemijski parametri očitavani su na automatskom analizatoru COBAS INTEGRA 400 plus (Hoffmann-La Roche, Germany).

Koncentracija LDL holesterola dobijana je preračunavanjem iz Friedewald-ove jednačine (127):

$$L \approx C - H - kT$$

H- HDL holesterol; C- ukupni holesterol; L- LDL holesterol; T- trigliceridi; k- konstanta vrednosti 0,2.

3.1.4 Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima

Od uzoraka eritrocita, mešanih u zapreminskom odnosu 1:3 sa hladnom vodom, pripreman je lizat koji je sledećih 30 minuta stajao na ledu. Za potrebe određivanja aktivnosti enzima prvo je iz lizata merena količina hemoglobina. Zatim u zavisnosti od analize, lizat je razblaživan, i u njemu određivana aktivnost enzima antioksidativne zaštite superoksid dismutaze (SOD), glutathion peroksidaze (GSH-Px), katalaze (CAT), glutathion reduktaze (GR).

3.1.4.1 Određivanje hemoglobina metodom Drabkina i Austina

Određivanje koncentracije hemoglobina (Hb) u lizatu krvi vršena je metodom Drabkina i Austina (128). Drapkinov reagens dobijan mešanjem 132mg $K_3Fe(CN)_6$ (Potassium ferricyanide(III), Sigma Chemicals), 130.4mg KCN (Potassium cianide, Fluka), 20ml 0.5 M fosfatnog pufera i vode do 100ml.

U 5 ml Drapkinovog reagensa dodavano je 20 μ l lizata krvi, mešano je na „vorteksu“ i nakon 15 min. u mraku merena apsorbansa na spektrofotometru (Ultrospec 3300 pro, Amersham, Biosciences) na talasnoj dužini 545 nm prema vodi kao nuli. Koncentracija hemoglobina [C] je računata prema sledećoj jednačini:

$$[C] = A545 \times 36.77$$

3.1.4.2 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određivana je indirektnom metodom, koja se zasniva na smanjenju brzine redukcije citohroma c (129). Prethodno dobijeni lizat eritrocita dodatno je razblaživan dodavanjem 1 ml etanola (Etil-alkohol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, Mr 46.068, Zorka Šabac) i 0.6 ml hloroforma (Chloroform, Mr 119.38, Hemica). Etanol i hloroform su dodavani hladni, uz neprestano mešanje na vorteksu. Zatim je lizat centrifugiran 15 minuta na 3000 RPM. Odvajan je supernatant u kome je određivana aktivnost enzima.

Reagensi korišćeni za određivanje aktivnosti SOD su Na_2CO_3 , (ICN Galenika), EDTA puffer pH 10.2 i adrenalin (epinephrine $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_3$, Mr 183.2, Sigma, Chemicals) rastvaran u 0.1 N HCl do podešavanja $\Delta A/\text{min}$ na 0.020-0.022. U staklenu kivetu sipan je karbonatni puffer, uzorak u količini da redukuje linearni deo krive autooksidacije adrenalina 30-40% i adrenalin u količini da $\Delta A/\text{min}$ tokom autooksidacije u linearnom delu bude 0.02-0.022. Radi određivanja aktivnosti SOD praćen je $\Delta A/\text{min}$ na 480 nm, do završetka linearnosti krive. Aktivnost SOD izražavana je u jedinicama SOD aktivnosti po gramu hemoglobina (U/gHb, specifična aktivnost). Izračunavanje aktivnosti je vršeno po sledećoj jednačini:

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

ΔK - promena apsorbance slepe probe

ΔA - promena apsorbance uzorka

Hb - količina hemoglobina (g/100 ml)

V - zapremina uzorka sipana u reakcionu smešu (ml)

R - razblaženje

3.1.4.3 Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost CAT u lizatu krvi određivana je po metodi Beutlera (130). Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje vodonik peroksida u prisustvu CAT na 230 nm. Na toj talasnoj dužini vodonik peroksid apsorbuje svetlost. Određivanje aktivnosti CAT

vršeno je u TRIS, EDTA puferu pH 8.0 (TRIS {hidroksymethyl} aminomethane C₄H₁₁NO₃ Mr 121.1 Sigma Chemicals; EDTA). Rastvor vodonik-peroksida pravljen je od 30% vodenog rastvora H₂O₂ (vodonik peroksid, H₂O₂, Mr 34.01, Hemos) tako da je apsorbance od 230 nm podešavana na vrednost 0.860

Određivanje koncentracije vodonik peroksida vršeno je na sledeći način: u kvarcnu kivetu naliveno je 50 µl pufera, uzorak u količini da ΔA/min bude 0.03-0.06 i 1 ml rastvora H₂O₂. Na spektrofotometru je praćena promena apsorbance svakih 30 sec, tokom 3 minuta na 230 nm. Koncentracija vodonik peroksida izračunavana je na osnovu ekstinkcionog koeficijenta, koji za H₂O₂ na 230 nm iznosi 0.071, po formuli:

$$CAT=100 \times R \times \Delta A / Hb \times V \times 0.071$$

ΔA - promena absorbance u minuti,

R – razblaženje,

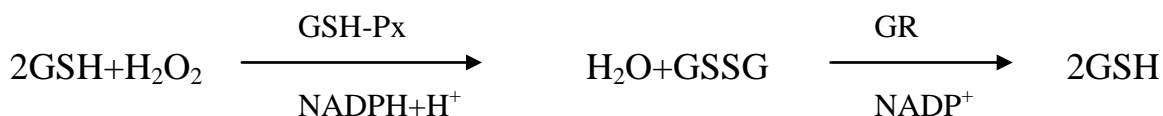
V - zapremina uzorka koji je sipan u reakcionu smešu (ml),

Hb - količina hemoglobina (g/ 100 ml).

Jedinice µmol H₂O₂ /min/gHb

3.1.4.4 Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px)

Aktivnost GSH-Px peroksidaze određivana je po metodi Paglia i Valentine (131). Metoda se zasniva na sledećoj reakciji:



Ovom metodom je praćena potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH uz GR na 340 nm. Ova indirektna metoda koja meri promenu proizvoda reakcije pokazala se veoma produktivnom u poređenju s drugim metodama određivanja GSH-Px aktivnosti. Neophodni rastvori potrebni za ovu reakciju su: 0.5 M Fosfatni pufer pH 7.0; 0.2mM NADPH u 1% NaHCO₃; 1mM GSH (L-Glutathione reduced; Sigma, Chemicals); 0.03M t-butilhidroperoksid (tert-Butyl hydroperoxide solution, (CH₃)₃COOH, Mr 90.12 Sigma, Chemicals); Drapkinov

reagens; GR glutation reduktaza (Glutathione Reductase from baker's yeast (*S. cerevisiae*) Sigma, Chemicals) (TYPE II) spec. akt. 105 IU/mg proteina.

U staklenu kivetu naliveno je 1.6 ml vode, 0.3 ml rastvora GSH, 0.6 ml rastvora NADPH, 0.3ml fosfatnog pufera, 0.1 ml t-butilhidroperoksida, 50 μ l Drapkinovog reagensa i oko 50 μ l uzorka. Reakcija je otpočinjana dodavanjem 5 μ l GR, uporedo su rađeni kontrolni uzorci u kojima su sipani svi reagensi osim uzorka, na temperaturi 37°C.

U trajanju od 150 sekundi apsorpcija je očitavana na 340 nm. Aktivnost GSH-Px izračunava se na sledeći način:

$$\text{GSH-Px} = (\Delta A - \Delta B) \times 1000 / 6.22 \times 0.835 \times \text{Hb}$$

ΔA - promena apsorbance/min za uzorak,

ΔB - promena apsorbance/min za blank,

Hb - količina hemoglobina (g/ 100 ml)

6.22-molarna ekstincija

1/0.833-koeficijent

Aktivnost je izražavana u μ mol NADPH/min/g Hb

3.1.4.5 Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)

Određivanje aktivnosti GR rađeno je po metodi Glatzle i saradnika iz 1974. godine (132). Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim prevodi oksidovani u redukovani glutation.



Reagensi potrebni za ovu reakciju bili su 0.5M fosfatni puffer pH 7.4; 0.5mM EDTA; 2mM GSSG (L-Glutathione oxidized; Sigma, Chemicals); 0.1mM NADPH. U spektrofotometrijsku kivetu sipano je 0.6 ml fosfatnog pufera, 0.1 ml GSSG, 0.1 ml uzorka i vode do 3 ml. Reakcija je otpočinjana dodavanjem 0.1 ml NADPH, na optimalnoj temperaturi od 37 °C. Praćena je promena apsorbance u toku 3 minuta, na 340 nm, a aktivnost izračunavana pomoću jednačine:

$$GR = (\Delta A - \Delta B) \times 3 \times 10^5 / 6.22 \times V \times Hb$$

ΔA - promena absorbance/minutu u uzorku

ΔB - promena absorbance/minutu u kontrolnom uzorku,

V- zapremina uzorka (ml),

Hb - količina hemoglobina (g/ 100 ml)

6.22 - molarna ekstincija

Aktivnost je izražena u $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{g Hb}$

3.1.5 Određivanje stepena lipidne peroksidacije

Za određivanje stepena lipidne peroksidacije merena je koncentracija reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (Thiobarbituric acid reactive substances; TBARS) u plazmi. TBARS je određivana po metodi Ohkawa i saradnika iz 1979. godine (133)

Uzorcima plazme kojima je dodavana TCA (tri-hlor-sirćetna kiselina, Zorka Šabac) u odnosu 1:2, inkubirani su na ledu 10 minuta, a zatim centrifugirani 4 minuta na 15 000 RPM. Nakon dodavanja TBA (tiobarbiturna kiselina Merck Mw 144.15g) u odnosu 1:4, uzorci su mućkani i inkubirani 15 minuta na 100°C u vodenom kupatilu.

Absorbanca je merena na 530 nm, u odnosu na blank (za blank je korišćena voda).

$$C \mu\text{mol}/\text{ml} = 0.012 * 5 * 1000 (A-B)$$

A-apsorbanca uzorka; B- apsorbanca blanka

3.1.6 Histopatološke studije

Za određivanje anatomsko-patoloških promena korišćena je svetlosna mikroskopija. Analiza promena nastalih nakon razvoja ABI praćena je na levom bubregu pacova. Nakon odstranjivanja levi bubreg je potapan u 10% rastvora formalina, dehidriran u seriji alkohola, kalupljen u parafinskom bloku i sečen na mikrotomu, time su dobijeni preseći debljine 5 μm , koji su zatim bojeni po PAS metodi (engl.-Periodic Acid-Schiff reaction). PAS metoda bojenja služi detekciji polisaharida, kao što je glikogen, ali i glikoproteina i gliko lipida u

tkivima. Usled ishemičnog oštećenja dolazi do ljuštenja epitelnih ćelija tubula unutar lumena, koje u sabirnim kanalićima bubrega formiraju cilindre obojene izrazito ružičastom bojom (PAS pozitivni cilindri).

Promene na tubulima bubrega su bodovane po sledećem principu: 0 = normalne tubulocite, + = gubitak luminalne membrane ili četkastog pokrova, ++ = bubrenje i prisustvo vakuala sa transformisanim sadržajem u citoplazmi tubulocita, +++ = odvajanje ćelije od bazalne membrane i ++++ = kao kod +++ sa ogoljenom bazalnom membranom.

Opsežnost promena kao što su nakupljanje eritrocita u glomerulima, peritubularnim kapilarima i međurenalnim venama, ocenjivano je na skali od + do +++ po Mandalovoj klasifikaciji (134). Dilatacija tubula, prisustvo cilindra, infiltracija mononuklearnim leukocitima i edem intersticijuma ocenjivani su kao 1, a odsustvo sa 0. Skup svih ovih promena predstavljao je histopatološki zbir koji je poređen između grupa.

3.1.7 Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazivani kao srednja vrednost sa standardnom greškom srednje vrednosti. Vrednost $p < 0.05$ smatrana je značajnom. Za obradu rezultata korišćen je jednostrani Studentov t-test za dva uzorka jednake varijanse (Microsoft Exel 2010). Ovim testom vršeno je poređenje između SHAM i ABI i sa druge strane tretiranih grupa u odnosu ABI.

4 REZULTATI

Parametri prikazani u tabelama i grafikonima su određivani 24 časa nakon izazivanja ABI.

4.1.1 Hemodinamski parametri

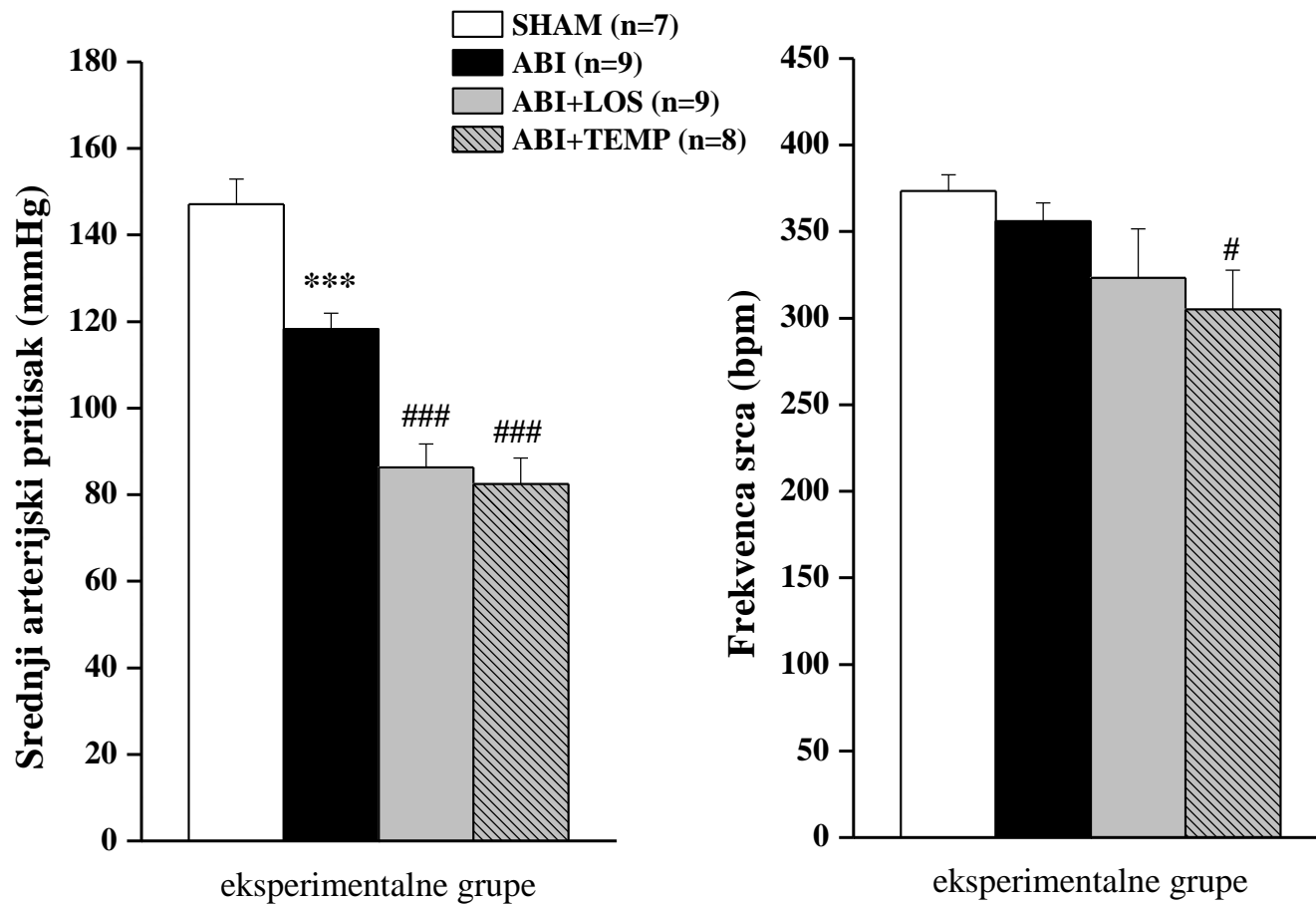
Hemodinamski parametri srednji arterijski pritisak (SAP), frekvencija rada srca (FS), minutni volumen srca (MVS), ukupni periferni otpor (UPO), protok krvi kroz karotidne arterije (KPK) otpor protoku krvi kroz karotidne arterije (KVO), protok krvi kroz bubrežne arterije (BPK) i otpor protoku krvi kroz bubrežne arterije (BVO) mereni su 24h nakon izazivanja ABI.

Na slici 6. prikazan je uticaj blokatora AT1 receptora za AngII i SOD mimetika na SAP i FS kod pacova sa ABI. Kako se na slici može videti, SAP je bio značajno snižen kod grupe sa ABI u odnosu na lažno operisane životinje (ABI vs. SHAM $p < 0.001$), kao i kod obe tretirane grupe u odnosu na grupu sa ABI (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.001$; ABI+TEMP, vs. ABI, $p < 0.001$). FS bila je značajno snižena samo kod pacova tretiranih tempolom u poređenju sa grupom kod kojih je izazvana ABI (ABI+TEM vs. ABI, $p < 0,05$).

U poređenju sa grupom pacova kod kojih je izazvana ABI, kod grupe tretirane tempolom postoji statistički značajno povećanje u minutnom volumenu srca (ABI+TEMP vs. ABI, $p < 0.05$). UPO je statistički značajno smanjen kod grupe tretirane tempolom u odnosu na grupu sa ABI (ABI+TEMP, vs. ABI, $p < 0.05$). (slika 7).

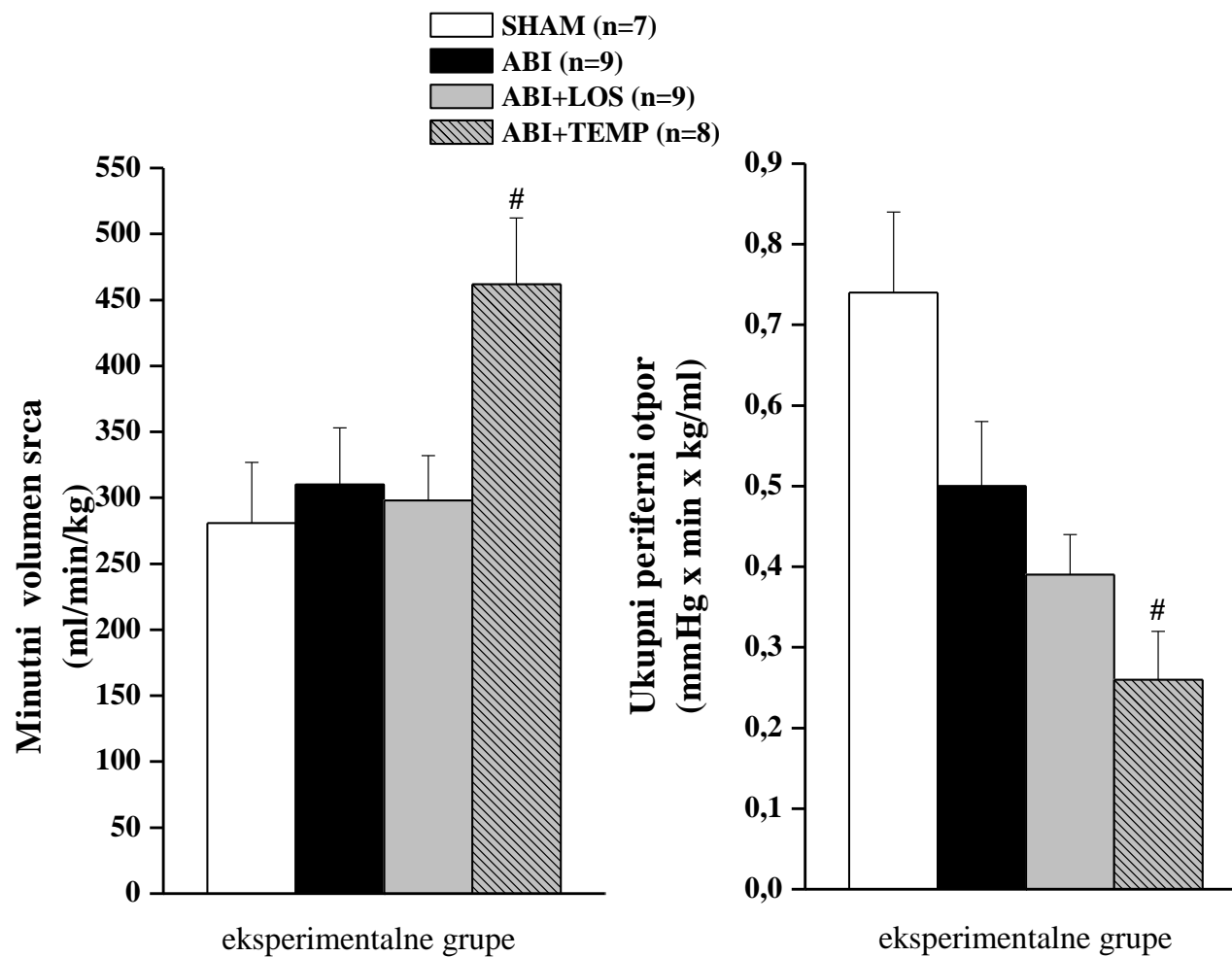
Iako nije ustanovljena statistički značajna promena u KPK između eksperimentalnih grupa, na slici 8. prikazano je da je KVO bio značajno niži kod grupe sa ABI u poređenju sa lažno operisanim životinjama (ABI vs. SHAM, $p < 0.05$).

Kao što je bilo očekivano indukcija ABI značajno je povećala otpor (ABI vs. SHAM, $p < 0.01$) i smanjila protok krvi kroz bubrežne arterije u poređenju sa lažno operisanim životinjama (ABI vs. SHAM $p < 0.01$). Tretman losartanom značajno je povećao BPK u odnosu na grupu sa ABI (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.01$). Tretman losartanom, kao i tempolom, doveo je do značajnog sniženja BVO u odnosu na grupu sa ABI (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.001$; ABI+TEMP vs. ABI, $p < 0.05$) (slika 9).



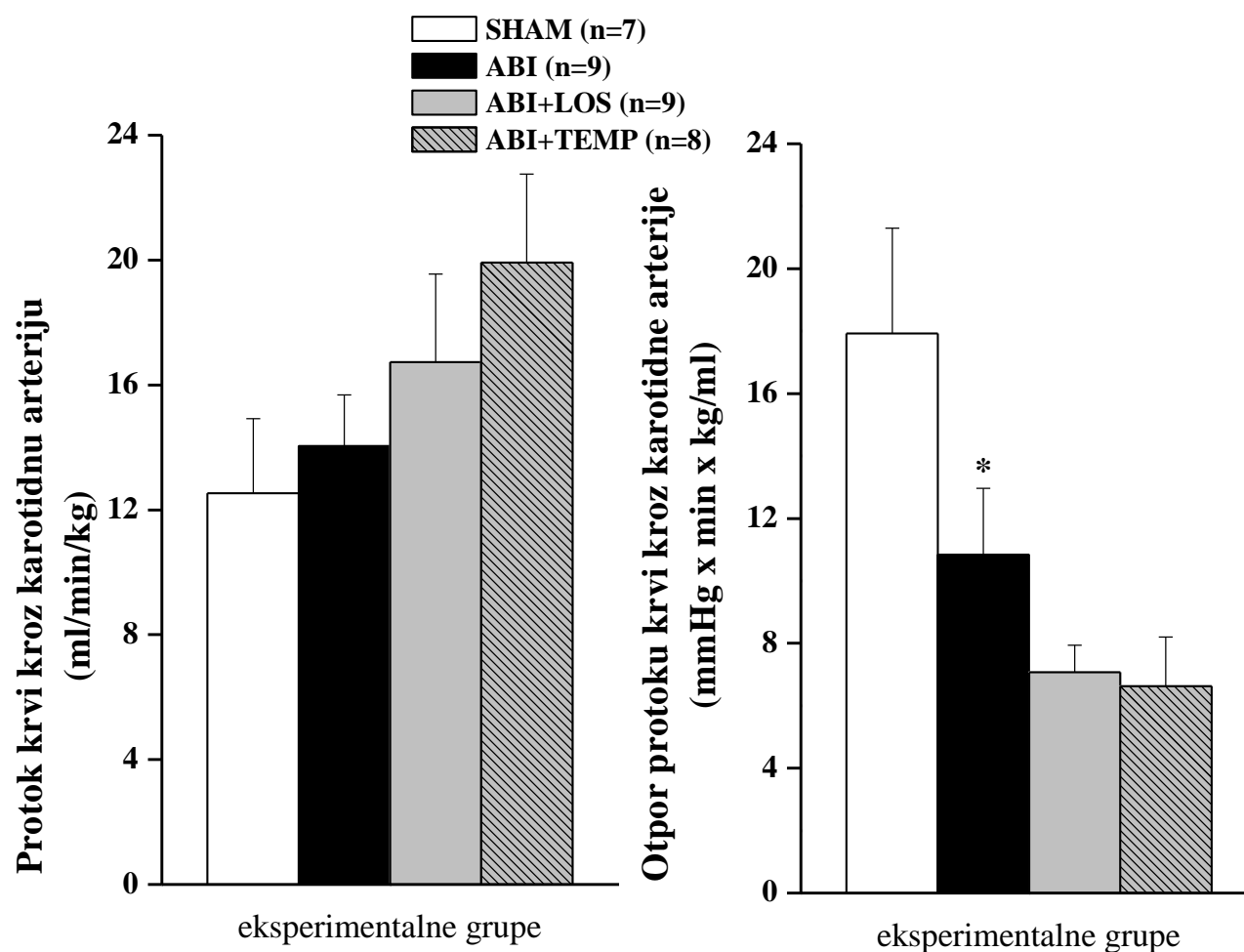
Slika 6. Srednji arterijski pritisak i frekvencu rada srca kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hiperenzijom 24 časa nakon reperfuzije.

*** $p < 0.001$ prema SHAM; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ prema ABI.



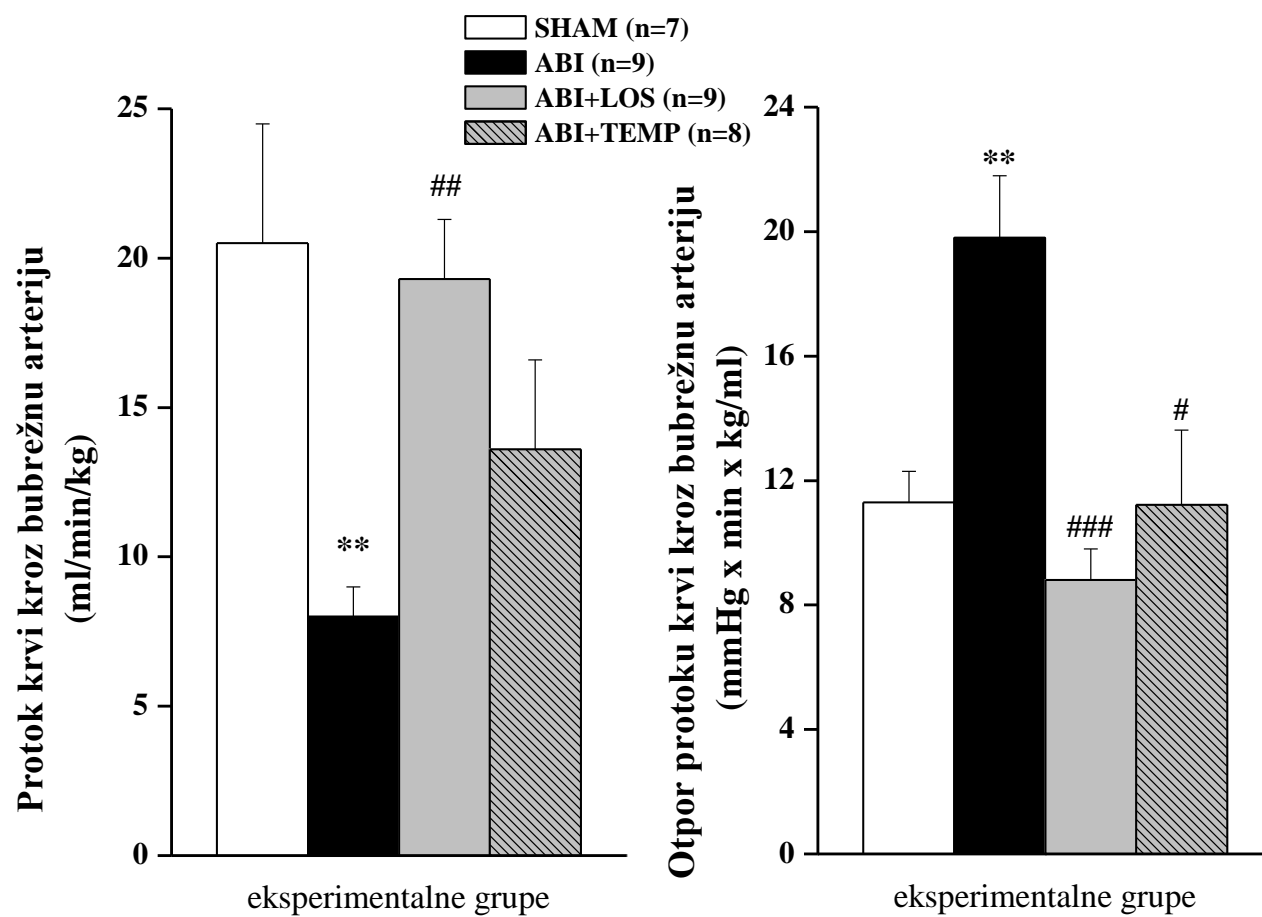
Slika 7. Minutni volumen srca i ukupni periferni otpor kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hiperenzijom 24 časa nakon reperfuzije.

[#] $p < 0.05$ prema ABI



Slika 8 Protok krvi kroz karotidnu arteriju i otpor protoku krvi kroz karotidnu arteriju kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hipertenzijom 24 časa nakon reperfuzije.

* $p < 0.05$ prema SHAM



Slika 9. Protok krvi kroz bubrežnu arteriju i otpor protoku krvi kroz bubrežnu arteriju kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hipertenzijom 24 časa nakon reperfuzije

** $p < 0.01$ prema SHAM; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ prema ABI.

4.1.2 Biohemijski parametri

U sledećoj seriji analiza mereni su biohemijski parametri. U plazmi su mereni kreatinin (PCr), urea (PUr), ukupni proteini (PTp), neorganski fosfati (PPhos), trigliceridi (Trig), ukupni holesterol (Chol), HDL holesterol (HDL) i LDL holesterol (LDL), a kolekcijom urina u toku 24h nakon izazivanja ishemije određivali smo diurezu.

Na slici 10. su prikazane promene biohemijskih pokazatelja bubrežne funkcije kreatina, uree i fosfata u plazmi. Kod grupe kod koje je izazivana ABI dolazilo je do značajnog skoka kreatinina u plazmi u odnosu na lažno operisane životinje (ABI vs. SHAM $p < 0.001$). Tretman losartanom statistički značajno je smanjio nivo PCr (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.001$), dok tretman tempolom nije menjao ovaj parametar u poređenju sa životinjama sa ABI.

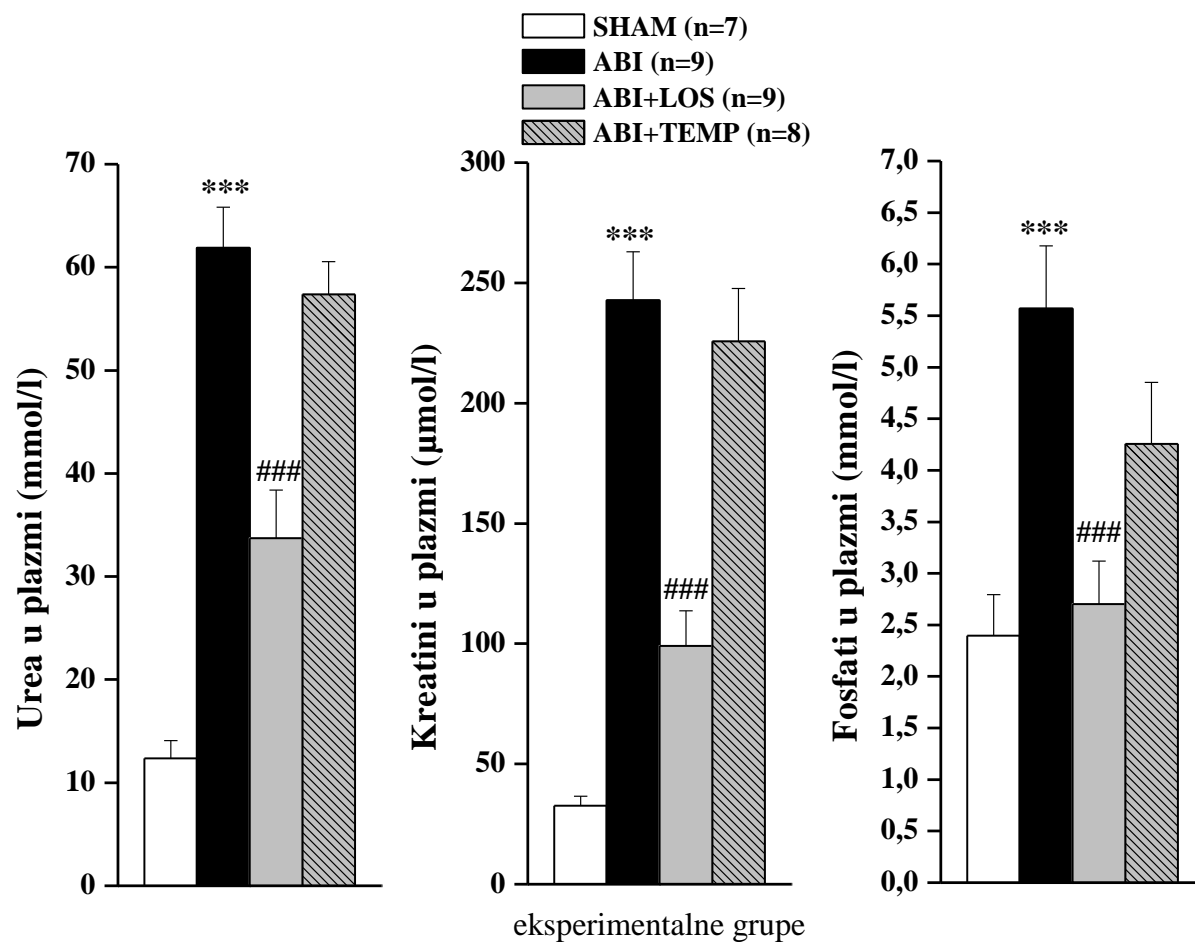
Na sličan način došlo je i do promene sledećeg ispitivanog parametra, koncentracije uree u plazmi. ABI je dovela do značajnog povećanja uree u plazmi (PUr) u odnosu na lažno operisane životinje (ABI vs. SHAM $p < 0.001$). Tretman losartanom značajno snižava Pu u odnosu na grupu sa ABI (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.001$).

Izazivanje ABI dovelo je do značajne hiperfosfatemije u odnosu na lažno operisane životinje (ABI vs. SHAM $p < 0.001$). Tretman losartanom vratio je koncentraciju Pphos na nivo zabeležen kod lažno operisanih životinja, i značajno snizio Pphos u odnosu na grupu sa ABI (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.001$). Međutim, nakon tretmana tempolom ovaj parametar ostao je povišen i sličnih vrednosti kao kod grupe sa indukovanom ABI.

Lipidni status, prikazan na slikama 11. i 12., nije ukazao na promene u nivou ukupnog holesterola, HDL holesterola i triglicerida između eksperimentalnih grupa, međutim LDL holesterol je bio povećan kod SHR sa ABI u poređenju sa grupom lažno operisanih životinja (ABI vs. SHAM $p < 0.05$). Tretman losartanom je doveo jedino do značajnog povećanja HDL holesterola u plazmi u odnosu na pacove kojima je indukovana ABI (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.05$).

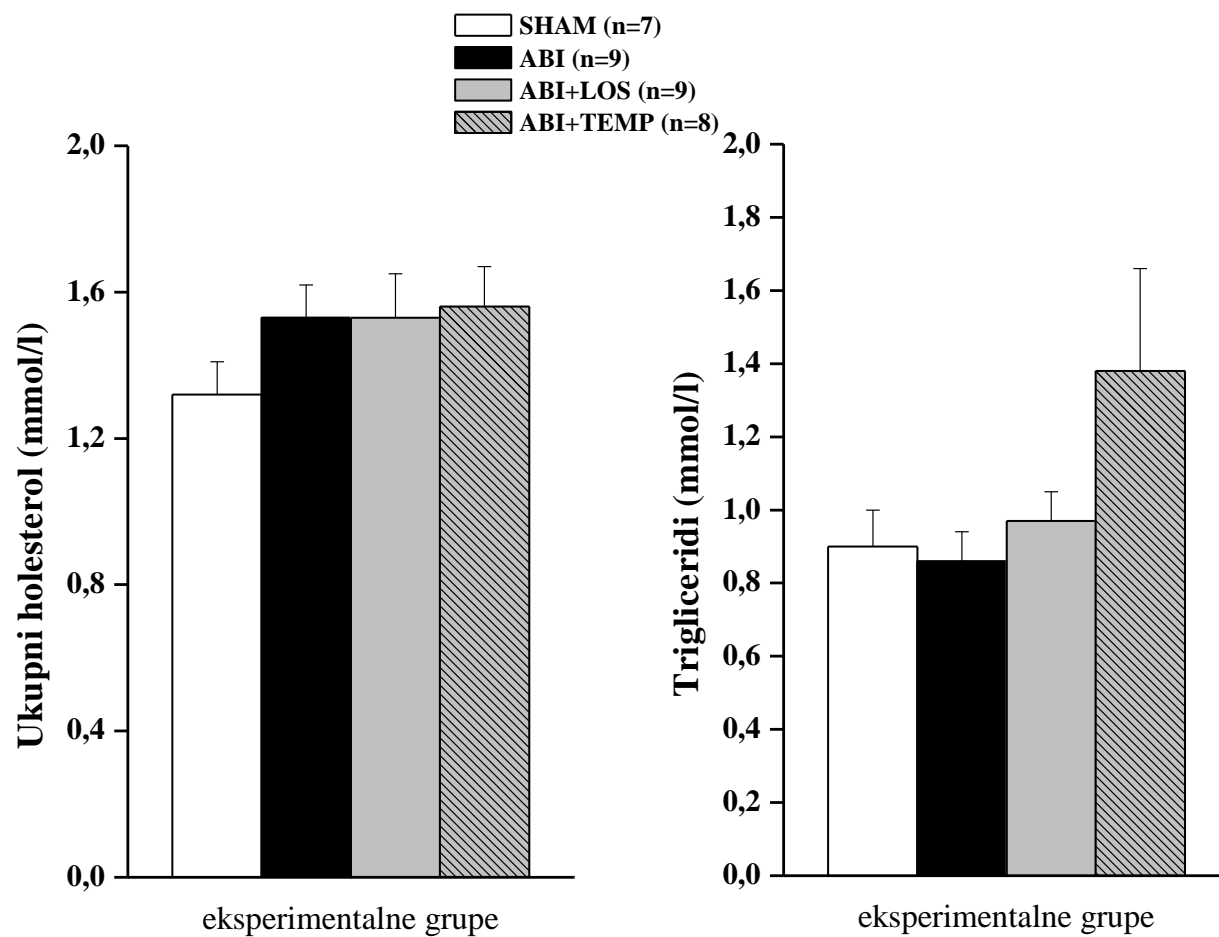
Koncentracija proteina u krvi nije se menjala nakon indukcije ABI, ali nakon tretmana losartanom PTP je bio značajno uvećan u odnosu na grupu sa ABI (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.01$) (slika 13.)

Nije postojala značajna razlika u diurezi u poređenju između eksperimentalnih grupa (slika 13.).

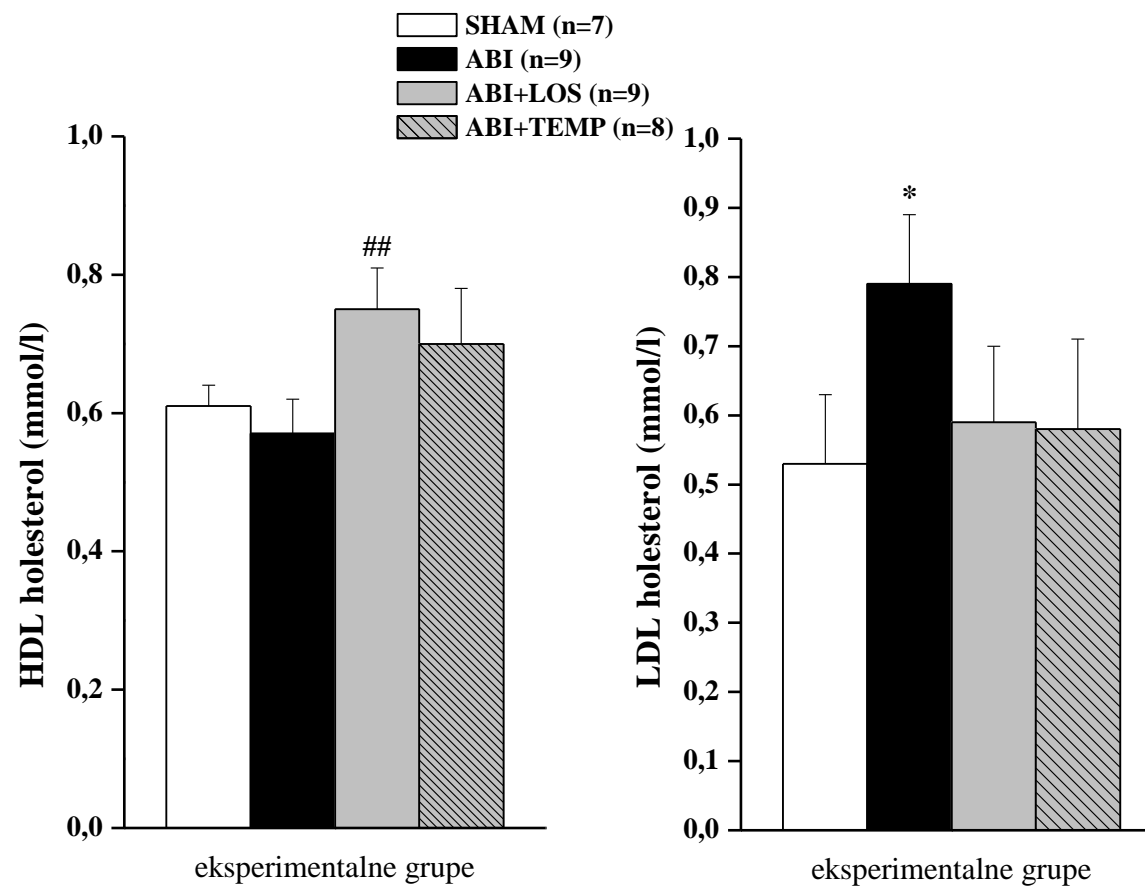


Slika 10. Koncentracije kreatinina, uree i neorganskog fosfata u plazmi kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hipertenzijom 24 časa nakon reperfuzije.

*** $p < 0.001$ prema SHAM; ### $p < 0.001$ prema ABI

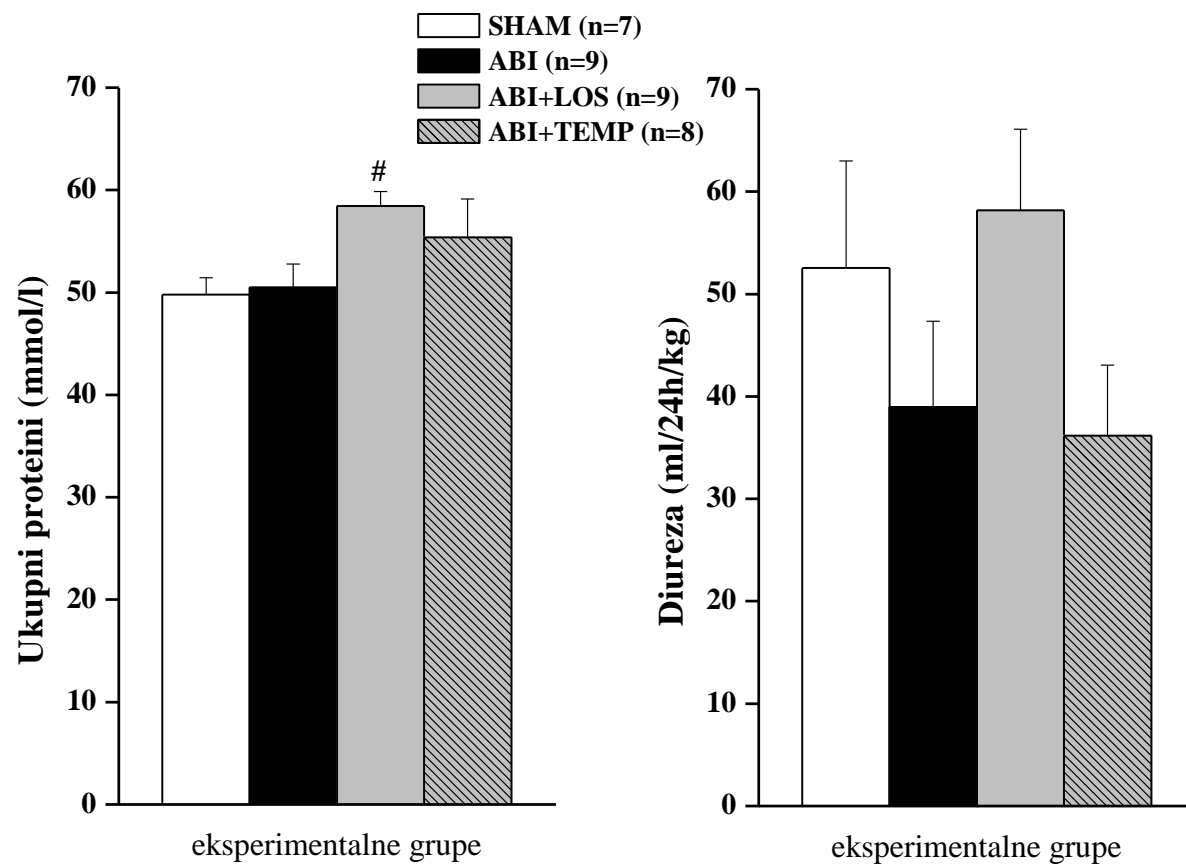


Slika 11. *Koncentracije ukupnog holesterola i triglicerida u plazmi kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hipertenzijom 24 časa nakon reperfuzije.*



Slika 12. *Koncentracije HDL i LDL holestrola u plazmi kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hipereenzijom 24 časa nakon reperfuzije.*

**p < 0.05 prema SHAM; ## p < 0.01 prema ABI*



Slika 13. *Koncentracija ukupnih proteina u plazmi i diureza kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hiperenzijom 24 časa nakon reperfuzije*

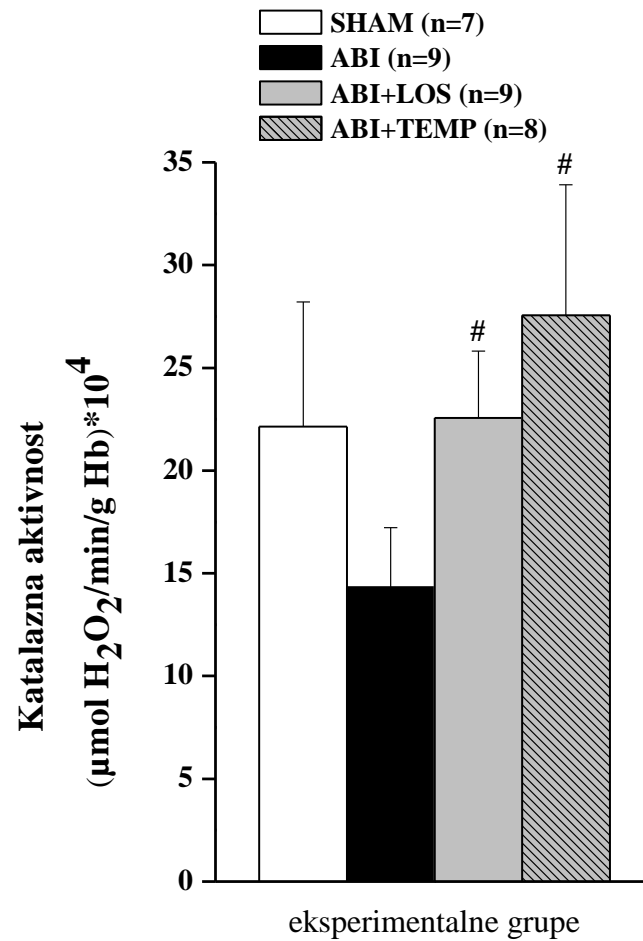
[#] $p < 0.05$ prema ABI;

4.1.3 Oksidativni stres

Radi analize stepena oksidativnog stresa merena je aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation reduktaze (GR), glutation peroksidaze (GSH-Px), a stepen lipidne peroksidacije procenjivan je preko koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (TBARS) u plazmi.

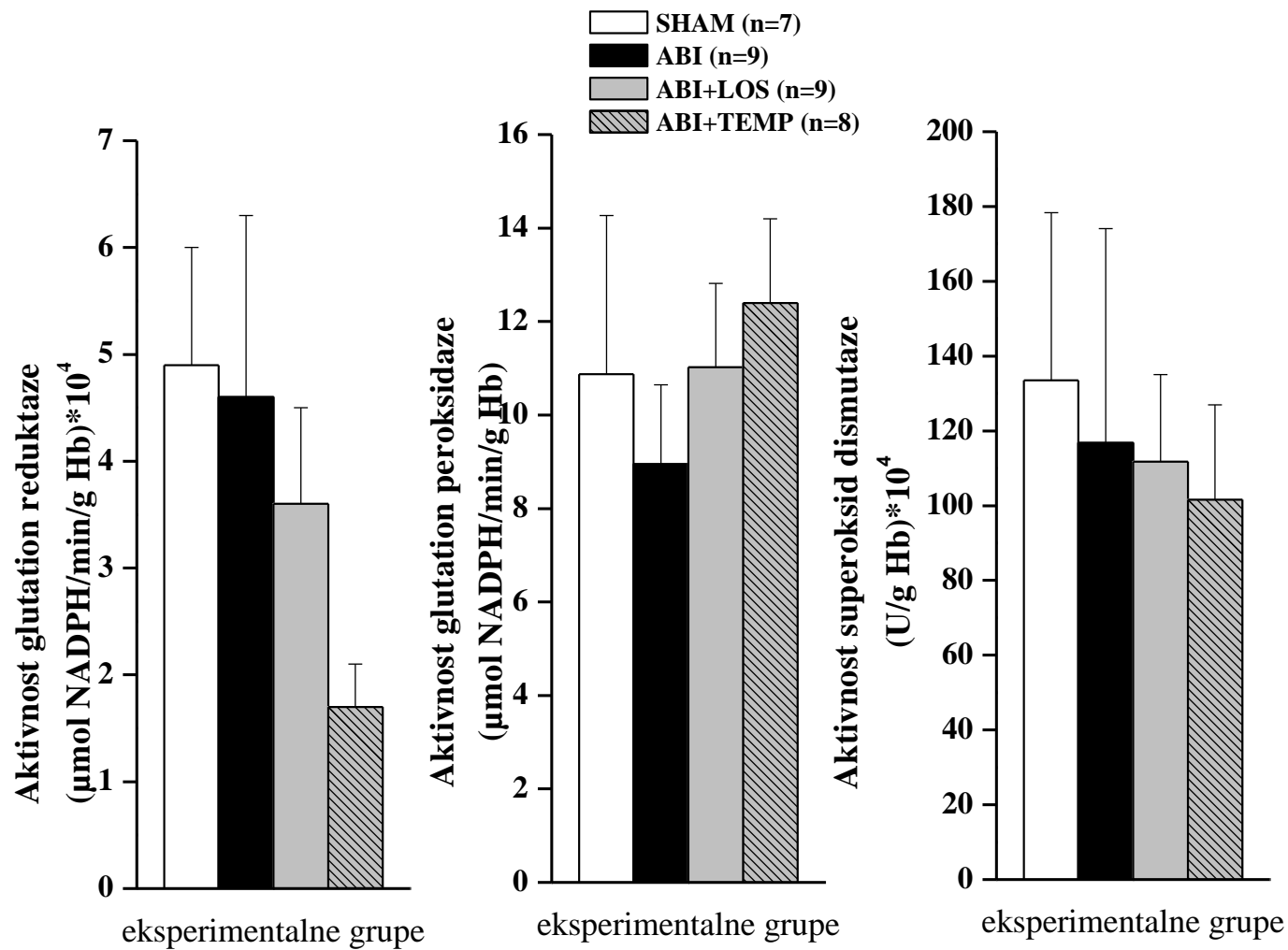
Na slici 14. možemo videti da tretman tempolom i losartanom značajno povećava aktivnost enzima katalaze u odnosu na grupu sa ABI (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.05$; ABI+TEMP vs. ABI, $p < 0.05$). Međutim kod ostalih enzima antioksidativne zaštite čiju smo aktivnost merili, SOD, GSH-Px i GR, nije došlo do promene aktivnosti u poređenju između grupa (slika 15.).

Kod pacova sa ABI došlo je do značajnog povećanja lipidne peroksidacije u poređenju sa lažno operisanim životinjama (ABI vs. SHAM; $p < 0.01$). Tretmani tempolom, kao i losartanom, značajno su snizili TBARS u poređenju sa vrednošću dobijenom kod pacova kojima je indukovana ABI (ABI+TEMP vs. ABI; $p < 0.01$; ABI+LOS vs. ABI; $p < 0.01$) (slika 16.)

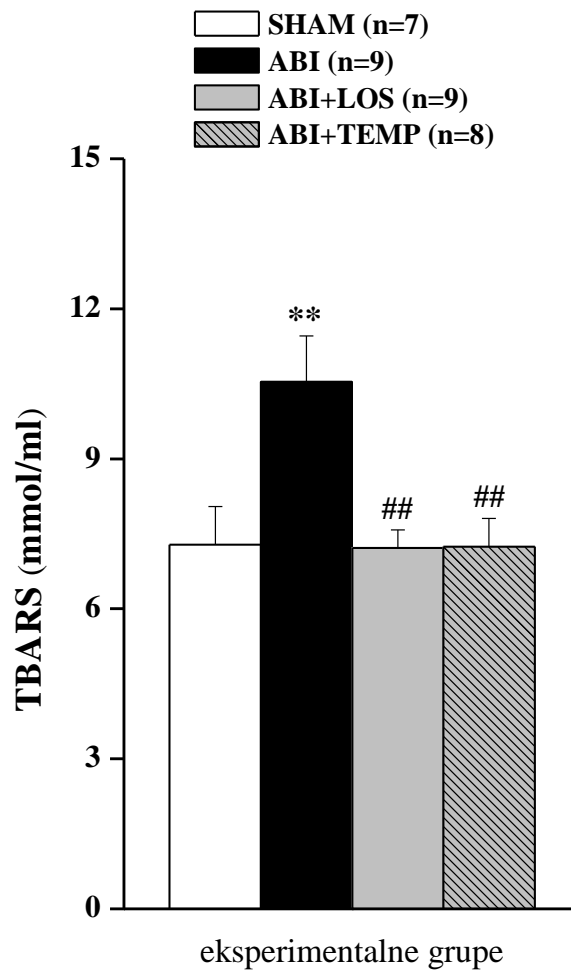


Slika 14. Aktivnost katalaze u plazmi kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hipertenzijom 24 časa nakon reperfuzije

[#] $p < 0.05$ prema ABI



Slika 15. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u plazmi kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hipertenzijom 24 časa nakon reperfuzije



Slika 16. Koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (TBARS) u plazmi kod eksperimentalnih grupa pacova sa urođenom hipertenzijom 24 časa nakon reperfuzije.

**p< 0.01 prema SHAM; ## p< 0.01 prema ABI

4.1.4 Histopatološki parametri

Poslednjom grupom analiza ispitali smo morfološke promene tkiva bubrega i ustanovili da postoje značajne razlike između eksperimentalnih grupa životinja.

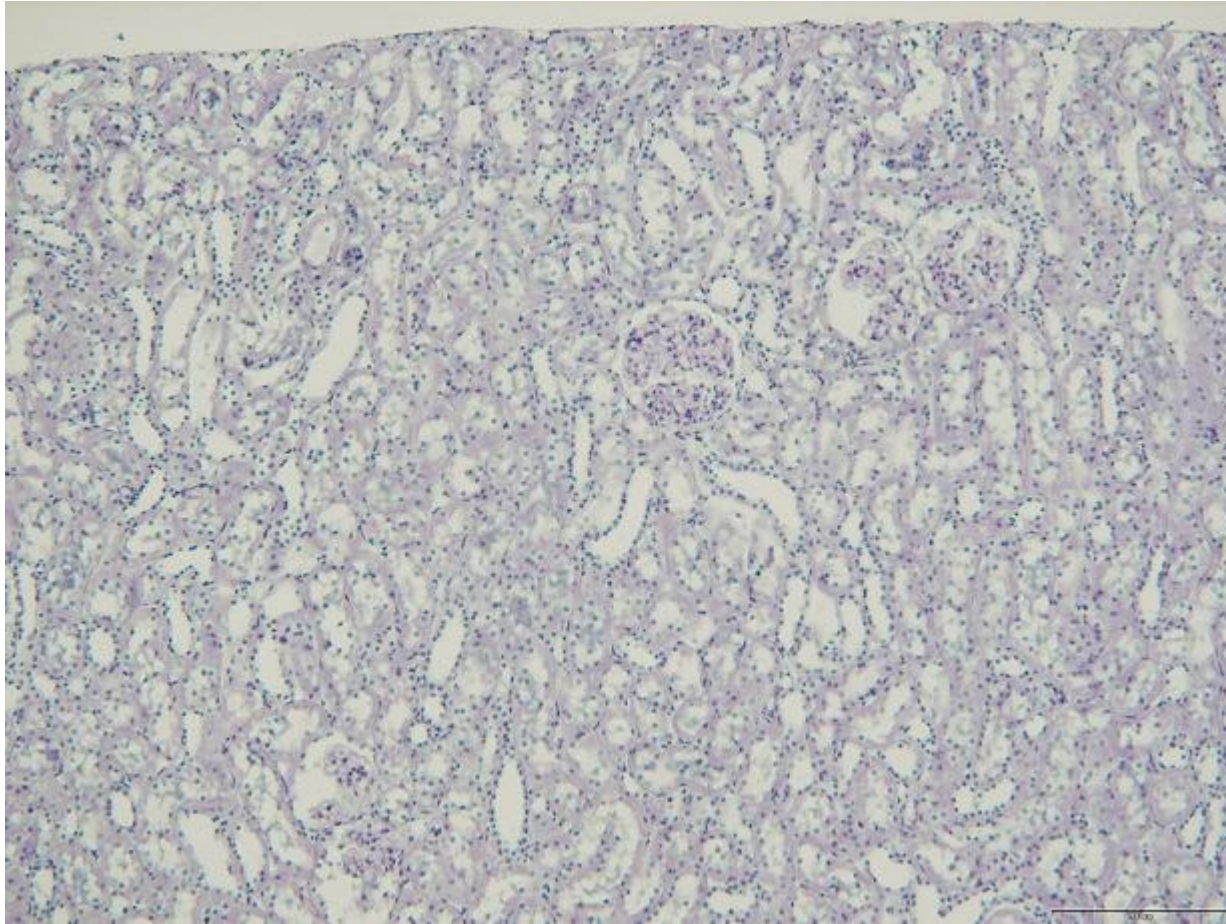
Na slici 17. prikazan je normalni izgled glomerula, intersticijuma, tubula i krvnih sudova lažno operisanih životinja. Samo u nekoliko bubrega je primećen manji broj PAS pozitivnih cilindara u lumenu tubula.

Bubrezi životinja sa ABI su pokazali dilataciju pojedinih segmenata proksimalnih i distalnih tubula, sa ili bez gubitka četkastog pokrova. Najuočljivije promene su prisutne u kortiko-medularnoj zoni gde se uočavaju široka polja nekroze tubula i veliki broj PAS pozitivnih cilindara u sabirnim kanalićima. Intenzitet intersticijalnog edema u ovoj grupi varira od uzorka do uzorka (slika 18.)

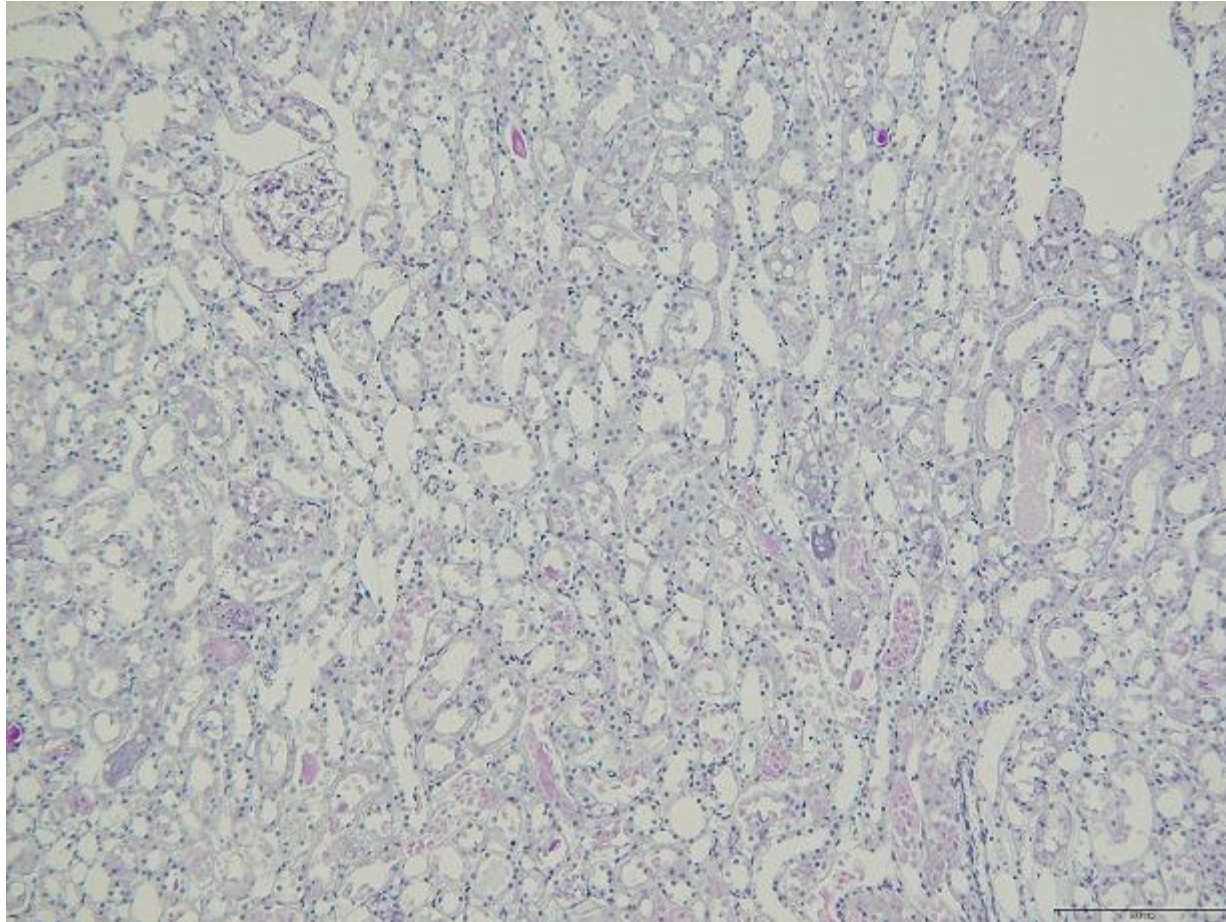
U grupi životinja sa ABI, koje su primale losartan, primećuju se mnogo manja oštećena u poređenju sa bubrezima životinja sa ABI. Dilatacija tubula je manja ili čak odsutna u nekim uzorcima bubrega. U kortiko-medularnoj zoni, nekroza tubula je smanjena, pa su i polja infarkta manje veličine. Edem intersticijuma se retko primećuje. Pored toga, manji je i broj cilindara u meduli bubrega (Slika 19.)

Sa druge strane, većina uzoraka bubrega životinja tretiranih tempolom skoro da je potpuno identična grupi sa ABI. Samo u nekoliko uzoraka je uočena nešto manja nekroza tubula i manji broj cilindara. Glomeruli i krvni sudovi isti su kao kod lažno operisanih životinja. U pojedinim uzorcima uočena je nešto manja dilatacija distalnih tubula u odnosu na grupu sa ABI (slika 20.).

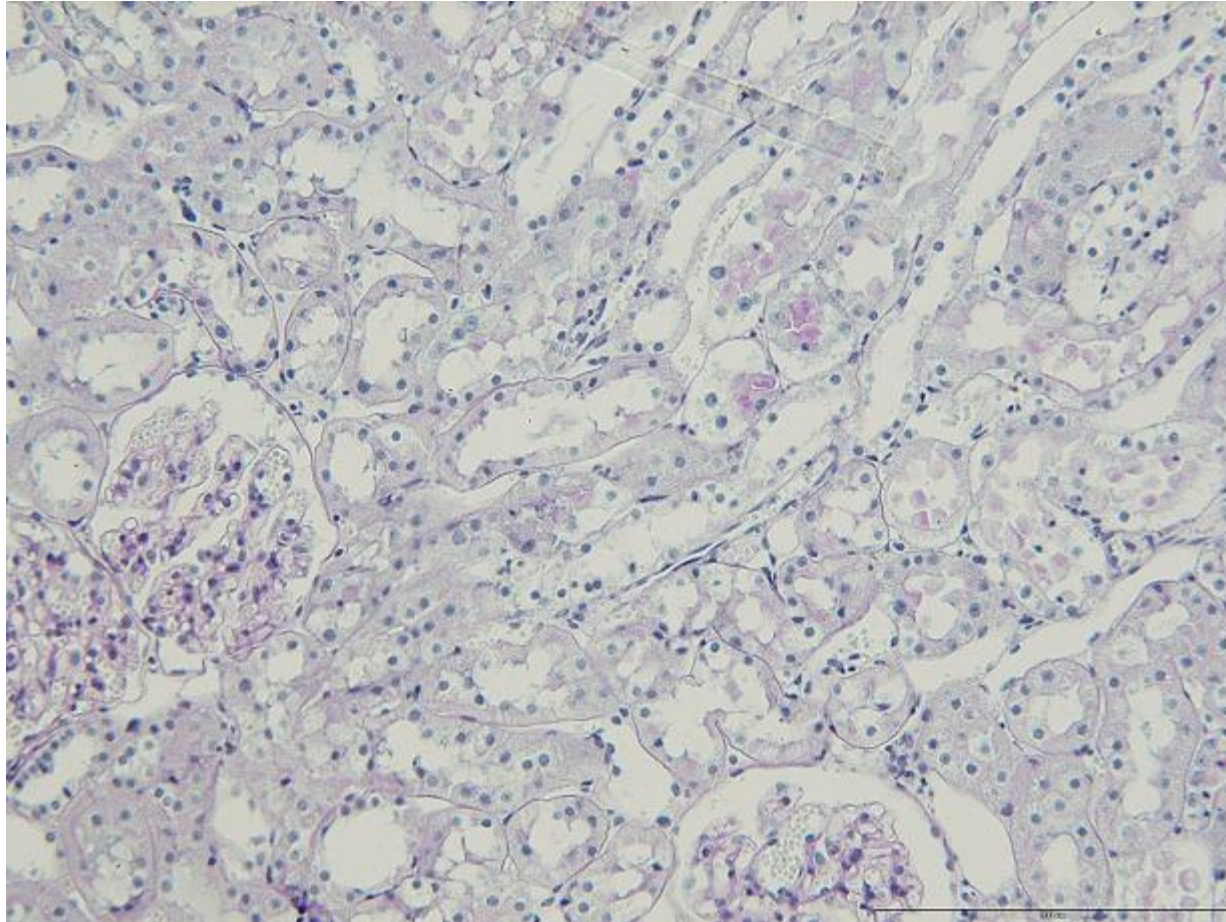
Zbir histopatoloških promena pokazuje da grupa kojoj je izazivana ABI, ima značajno povećano oštećenje bubrega u poređenju sa lažno operisanim životinjama (ABI vs. SHAM, $p < 0.001$). Tretman losartanom značajno poboljšava morfološku strukturu bubrega u poređenju sa životinjama kod kojih je indukovana ABI (ABI+LOS vs. ABI, $p < 0.001$) (slika 21.).



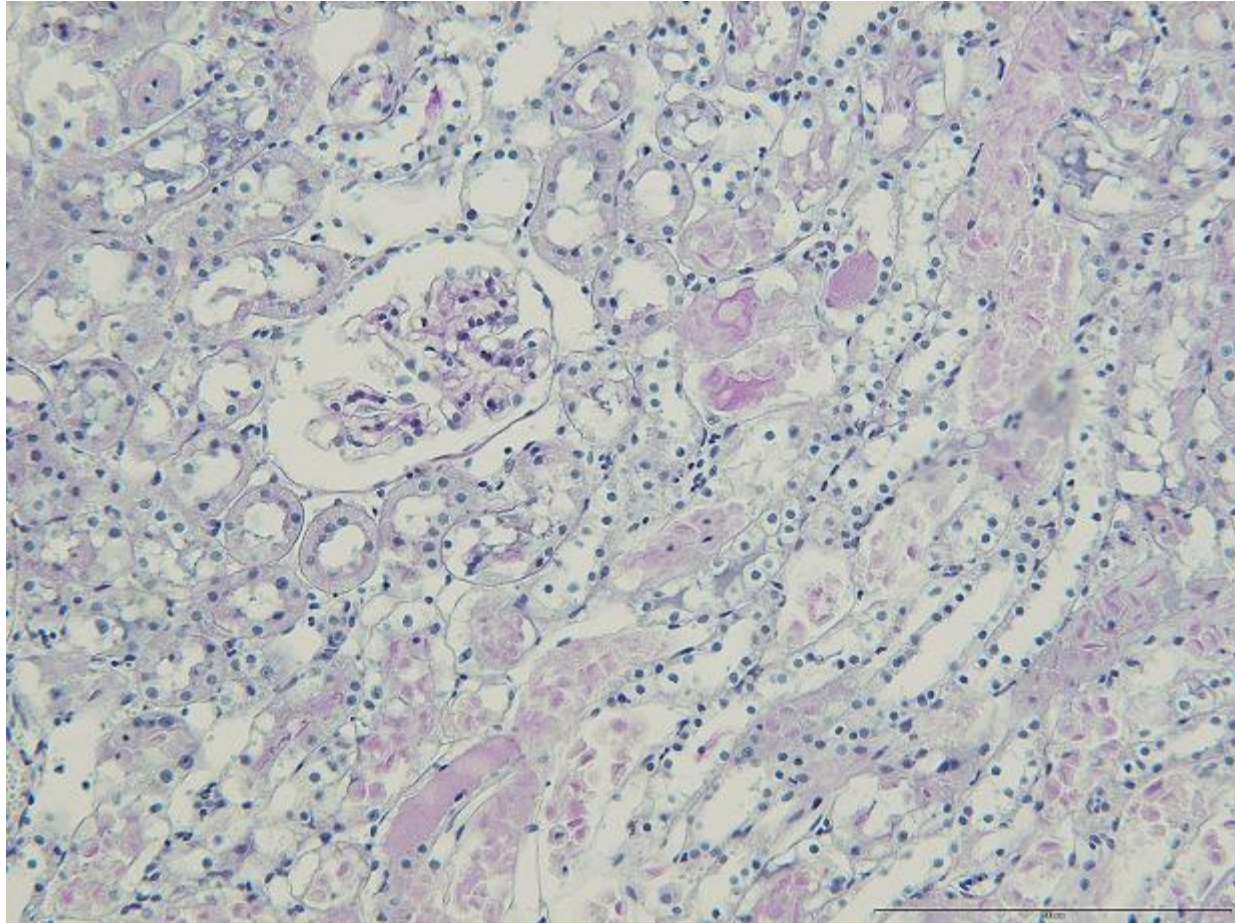
Slika 17. *Morfološka slika bubrega lažno operisanog pacova (SHAM) sa urođenom hipertenzijom. Glomeruli, intersticijum i tubuli sa normalnim izgledom morfoloških struktura bubrega*



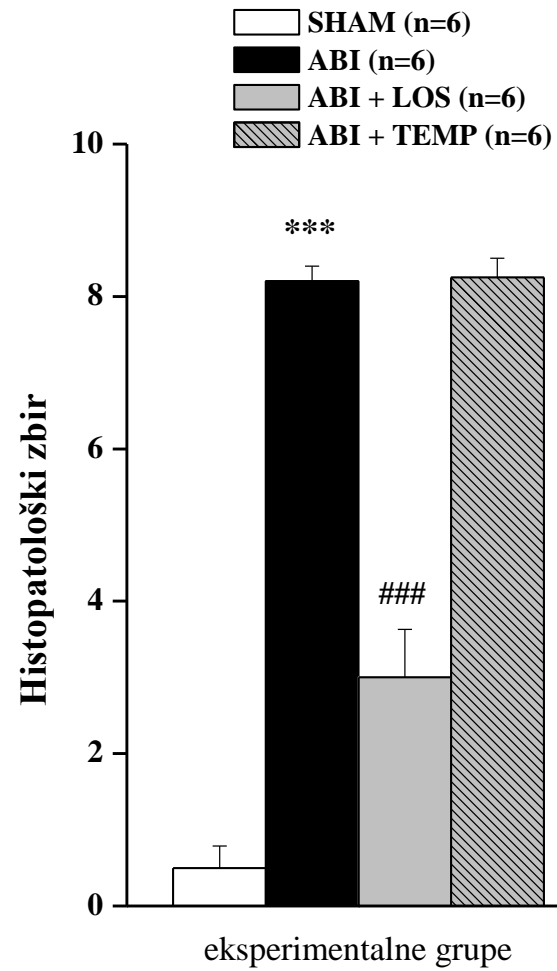
Slika 18. *Morfološka slika bubrega pacova sa urođenom hipertenzijom kod koga je izazvana ABI. Izražena je dilatacija proksimalnih i distalnih tubula. U kortiko medularnoj zoni prisutna su široka polja nekroze tubula sa velikim brojem PAS pozitivnih cilindara u sabirnim kanalićima*



Slika 19. *Morfološka slika bubrega pacova sa urođenom hipertenzijom i ABI tretiranog losartanom. Manje izražene promene na tubulima i manji broj PAS pozitivnih cilindara.*



Slika 20. *Morfološka slika bubrega pacova sa urođenom hipertenzijom i ABI tretiranog tempolom. Promene strukture bubrega kod životinja tretiranih tempolom skoro da su potpuno identične grupi sa ABI*



Slika 21. Zbir histopatoloških promena kod eksperimentalnih grupa 24 časa nakon reperfuzije.

*** $p < 0.001$ prema SHAM; ### $p < 0.001$ prema ABI

5 DISKUSIJA

U prikazanoj studiji ispitivana je uloga angiotenzina II, kao i reaktivnih vrsta kiseonika kod pacova sa urođenom hipertenzijom u modelu ABI. Značajnost njihove uloge je procenjivana na osnovu hemodinamskih, biohemijskih, histoloških parametara, kao i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite.

Dobijeni hemodinamski rezultati ukazuju da nastanak ABI dovodi do smanjenja srednjeg arterijskog pritiska kod SHR, kao i blagog sniženja frekvence rada srca. Sličan rezultat dobili su Bowmer i saradnici 1983. godine u modelu glicerolom indukovane akutne bubrežne insuficijencije (135). Po ovim autorima, do smanjenja FS i SAP dolazi usled uticaja visoke uremije, jednog od markera ABI, na autonomni nervni sistem, kao i na smanjenje osetljivosti α_1 adrenoreceptora na noradrenalin. Ovim se može objasniti pad frekvence srca u našim eksperimentalnim grupama sa ABI, jer je u ovim grupama takođe došlo do naglog skoka uree u plazmi nakon izazivanja ABI. Sa druge strane, sniženje srednjeg arterijskog pritiska kod životinja sa ABI, najverovatnije je posledica relaksacije u perifernoj cirkulaciji. Naime, ovaj pad pritiska nije bio praćen promenom minutnog volumena srca, niti povećanjem diureze.

Losartan je jedan od komercijalnih antihipertenzivnih lekova iz klase blokatora AT1 receptora za AngII. Kawano Y i saradnici (1994. god.) i Eduardo Nunez i saradnici (1997. god.) su pokazali da hroničan tretman losartanom kod pacova sa urođenom hipertenzijom dovodi do značajnog pada SAP (136, 137). Sa druge strane, Schiffrin i saradnici, 1984. godine, su pokazali da je koncentracija Ang II, kao i gustina receptora za Ang II u mezenteričnoj arteriji značajno veća kod SHR u poređenju sa njihovim normotenzivnim srodnicima (138). Takođe, Satoh i saradnici, 2001. godine, su pokazali da je u *in vitro* uslovima nivo AngII u glatkim vaskularnim mišićnim ćelijama, izolovanim iz SHR, značajno veći u poređenju sa istim ćelijama izolovanim iz WKY (139). U našem modelu ABI u eksperimentalnoj hipertenziji, akutna primena losartana, u dozi od 10mg/kg tokom tri sata, dovela je do značajnog sniženja SAP, na osnovu čega se nameće pretpostavka da renin-angiotenzin-aldosteron sistem aktivno učestvuje u porastu krvnog pritiska i nakon izazivanja ABI kod SHR. Ukupni periferni otpor i minutni volumen srca nisu bili značajno promenjeni kod ove grupe pacova. Izraženo sistemsko vazorelaksantno dejstvo losartana u našoj studiji očekivano je i u skladu sa rezultatima gore navedenih autora.

Brojne studije su, takođe, pokazale da inhibicija RVK značajno snižava SAP kod SHR (140, 141, 142). Nishiyama i saradnici, 2001. godine, pokazali su u modelu Ang II-indukovane hipertenzije da uklanjanje O_2^- dovodi do značajnog pada SAP i UPO (143). Druga istraživanja su pokazala da u patogenezi hipertenzije postoji dosta dokaza koji ukazuju na ulogu RVK, posebno O_2^- , koji nastaje aktivnošću NAD(P)H oksidaze. U modelu Ang II-indukovane hipertenzije kod pacova, pokazano je da dolazi do povećanja ekspresije i aktivnosti podjedinica NADPH oksidaze (103, 144), dok dodavanje inhibitora NAD(P)H oksidaze smanjuje vaskularnu produkciju O_2^- i ublažava povećanje krvnog pritiska uzrokovanog Ang II (145). Kod genetski modifikovanih miševa, kojima nedostaje citosolna podjedinica p47phox, hipertenzivni odgovor na AngII je nedovoljno izražen i ove životinje ne pokazuju ista povećanja O_2^- produkcije i endotelne disfunkcije, koje su uočene kod normalnih miševa nakon infuzije AngII (146, 147). Dobijeni rezultati u našem eksperimentu ukazuju da, u modelu ABI udružene sa hipertenzijom, akutni tretman tempolom, takođe, značajno snižava SAP, frekvencu rada srca i ukupni periferni otpor, što je bilo praćeno povećanjem minutnog volumena srca. Ovi rezultati u saglasnosti su sa prethodno navedenim studijama (140-143).

Dobro je poznato, iz ranijih studija, da je intrarenalna vazokonstrikcija jedan od glavnih faktora nastanka i održanja ABI (1). Upravo ovaj mehanizam bio je odgovoran i za povećanje otpora protoku krvi (BVO) i smanjenje protoka krvi kroz bubrežnu arteriju (BPK), u našem modelu ABI u hipertenziji. Tretman losartanom u potpunosti potire posledice ABI na bubrežnu hemodinamiku. Miloradović i saradnici, 2007. godine, pokazali su da losartan (10mg/kg t.m.) značajno povećava BPK u uslovima umerenog nedostatka NO kod postishemičnih *Wistar* pacova (148). Iako smo prikazanu studiju uradili na drugom eksperimentalnom modelu, naši rezultati su delom u saglasnosti sa prethodno navedenim, uzevši u obzir da su mnoge studije pokazale da kod SHR dolazi do disfunkcije u produkciji NO i ekspresiji eNOS (149). Sa druge strane, Jerkić i saradnici, 2004. godine, su pokazali da ista doza losartana nema značajnog uticaja na intrarenalnu hemodinamiku i funkcionalne parametre bubrega kod *Wistar* pacova 45 minuta nakon renalne ishemije (150). Lopau i saradnici, 2001. godine, pokazali su da 40 minuta nakon klemovanja obe bubrežne arterije kod ženki Sprague-Dawley, infuzija valsartana-blokatora tip 1 receptora za AngII dovodi do značajnog povećanja BPK (151). Opšte posmatrano, naši rezultati, u poređenju sa rezultatima pomenutih autora, potvrđuju da blokatori receptora tip 1 za

angiotenzin II različito deluju na renalnu hemodinamiku u zavisnosti od stepena bubrežnog oštećenja i nivoa endotelne disfunkcije, kao i korišćenog soja životinja (151).

Schnackenberg i saradnici, 1994. godine, su pokazali da davanje bolusa tempola u koncentraciji od 12.4 mg/kg t.m. ne dovodi do značajne promene BPK, ali značajno snižava BVO kod SHR u odnosu na kontrolnu grupu (140). Ovi rezultati su slični našim, dobijenim u grupi životinja tretiranih tempolom, što nas navodi na zaključak da uklanjanje RVK iskazuje izvestan povoljan efekat na bubrežnu hemodinamiku u ovim eksperimentalnim uslovima. Richelieu i saradnici, 2005. godine, u svojoj eksperimentalnoj studiji davali su pacovima sa urođenom hipertenzijom rastvor tempola u vodi *ad libitum* u koncentraciji od 1mM, 15 dana pre žrtvovanja, i ustanovili značajno niži otpor protoku krvi kroz bubrežnu arteriju u odnosu na kontrolnu grupu životinja (152). Majid i Kopkan (2007. god.), pokazali su da u slučaju povećanog oksidativnog stresa tempol može dovesti do poboljšanja protoka krvi kroz bubrežnu arteriju, kod pacova kod kojih je hipertenzija izazvana aplikacijom angiotenzina II (153). Objašnjenje naših rezultata možemo povezati sa činjenicom da u ishemičnom tipu ABI dolazi do povećanja RVK, pa samim tim i O_2^- (39). Dokazano je da povišeni oksidativni stres i visok nivo RVK imaju važnu ulogu u patogenezi i razvoju urođene hipertenzije, kako kod čoveka, tako i u animalnim modelima, uključujući i soj SHR (154-159). Pored toga brojna istraživanja su pokazala da se u poređenju sa WKY pacovima, u bubregu SHR povećava ekspresija iRNK za NADPH oksidazu, koja se smatra važnim izvorom O_2^- (160). Poznato je da povišen nivo superoksidnog anjona dovodi do endotelne disfunkcije i vazokonstrikcije (107), a intrarenalna vazokonstrikcija (1) i formiranje RVK u reperfuziji (114) predstavljaju karakteristike ABI. Tretman tempolom, koji neutrališe prisutne O_2^- , dovodi do sniženja krvnog pritiska, smanjuje otpor i samim tim poboljšava protok krvi kroz bubrežnu arteriju.

ABI se definiše kao naglo pogoršanje bubrežne funkcije. Nivoi kreatinina i uree u plazmi predstavljaju jedan od glavnih markera oštećenja bubrega. U našoj studiji postishemično oštećenje bubrega sedam puta povećava kreatinin u plazmi, što ukazuje na dramatično smanjenje glomerulske filtracije u postishemičnom hipertenzivnom bubregu. Tretman losartanom značajno je snizio kreatinin u plazmi 24 časa nakon renalne reperfuzije kod SHR sa izazvanom ABI. Kontogiannis i Burns (1998. god.) takođe su pokazali da blokada AT1 receptora losartanom ubrzava oporavak renalne funkcije što dovodi do značajnog sniženja kreatinina u serumu nakon

bilateralne okluzije bubrežnog hilusa mužjaka Sprague-Dawley pacova u trajanju od 60 minuta (77). Miloradović i saradnici, 2007. godine, su pokazali da losartan dovodi do blagog poboljšanja GFR u postishemičnom bubregu *Wistar* pacova nakon umerene blokade NO sintaze (148). Rezultati ove studije su u saglasnosti sa rezultatima pomenutih autora i sugerišu da prekomerna ekspresija AngII ima važnu ulogu u regulaciji brzine glomerulske filtracije u postishemičnom bubregu pacova sa urođenom hipertenzijom, a da blokada receptora za AngII poboljšava filtraciju u glomerulima.

Tretman SOD mimetikom tempolom, nije doveo do promene koncentracije kreatinina u plazmi hipertenzivnih životinja sa ABI. Chatterjee i saradnici, 2000. godine, su pokazali da tempol dovodi do značajnog pada kreatinina u plazmi postishemičnih tretiranih *Wistar* pacova u poređenju sa životinjama kod kojih je indukovana ABI (161). Razlike između našeg i rezultata pomenutih autora mogu se objasniti razlikama u korišćenom soju, dizajnu eksperimenta i dužini tretmana eksperimentalnih životinja.

Urea u plazmi menja se na sličan način kao vrednosti kreatinina u plazmi, što predstavlja još jednu potvrdu izmenjene glomerulske filtracije u pomenutim eksperimentalnim uslovima.

Još jedan od važnih markera akutne bubrežne insuficijencije je nastanak hiperfosfatemije. Rubinger i saradnici, 2005. godine, pokazali su da je hiperfosfatemija posledica smanjene ekspresije natrijum zavisnog fosfatnog kotransportera u tubulima, koja nastaje kao posledica ishemičnog oštećenja bubrežnog tkiva (162). U našoj studiji, losartan dovodi do značajnog sniženja fosfata u plazmi, što može biti posledica bolje očuvanosti strukture bubrežnih tubula nakon blokade RAAS (slika 19.), a samim tim i bolje ekskrecije fosfata. Sa druge strane, tretman SOD mimetikom, tempolom, nije doveo do značajnog sniženja fosfata u plazmi. Ovo nas navodi na zaključak da u našem eksperimentalnom modelu, tokom postishemičnog oštećenja bubrega, angiotenzin II ima predominantnu ulogu u nastanku tubularnih oštećenja u odnosu na RVK i da je RAAS najvećim delom odgovoran za hiperkreatininemiju, hiperuremiju i hiperfosfatemiju u grupi tretiranoj tempolom.

Dobro je poznato da parametri lipidnog statusa mogu dati dobru prognozu patomorfoloških promena na krvnim sudovima. Visoke vrednosti LDL holesterola i niske vrednosti HDL holesterola pokazatelji su lošeg lipidnog statusa u organizmu. Razne kliničke studije (163, 164) i

brojna istraživanja na animalnim eksperimentalnim modelima (165, 166), su pokazale kardioprotektivne efekte holesterola visoke gustine (HDL holesterol). Thiernemann i saradnici, 2003. godine, pokazali su da HDL u bolusu u koncentraciji od 80mg/kg, dovodi kod *Wistar* pacova do poboljšanja funkcije i strukture bubrega nakon ishemične ABI (167). U našoj studiji ishemični tip ABI dovodi do porasta LDL holesterola u poređenju sa grupom lažno operisanih životinja, dok je tretman losartanom doveo do statistički značajnog povećanja HDL u plazmi, i tim delom posredovao poboljšanju glomerulske filtracije i strukture bubrega životinja sa ABI.

Diureza predstavlja jedan od nespecifičnih markera ABI. Brojni autori (168, 169) dele pacijente sa razvijenom ABI na pacijente sa oligurijom i one koji imaju nesmetanu diurezu. U našem eksperimentalnom modelu, kod pacova sa urođenom hipertenzijom, ABI nije značajno menjala diurezu, kao i tretman losartanom i tempolom, što ukazuje da nije došlo do obstrukcije urinarnih puteva u drastičnoj meri.

Lipidna peroksidacija predstavlja oksidativnu degradaciju lipida. U ovom procesu reaktivne vrste kiseonika preuzimaju elektron iz membranskih lipida, što uzrokuje oštećenje ćelija. Mnogobrojne studije ukazuju na povišenu lipidnu peroksidaciju izraženu preko nivoa TBARS u plazmi (170, 171), eritrocitima (172) i homogenatu bubrega (39) kod raznih oblika insuficijencije bubrega. Rezultati naše studije, pokazali su da bubrežna ishemija dovodi do povećanja lipidne peroksidacije u plazmi SHR, dok blokada AT1 receptora dovodi do njenog značajnog smanjenja. Ovi rezultati su saglasni sa rezultatima Bolterman i saradnika koji su 2005. godine pokazali da blokada sinteze Ang II inhibitorom ACE, Captoprilom, davanim *ad libitum* u vodi tokom 15 dana u dozi od 100mg/kg kod SHR smanjuje nivo TBARS u plazmi u odnosu na netretiranu grupu SHR (173). Kod hipertenzivnih pacijenata tretman blokatorom AT1 receptora Candesartanom dovodi do značajnog sniženja nivoa TBARS u plazmi (174). Tempol-SOD mimetik, u našem modelu esencijalne hipertenzije udružene sa ABI, takođe snižava nivo TBARS u plazmi, što je u saglasnosti i sa studijom koju su izveli Zhang i saradnici (175). Oni su 2004. godine pokazali da tretman tempolom u dozi od 10mg/kg i 30mg/kg dovodi do smanjenja nivoa TBARS u plazmi kod mužjaka Sprague-Dawley pacova sa AngII-indukovanom hipertenzijom. Svi ovi rezultati nas navode na zaključak da i Ang II i RVK (delom oslobođene i pod uticajem Ang II) učestvuju u procesu lipidne peroksidacije u našem eksperimentalnom modelu.

Inal i saradnici, 2002. godine, su u modelu ishemične ABI na mužjacima Sprague-Dawley soja pacova pokazali da nakon 30 minuta ishemije i 45 minuta reperfuzije dolazi do pada katalazne aktivnosti u eritrocitima u odnosu na kontrolnu grupu (176). U našem eksperimentalnom modelu, katalazna aktivnost u eritrocitima životinja sa ABI je nešto niža 24h nakon reperfuzije u odnosu na SHAM, što je u saglasnosti sa prethodnom studijom, iako je naša studija sprovedena na drugom soju pacova. Tretman, kako losartanom tako i tempolom, u našem modelu doveo je do značajnog povećanja aktivnosti katalaze. Tretman tempolom je povećao aktivnost katalaze dva puta u odnosu na grupu životinja kojoj je indukovana ABI, dok tretman losartanom vraća aktivnost enzima približno na nivo kao kod lažno operisanih životinja. Ovi rezultati nas navode na zaključak da tretmani losartanom i tempolom značajno smanjuju stepen oksidativnog stresa kod SHR kojima je indukovana ishemična ABI. Sa druge strane, ovi rezultati takođe ukazuju na mogućnost da kod pacova sa urođenom hipertenzijom kojima je izazvana ABI, usled smanjenja aktivnosti katalaze u eritrocitima, dolazi do povećane lipidne peroksidacije u plazmi. Kod životinja tretiranih tempolom smanjenje lipidne peroksidacije verovatno je posledica povećanja katalazne aktivnosti (177, 178). Yuan i saradnici, 1996. godine, pokazali su da je aktivnost katalaze pozitivno korelisana sa povećanom aktivnošću superoksid dismutaze kod SHR (179), dok su radovi drugih autora (180) pokazali da sam tempol može imati katalaznu aktivnost, odnosno da deluje i kao katalazni mimetik.

Enzim NAD(P)H oksidaza predstavlja jedan od glavnih izvora RVK (86). Aktivacija ove oksidaze regulisana je brojnim vazoaktivnim hormonima, faktorima rasta kao i mehaničkim stimulusima (181). Jedan od značajnih faktora aktivacije je i AngII (182). Istraživanja su pokazala (103) da infuzija AngII povećava aktivnost NAD(P)H oksidaze i koncentraciju O_2^- , dok inhibicija oksidaze smanjuje vaskularnu produkciju superoksidnog anjona (145). Zafari je sa saradnicima 1988. godine (183) pokazao da blokada AT1 receptora losartanom smanjuje povećanu koncentraciju H_2O_2 nastalu infuzijom AngII. Pored toga, kod Sprague–Dawley pacova, kod kojih je izazvan infarkt miokarda, osmonedeljni tretman losartanom u dozi od 20mg/kg po danu, dovodi do povećanja aktivnosti CAT u oštećenom tkivu (184). Sve ovo ukazuje da su lipidna peroksidacija i aktivnost CAT, kao enzima oksidativne zaštite, tesno povezane sa RAAS. U našem modelu ishemične ABI pokazali smo da bilo blokada RAAS, bilo uklanjanje RVK, dovodi do povećane CAT aktivnosti i smanjenja lipidne peroksidacije, što nas navodi na zaključak da je smanjena i aktivnost NADPH oksidaze. Postoje brojne kontraverze

vezane za aktivnost enzima antioksidativne zaštite u modelima ishemijsko reperfuzionih oštećenja, što je verovatno posledica različitih metodoloških pristupa (180, 185, 186, 187). Yamanobe i saradnici, 2007. godine, pokazali su da u homogenatu bubrega miševa nakon ishemično-reperfuzionih oštećenja ne dolazi do promene u aktivnosti SOD (188), dok su drugi autori, u modelu glicerolom izazivane ABI, kod pacova dobili smanjenje aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px (189). Sa druge strane, u ishemičnom modelu na Sprague-Dawley pacovima, Dobashi i saradnici, 2000. godine, su pokazali da nema značajnije promene u aktivnostima SOD i CAT, dok GSH-Px pokazuje blagi pad aktivnosti u homogenatima tkiva bubrega (190). U našem eksperimentalnom modelu, postishemična ABI nema uticaja na aktivnost SOD, GR, i GSH-Px u eritrocitima u odnosu na grupu lažno operisanih životinja. Tretmani tempolom i losartanom ne menjaju statistički značajno aktivnost SOD, GSH-Px i GR u poređenju sa grupom kod koje je izazvana ABI, što nas navodi na zaključak da aktivnost ovih enzima nije direktno posredovana RAAS ili da sa druge strane, nije došlo do značajnog povećanja koncentracije superoksidnog anjona u ovakvom eksperimentalnom okruženju.

Morfološke promene tkiva bubrega predstavljaju najbolji prikaz razvoja ABI. Najuočljivije promene na ishemičnom bubregu koje se mogu uočiti pomoću svetlosne mikroskopije su široka polja nekroze, najrasprostranjenija u kortiko-medularnoj zoni, kao i veliki broj PAS pozitivnih cilindara u meduli bubrega (150). Morfološke promene bubrega izolovanog iz grupe životinja kojima smo indukovali ishemičnu ABI, upravo odgovaraju prethodnom opisu. Pored navedenih promena uočena je dilatacija pojedinih segmenata proksimalnih i distalnih tubula, sa ili bez gubitka četkastog pokrova.

Naši rezultati jasno ukazuju da, u ranoj fazi razvoja ishemične ABI u hipertenziji, blokada tip1 receptora za angiotenzin II, losartanom, ima mnogo povoljnije efekte, nego uklanjanje superoksidnih anjona nastalih u toku reperfuzije. Lezije tubularnih epitelnih ćelija (glavna oštećenja nastala tokom ABI), manjeg su intenziteta u grupi pacova tretiranih losartanom nego u grupi sa ABI. Ovakav histološki nalaz, koji ukazuje na povoljan efekat losartana je u skladu sa poboljšanjem sistemskih i hemodinamskih parametara bubrežne arterije, kao i biohemijskih parametara kreatininemije, uremije i fosfatemije (slika 10.). Heeba (2011. god.) i Therrien i saradnici (2009. god.) takođe su pokazali protektivan efekat losartana na bubreg pacova u modelu gentamicinom indukovane ABI, odnosno modelu maligne hipertenzije (191, 192).

Grupe autora (161, 193) su pokazale da tretman tempolom popravlja histološku sliku ishemičnog bubrega u normotenzivnim uslovima. Sa druge strane, akutni tretman tempolom hipertenzivnih pacova sa razvijenom ABI, u našoj studiji, nije doveo do poboljšanja histopatološke slike bubrega. Iako u ovoj studiji nisu prikazane vrednosti pojedinačnih morfoloških promena na strukturama bubrega eksperimentalnih životinja (stepen kortiko-medularne nekroze, prisustvo PAS pozitivnih cilindara i dilataciju tubula), već zbir histopatoloških promena, treba istaći da intenzitet oštećenja tubula u grupi tretiranoj tempolom najviše doprinosi porastu ovog zbira. Naime, oštećenja tubulocita u grupi tretiranoj tempolom bila su slična onima nađenim u bubrezima pacova sa ABI. Naši rezultati nas navode na zaključak da je uloga RAAS sistema u nastanku strukturnih oštećenja u modelu ABI sa hipertenzijom dominantna i da strukturna oštećenja nije bilo moguće prevazići primenom samo SOD mimetika.

Iz prikazanih rezultata možemo zaključiti da angiotenzin II ima značajnu ulogu u razvoju i održanju eksperimentalne postishemične ABI u hipertenziji, što se ne može reći i za reaktivne vrste kiseonika. Takođe, ovi rezultati ukazuju da bi, kod pacijenata koji su na antihipertenzivnoj terapiji blokatorima AT1 receptora intenzitet ABI ishemičnog tipa mogao biti znatno smanjen, odnosno da pacijenti na terapiji ovim lekovima nemaju posebne rizike tokom razvoja ABI ishemičnog tipa. Naša hipoteza, naravno, zahteva dalja kompleksnija i sveobuhvatnija klinička istraživanja.

6 ZAKLJUČAK

Rezultati prikazane studije pokazuju da indukcija ishemičnog tipa akutne bubrežne insuficijencije kod pacova sa urođenom hipertenzijom, u poređenju sa lažno operisanim životinjama, nakon 24h reperfuzije dovodi do:

- sniženja srednjeg arterijskog pritiska i karotidnog vaskularnog otpora;
- povećanja otpora protoku krvi kroz bubrežnu arteriju i sledstvenog smanjenja protoka kroz ovaj krvni sud, što ukazuje na snažnu intrarenalnu vazokonstrikciju u postishemičnom bubregu - jednog od glavnih uzroka razvoja akutne bubrežne insuficijencije;
- značajnog povećanja vrednosti biohemijskih pokazatelja bubrežne funkcije u plazmi: kreatinina, uree i neorganskog fosfata;
- značajnog povećanja nivoa LDL holesterola u plazmi;
- značajnog povećanja lipidne peroksidacije u plazmi;
- dilatacije pojedinih segmenata proksimalnih i distalnih tubula, sa ili bez gubitka četkastog pokrova, kao i promena u kortiko-medularnoj zoni gde se uočavaju široka polja nekroze tubula i veliki broj PAS pozitivnih cilindara u sabirnim kanalićima.

Prikazani rezultati takođe pokazuju da sistem renin-angiotenzin-aldosteron ima važnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska i funkcije bubrega u eksperimentalnoj ishemičnoj akutnoj bubrežnoj insuficijenciji u hipertenzivnom okruženju, budući da tretman pacova blokatorom receptora tipa 1 za angiotenzin II – losartanom, u poređenju sa netretiranim pacovima sa indukovanom bubrežnom insuficijencijom, dovodi do :

- sniženja srednjeg arterijskog pritiska;
- smanjenja otpora protoku krvi i povećanja protoka kroz bubrežnu arteriju;

- značajnog sniženja vrednosti biohemijskih markera akutne bubrežne insuficijencije u plazmi: kreatinina, uree i neorganskih fosfata;
- povećanja HDL holesterola;
- smanjenja lipidne peroksidacije u plazmi, kao i porasta aktivnosti enzima antioksidativne zaštite- katalaze;
- značajnog poboljšanja pato-morfološkog izgleda postishemičnog bubrega, odnosno značajno manje ili odsutne dilatacije tubula, smanjenja nekroze tubula u kortiko-medularnoj zoni, manjih polja infarkta, kao i manjeg broja cilindara u meduli bubrega.

Uklanjanje superoksidnog anjona, po rezultatima ove studije, iako dovodi do značajnih promena u sistemskim hemodinamskim i pojedinim biohemijskim parametrima, ne dovodi do značajnih promena u parametrima bubrežne strukture i funkcije u postishemičnom modelu akutne bubrežne insuficijencije, udružene sa hipertenzijom. Tretman tempolom, u poređenju sa netretiranim životinjama sa indukovanom bubrežnom insuficijencijom:

- smanjuje otpor u bubrežnoj arteriji;
- neznatno utiče na povećanje protoka krvi kroz bubrežnu arteriju;
- ne utiče na biohemijske pokazatelje bubrežne funkcije;
- ne utiče na morfološku sliku ishemičnog bubrega.

Opšti zaključak našeg rada ukazuje da postishemično povećanje nivoa angiotenzina II u hipertenzivnim uslovima ima značajnu ulogu u razvoju renalne vazokonstrikcije i regulaciji glomerulske filtracije, kao i nastanku tubulo-intersticijskih oštećenja u bubregu.

Terapija blokatorima receptora tipa 1 za AngII, može imati povoljan efekat na postishemični bubreg kod pacijenta sa hipertenzijom.

Superoksidni anjon nema posebno izražen efekat u nastanku i održanju akutne bubrežne insuficijencije kod hipertenzivnih pacova, ali zbog prirode ishemično-reperfuzionih oštećenja svakako treba ispitati ulogu ostalih reaktivnih vrsta kiseonika.

U cilju razumevanja potpunih efekata angiotenzina II i reaktivnih vrsta kiseonika kod hipertenzivnih pacijenata kod kojih se razvije ishemična akutna bubrežna insuficijencija, treba uzeti u obzir i druge okolnosti kao što su godine života, vaskularna oboljenja, prethodno nastala bubrežna oštećenja i druge individualne karakteristike pacijenta, kao i sprovesti detaljnija klinička istraživanja.

7 LITERATURA

1. Nissenson AR. Acute renal failure: definition and pathogenesis. *Kidney Int Suppl* 1998; 66: S7-10
2. Thadhani R, Pascual M, Nickleit V, Tolckoff-Rubin N, Colvin R. Preliminary description of focal segmental glomerulosclerosis in patients with renovascular disease. *Lancet* 1996; 347: 231-233
3. Star RA. Treatment of acute renal failure. *Kidney Int* 1998; 54: 1817-1831
4. Blanz, R.C. Intrinsic renal failure: Acute. In: The kidney: Physiology and pathophysiology, Seledin, D.W. and Giebisch, G. (eds.), *Raven Press, New York*, 1985. p.p 1863-1884.
5. Miller TR, Anderson RJ, Linas SL *et al.* Urinary diagnostic indices in acute renal failure: a prospective study. *Ann Intern Med* 1978; 89: 47-50
6. Espinel CH, Gregory AW. Differential diagnosis of acute renal failure. *Clin Nephrol* 1980; 13: 73-77
7. Jacob R. Acute renal failure *Indian J. Anaesth* 2003; 47(5):367-372
8. Bastl, Christine, P., Rudnick, M.R. and Narins, R.G. Assessment of renal function: characteristic of the functional and organic forms of acute renal failure. In: In: The kidney: Physiology and pathophysiology, Seledin, D.W. and Giebisch, G. (eds.), *Raven Press, New York*, 1985; p.p 1819- 1836
9. Stein JH, Lifschitz MD, Barnes LD. Current concepts on the pathophysiology of acute renal failure. *Am J Physiol* 1978; 234: F171-F181
10. Donohoe JF, Venkatachalam MA, Bernard DB, Levinsky NG. Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-functional correlations. *Kidney Int* 1978; 13: 208-222
11. Myers BD, Miller DC, Mehigan JT *et al.* Nature of the renal injury following total renal ischemia in man. *J Clin Invest* 1984; 73: 329-341
12. Bayati A, Nygren K, Kallskog O, Wolgast M. The long-term outcome of post-ischaemic acute renal failure in the rat. II. A histopathological study of the untreated kidney. *Acta Physiol Scand* 1990; 138: 35-47
13. Racusen LC, Fivush BA, Li YL, Slatnik I, Solez K. Dissociation of tubular cell detachment and tubular cell death in clinical and experimental "acute tubular necrosis". *Lab Invest* 1991; 64: 546-556
14. Lieberthal, W. Biology of the acute renal failure: Therapeutic implications. *Kidney Int.* 1997; 52: 1102-1115.
15. Iwasaka S, Homma T, Kon V. Site specific regulation in the kidney endothelial and its receptor subtypes. *Kidney Int* 1994; 45: 592-597.
16. Baylis C, Engels K, Samsell L, Harton P. Renal effects of acute endothelial-derived relaxing factor blockade are not mediated by angiotensin II. *Am J Physiol* 1993; 264: F74-F78
17. Molitoris BA. New insights into the cell biology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1991; 1: 1263-1270
18. Molitoris BA. Na(+)-K(+)-ATPase that redistributes to apical membrane during ATP depletion remains functional. *Am J Physiol* 1993; 265: F693-F697
19. Fish EM, Molitoris BA. Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. *N Engl J Med* 1994; 330: 1580-1588

20. Molitoris BA. Cellular bases of ischaemic acute renal failure. In: Acute renal failure, edited by Lazarus, J., Brenner, B., *New York, Churchill Livingstone*, 1993 pp 1-32
21. Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4: 487-525
22. Gailit J, Colflesh D, Rabiner I, Simone J, Goligorsky MS. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol* 1993; 264: F149-F157
23. Goligorsky MS, Lieberthal W, Racusen L, Simon EE. Integrin receptors in renal tubular epithelium: new insights into pathophysiology of acute renal failure. *Am J Physiol* 1993; 264: F1-F8
24. Noiri E, Romanov V, Forest T *et al.* Pathophysiology of renal tubular obstruction: therapeutic role of synthetic RGD peptides in acute renal failure. *Kidney Int* 1995; 48: 1375-1385
25. Goligorsky MS, DiBona GF. Pathogenetic role of Arg-Gly-Asp-recognizing integrins in acute renal failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5700-5704
26. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993; 43: 1160-1178
27. Weinberg JM. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int* 1991; 39: 476-500
28. Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 1996; 271: F477-F488
29. Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 16-19
30. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
31. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 1996; 270: F700-F708
32. Dive C, Hickman JA. Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br J Cancer* 1991; 64: 192-196
33. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-400
34. Lieberthal, W., Triaca, V., Brady, B., Levine, J.: Apoptosis of renal epithelial cells: role of serum deprivation and oxidant injury (abstract). *J. Am. Soc. Nephrol.* 1994; 5: 902
35. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 1995; 82: 349-352
36. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 1996; 10: 587-597
37. Koletsky S. Effects of temporary interruption of renal circulation in rats. *AMA Arch Pathol* 1954; 58: 592-603
38. Solez K, Freshwater MF, Su CT. The effect of propranolol on postischemic acute renal failure in the rat. *Transplantation* 1977; 24: 148-151
39. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74: 1156-1164
40. Shaw SG, Weidmann P, Hodler J, Zimmermann A, Paternostro A. Atrial natriuretic peptide protects against acute ischemic renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1987; 80: 1232-1237
41. Paller MS, Hedlund BE. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. *Kidney Int* 1988; 34: 474-480

42. Yamamoto K, Wilson DR, Bauml R. Outer medullary circulatory defect in ischemic acute renal failure. *Am J Pathol* 1984; 116: 253-261
43. Finn WF. Postischemic acute renal failure. Initiation, maintenance, and recovery. *Invest Urol* 1980; 17: 427-431
44. Solez K. Pathogenesis of acute renal failure. *Int Rev Exp Pathol* 1983; 24: 277-333
45. Malis CD, Cheung JY, Leaf A, Bonventre JV. Effects of verapamil in models of ischemic acute renal failure in the rat. *Am J Physiol* 1983; 245: F735-F742
46. Yagil Y, Myers BD, Jamison RL. Course and pathogenesis of postischemic acute renal failure in the rat. *Am J Physiol* 1988; 255: F257-F264
47. Evan, A.P., Gattone, V.H. and Luft, F.C. Glomerular filtration barrier in ischaemic and nephrotoxic. In: Acute renal failure: correlation between morphology and function. Solez, K. and Whelton, A. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel 1984; 119-133
48. Racusen, L.C. and Solez, K. Podocyte changes in postischemic acute renal failure. In: Acute renal failure: correlation between morphology and function. Solez, K. and Whelton, A. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel 1984; 135-145
49. Venkatachalam MA, Jones DB, Rennke HG, Sandstrom D, Patel Y. Mechanism of proximal tubule brush border loss and regeneration following mild renal ischemia. *Lab Invest* 1981; 45: 355-365
50. Mason J, Torhorst J, Welsch J. Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney Int* 1984; 26: 283-293
51. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24: 261-271
52. Tigerstedt, R., Bergman, P.G.. Niere und kreislauf 1898; *Scand Arch Physiol* 8: 223
53. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension : i. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 1934; 59: 347-379
54. Schmieder RE. Mechanisms for the clinical benefits of angiotensin II receptor blockers. *Am J Hypertens* 2005; 18: 720-730
55. Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993; 87: 1816-1828
56. Richoux JP, Cordonnier JL, Bouhnik J *et al.* Immunocytochemical localization of angiotensinogen in rat liver and kidney. *Cell Tissue Res* 1983; 233: 439-451
57. Mitchell KD, Navar LG. The renin-angiotensin-aldosterone system in volume control. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1989; 3: 393-430
58. Vander AJ. Control of renin release. *Physiol Rev* 1967; 47: 359-382
59. Skott O, Briggs JP. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* 1987; 237: 1618-1620
60. Tobian L, Tomboulian A, Janeczek J. The effect of high perfusion pressures on the granulation of juxtaglomerular cells in an isolated kidney. *J Clin Invest* 1959; 38: 605-610
61. Sušić, D. Sistem renin-angiotenzin. *Medicinska revija* 1977; (1): 53-65
62. Stanton BA. Regulation of Na⁺ and K⁺ transport by mineralocorticoids. *Semin Nephrol* 1987; 7: 82-90
63. Garty H. Mechanisms of aldosterone action in tight epithelia. *J Membr Biol* 1986; 90: 193-205

64. Mc Caa, C.S. and Mc Caa R.E. Role of aldosterone in fluid volume and electrolyte control. In Guyton AC, Taylor AE and Granger HJ (eds) *Circulatory Physiology II : Dynamics and Control of Body Fluids*. Philadelphia: WB Saunders 1975; pp 291-315.
65. Aguilera G, Catt KJ. Regulation of aldosterone secretion by the renin-angiotensin system during sodium restriction in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75: 4057-4061
66. Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. *N Engl J Med* 1988; 318: 1657-1666
67. Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 1991; 9: 3-15
68. Johnston CI, Fabris B, Jandeleit K. Intrarenal renin-angiotensin system in renal physiology and pathophysiology. *Kidney Int Suppl* 1993; 42: S59-S63
69. Linz W, Scholkens BA, Ganten D. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens A* 1989; 11: 1325-1350
70. Wolf G. Molecular mechanisms of angiotensin II in the kidney: emerging role in the progression of renal disease: beyond haemodynamics. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1131-1142
71. Gavras H, Brunner HR, Laragh JH *et al*. Malignant hypertension resulting from deoxycorticosterone acetate and salt excess: role of renin and sodium in vascular changes. *Circ Res* 1975; 36: 300-309
72. Cottone S, Mangano MT, Fulantelli MA *et al*. Treatment of malignant hypertension with an angiotensin converting enzyme inhibitor. *Clin Ther* 1989; 11: 511-520
73. Griswold W, McNeal R, O'Connor D, Reznik V, Mendoza S. Oral converting enzyme inhibitor in malignant hypertension. *Arch Dis Child* 1982; 57: 235-237
74. Rasmussen S, Brahm M, Nielsen MD, Giese J, Larsen S, Brun C. Postpartum renal failure and malignant hypertension treated with captopril. *Scand J Urol Nephrol* 1983; 17: 209-212
75. Monnens L, Drayer J, De JM. Malignant hypertension in a child with hemolytic-uremic syndrome treated with captopril. *Acta Paediatr Scand* 1981; 70: 583-585
76. DiBona GF, Sawin LL. The renin-angiotensin system in acute renal failure in the rat. *Lab Invest* 1971; 25: 528-532
77. Kontogiannis J, Burns KD. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol* 1998; 274: F79-F90
78. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann NY Acad Sci* 1992; 669: 7-20
79. Langseth, L. From the Editor: Antioxidants and Diseases of the Brain. *Antioxidant Vitamins Newsletter* 1993; 4:3
80. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-724
81. Percival, M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. 1998; Rev. 10/98
82. Bahorun, T. Soobrattee, MA. Luximon-Ramma, V. Aruoma, OIFree Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet Journal of Medical Update* 2006; Vol. 1, No. 2
83. Sies, H. "Oxidative stress: introductory remarks". In H. Sies, (Ed.). *Oxidative Stress*. London: Academic Press. 1985; pp. 1-7.

84. Docampo R. "Antioxidant mechanisms". In J. Marr and M. Müller, (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. London: Academic Press. 1995; pp. 147–160
85. Rice-Evans CA, Gopinathan V. Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. *Essays Biochem* 1995; 29: 39-63
86. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 247-258
87. Jacob R.A., The Integrated Antioxidant System. *Nutr Res* 1995;15(5):755-766
88. Hennekens CH, Gaziano JM. Antioxidants and heart disease: epidemiology and clinical evidence. *Clin Cardiol* 1993; 16: I10-I13
89. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992; 18: 1-29
90. Bland JS., Oxidants and Antioxidants in Clinical Medicine: Past, Present, and Future Potential. *J Nutr Environ Med* 1995;5:255-280
91. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Freire-Garabal M, Barros-Dios JM. Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 599-613
92. Kontush K, Schekatolina S. Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1031: 249-262
93. Boothby LA, Doering PL. Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann Pharmacother* 2005; 39: 2073-2080
94. Prasad KN. Rationale for using high-dose multiple dietary antioxidants as an adjunct to radiation therapy and chemotherapy. *J Nutr* 2004; 134: 3182S-3183S
95. Sen CK. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1747-1758
96. Schiffrin EL, Touyz RM. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H435-H446
97. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 581-587
98. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2175-2183
99. Redon J, Oliva MR, Tormos C *et al*. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 2003; 41: 1096-1101
100. Fortuno A, Oliván S, Beloqui O *et al*. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens* 2004; 22: 2169-2175
101. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346: 1954-1962
102. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; 95: 588-593
103. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T *et al*. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97: 1916-1923

104. Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC. Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension* 2001; 37: 781-786
105. Heitzer T, Wenzel U, Hink U *et al.* Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* 1999; 55: 252-260
106. Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 2004; 109: 1795-1801
107. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844
108. Paravicini TM, Chrissobolis S, Drummond GR, Sobey CG. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke* 2004; 35: 584-589
109. Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD. Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res* 2003; 93: 573-580
110. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M *et al.* Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 2000; 106: 1521-1530
111. Kako K, Kato M, Matsuoka T, Mustapha A. Depression of membrane-bound Na⁺-K⁺-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am J Physiol* 1988; 254: C330-C337
112. Vasko KA, DeWall RA, Riley AM. Effect of allopurinol in renal ischemia. *Surgery* 1972; 71: 787-790
113. Malis CD, Bonventre JV. Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. A model for post-ischemic and toxic mitochondrial damage. *J Biol Chem* 1986; 261: 14201-14208
114. Jaber BL, Pereira BJ, Bonventre JV, Balakrishnan VS. Polymorphism of host response genes: implications in the pathogenesis and treatment of acute renal failure. *Kidney Int* 2005; 67: 14-33
115. Kappus H. Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance, in *Oxidative Stress*, edited by SIE5 H, New York, Academic Press, 1985; pp 273—310
116. Brawn MK, Fridovich I. Increased superoxide radical production evokes inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1985; 260: 922-925
117. Weitberg AB, Weitzman SA, Clark EP, Stossel TP. Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J Clin Invest* 1985; 75: 1835-1841
118. Fliss H. Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Mol Cell Biochem* 1988; 84: 177-188
119. Greene EL, Paller MS. Oxygen free radicals in acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1991; 17: 124-132
120. Gamelin LM, Zager RA. Evidence against oxidant injury as a critical mediator of postischemic acute renal failure. *Am J Physiol* 1988; 255: F450-F460
121. Paller MS. Free radical-mediated postischemic injury in renal transplantation. *Ren Fail* 1992; 14: 257-260

122. Petho-Schramm A, Mielke W, Vetterlein F, Schmidt G. Effects of diltiazem and allopurinol in postischemic microcirculatory changes in the rat kidney. *Int J Microcirc Clin Exp* 1991; 10: 155-168
123. Scaduto RC, Jr., Gattone VH, Grotyohann LW, Wertz J, Martin LF. Effect of an altered glutathione content on renal ischemic injury. *Am J Physiol* 1988; 255: F911-F921
124. Arrick BA, Nathan CF, Griffith OW, Cohn ZA. Glutathione depletion sensitizes tumor cells to oxidative cytolysis. *J Biol Chem* 1982; 257: 1231-1237
125. Paller MS. Renal work, glutathione and susceptibility to free radical-mediated postischemic injury. *Kidney Int* 1988; 33: 843-849
126. Yang HC, Gattone VH, Martin LF, Grotyohann LW, McElroy J, Scaduto RC, Jr. The effect of glutathione content on renal function following warm ischemia. *J Surg Res* 1989; 46: 633-636
127. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem* 1990; 36: 15-19
128. Drabkin D. and Austin H. Spectrophotometric studies preparations from washed blood cells. *J Biol Chem* 1935; 112: 51-65
129. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969; 244: 6056-6063
130. Beutler E. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. Catalase. In Beutler E, ed. Grune and Stratton, New York: 1982; pp 105-106
131. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169
132. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 1974; 30: 665-667
133. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358
134. Mandal AK, Haygood CC, Bell RD *et al.* Effects of acute and chronic splenectomy on experimental acute renal tubular lesions. *J Lab Clin Med* 1978; 92: 698-711
135. Bowmer CJ, Nichols AJ, Warren M, Yates MS. Cardiovascular responses in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Br J Pharmacol* 1983; 79: 471-476
136. Kawano Y, Yoshida K, Matsuoka H, Omae T. Chronic effects of central and systemic administration of losartan on blood pressure and baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1994; 7: 536-542
137. Nunez E, Hosoya K, Susic D, Frohlich ED. Enalapril and losartan reduced cardiac mass and improved coronary hemodynamics in SHR. *Hypertension* 1997; 29: 519-524
138. Schiffrin EL, Thome FS, Genest J. Vascular angiotensin II receptors in SHR. *Hypertension* 1984; 6: 682-688
139. Satoh C, Fukuda N, Hu WY, Nakayama M, Kishioka H, Kanmatsuse K. Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 37: 108-118

140. Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 1998; 32: 59-64
141. Yoshioka M, Aoyama K, Matsushita T. Effects of ascorbic acid on blood pressure and ascorbic acid metabolism in spontaneously hypertensive rats (SH rats). *Int J Vitam Nutr Res* 1985; 55: 301-307
142. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10045-10048
143. Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y *et al.* Systemic and Regional Hemodynamic Responses to Tempol in Angiotensin II-Infused Hypertensive Rats. *Hypertension* 2001; 37: 77-83
144. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S *et al.* p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 1997; 80: 45-51
145. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 2001; 89: 408-414
146. Landmesser U, Cai H, Dikalov S *et al.* Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 2002; 40: 511-515
147. Li JM, Wheatcroft S, Fan LM, Kearney MT, Shah AM. Opposing roles of p47phox in basal versus angiotensin II-stimulated alterations in vascular O₂- production, vascular tone, and mitogen-activated protein kinase activation. *Circulation* 2004; 109: 1307-1313
148. Miloradovic Z, Jerkic M, Jovovic D *et al.* Bosentan and losartan ameliorate acute renal failure associated with mild but not strong NO blockade. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2476-2484
149. Crabos M, Coste P, Paccalin M *et al.* Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 55-65
150. Jerkic M, Miloradovic Z, Jovovic D *et al.* Relative roles of endothelin-1 and angiotensin II in experimental post-ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 83-94
151. Lopau K, Hefner L, Bender G, Heidbreder E, Wanner C. Haemodynamic effects of valsartan in acute renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1592-1597
152. de Richelieu LT, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. NO-independent mechanism mediates tempol-induced renal vasodilation in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F1227-F1234
153. Majid DS, Kopkan L. Nitric oxide and superoxide interactions in the kidney and their implication in the development of salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 946-952
154. Adler S, Huang H. Impaired regulation of renal oxygen consumption in spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1788-1794
155. Dobrian AD, Schriver SD, Prewitt RL. Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension* 2001; 38: 361-366

156. Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* 1999; 33: 1353-1358
157. Meng S, Cason GW, Gannon AW, Racusen LC, Manning RD, Jr. Oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 2003; 41: 1346-1352
158. Park JB, Touyz RM, Chen X, Schiffrin EL. Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2002; 15: 78-84
159. Russo C, Olivieri O, Girelli D *et al.* Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1998; 16: 1267-1271
160. Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML *et al.* Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 2002; 39: 269-274
161. Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA *et al.* Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int* 2000; 58: 658-673
162. Rubinger D, Wald H, Gimelreich D *et al.* Regulation of the renal sodium-dependent phosphate cotransporter NaPi2 (Npt2) in acute renal failure due to ischemia and reperfusion. *Nephron Physiol* 2005; 100: 1-12
163. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975; 1: 16-19
164. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79: 8-15
165. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991; 353: 265-267
166. Paszty C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 1994; 94: 899-903
167. Thiernemann C, Patel NS, Kvale EO *et al.* High density lipoprotein (HDL) reduces renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1833-1843
168. Lote CJ, Harper L, Savage CO. Mechanisms of acute renal failure. *Br J Anaesth* 1996; 77: 82-89
169. Legrand M, Payen D. Understanding urine output in critically ill patients. *Ann Intensive Care* 2011; 1: 13
170. Benes J, Chvojka J, Sykora R *et al.* Searching for mechanisms that matter in early septic acute kidney injury: an experimental study. *Crit Care* 2011; 15: R256
171. Campos R, Shimizu MH, Volpini RA *et al.* N-acetylcysteine prevents pulmonary edema and acute kidney injury in rats with sepsis submitted to mechanical ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302: L640-L650
172. Lucchi L, Bergamini S, Iannone A *et al.* Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. *Artif Organs* 2005; 29: 67-72
173. Bolterman RJ, Manriquez MC, Ortiz Ruiz MC, Juncos LA, Romero JC. Effects of captopril on the renin angiotensin system, oxidative stress, and endothelin in normal and hypertensive rats. *Hypertension* 2005; 46: 943-947

174. Koh KK, Ahn JY, Han SH *et al* . Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 905-910
175. Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Abe Y. ROS during the acute phase of Ang II hypertension participates in cardiovascular MAPK activation but not vasoconstriction. *Hypertension* 2004; 43: 117-124
176. Inal M, Altinisik M, Bilgin MD. The effect of quercetin on renal ischemia and reperfusion injury in the rat. *Cell Biochem Funct* 2002; 20: 291-296
177. Bonini MG, Mason RP, Augusto O. The Mechanism by which 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidene-1-oxyl (tempol) diverts peroxynitrite decomposition from nitrating to nitrosating species. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 506-511
178. Samuni A, Goldstein S, Russo A, Mitchell JB, Krishna MC, Neta P. Kinetics and mechanism of hydroxyl radical and OH-adduct radical reactions with nitroxides and with their hydroxylamines. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 8719-8724
179. Yuan YV, Kitts DD, Godin DV. Heart and red blood cell antioxidant status and plasma lipid levels in the spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74: 290-297
180. Krishna MC, Samuni A, Taira J, Goldstein S, Mitchell JB, Russo A. Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of heme proteins. Kinetics and mechanism. *J Biol Chem* 1996; 271: 26018-26025
181. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R277-R297
182. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 2002; 91: 406-413
183. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M *et al*. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998; 32: 488-495
184. Xu X, Zhao W, Wan W *et al*. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade reduces oxidative stress after myocardial infarction in rats. *Exp Physiol* 2010; 95: 1008-1015
185. Kakadiya J, Patel D, Shah N. Effect of hesperidin on renal complication in experimentally induced renal damage in diabetic Sprague dawley rats. *Journal of Ecobiotechnology* 2010; 2/2: 45-50,
186. Cvetković T, Todorović D, Đorđević VB, Pavlović D, Nikolić J, Kocić G, Jevtović-Stoimenov T. Aktivnost katalaze u bubrezima kod različitih modela akutne insuficijencije, *Acta biologica iugoslavica - serija C: Physiologica et pharmacologica acta*, 2004; vol. 40, no. 1-3, pp. 117-123
187. Samuni A, Winkelsberg D, Pinson A, Hahn SM, Mitchell JB, Russo A. Nitroxide stable radicals protect beating cardiomyocytes against oxidative damage. *J Clin Invest* 1991; 87: 1526-1530
188. Yamanobe T, Okada F, Iuchi Y, Onuma K, Tomita Y, Fujii J. Deterioration of ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in SOD1-deficient mice. *Free Radic Res* 2007; 41: 200-207
189. Aydogdu N, Atmaca G, Yalcin O, Batcioglu K, Kaymak K. Effects of caffeic acid phenethyl ester on glycerol-induced acute renal failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 575-579
190. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem* 2000; 205: 1-11

191. Heeba GH. Angiotensin II receptor blocker, losartan, ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Pharmacology* 2011; 87: 232-240
192. Therrien F, Lemieux P, Belanger S, Agharazii M, Lebel M, Lariviere R. Protective effects of angiotensin AT1 receptor blockade in malignant hypertension in the rat. *Eur J Pharmacol* 2009; 607: 126-134
193. Fujii T, Takaoka M, Ohkita M, Matsumura Y. Tempol protects against ischemic acute renal failure by inhibiting renal noradrenaline overflow and endothelin-1 overproduction. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 641-645

Biografski podaci

Milan Ivanov rođen je u Leskovcu 04.02.1983. god. gde je završio srednju medicinsku školu, smer - farmaceutski tehničar. Biološki fakultet u Beogradu upisao je školske 2001/02. godine. Diplomirao je novembra meseca 2006. godine sa prosečnom ocenom 9.06. Pri kraju studija počinje da volontira na Institutu za medicinska istraživanja u Beogradu, u grupi za kardiovaskularnu fiziologiju. Nakon diplomiranja upisuje doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru: Animalna i humana fiziologija. Na Institutu za medicinska istraživanja, u grupi za kardiovaskularnu fiziologiju nastavlja da volontira još sedam meseci nakon čega u julu mesecu 2007. stupa u radni odnos kao istraživač pripravnik. Početkom 2010. godine biva izabran u istraživača saradnika. Od 2007. do danas Milan Ivanov učestvuje na dva naučnoistraživačka projekta sa osnovnih istraživanja (projekat br. 145054, projekatu br. 175096), jednom projektu iz programa integralnih i interdisciplinarnih istraživanja (projekat br. 46010), i na dva međunarodna projekta u okviru bilateralnih saradnji između Slovačke i Srbije (projekat br SK-SRB-0026-29) i Hrvatske i Srbije (projekat br.69-00-49/2010-02). Kao rezultat ukupne dosadašnje istraživačke aktivnosti Milan Ivanov, pored brojnih saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima, ima i pet radova štampanih u celini: jedan rad u kategoriji M21 i četiri rada u kategoriji M23. Milan Ivanov je član Društva fiziologa Srbije (DFS) od 2008 god. Kroz članstvo u DFS član je i „International society for pathophysiology“.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани- Иванов Милан

број индекса АВ 060130

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**УЛОГА АНГИОТЕНЗИНА II И РЕАКТИВНИХ ВРСТА КИСЕОНИКА ТОКОМ
РАЗВОЈА АКУТНЕ БУБРЕЖНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОЈ
ХИПЕРТЕНЗИЈИ**

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

У Београду,

3.9.2012.

Потпис докторанта

Иванов Милан

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Милан Иванов

Број индекса: АВ060130

Студијски програм: Анимална и хумана физиологија (Биомедицинска физиологија)

Наслов рада: **УЛОГА АНГИОТЕНЗИНА II И РЕАКТИВНИХ ВРСТА
КИСЕОНИКА ТОКОМ РАЗВОЈА АКУТНЕ БУБРЕЖНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ
У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОЈ ХИПЕРТЕНЗИЈИ**

Ментор: др Зоран Милорадовић, виши научни сарадник

Ментор: др Јелена Ђорђевић, вандредни професор

Потписани Милан Иванов

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

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

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

У Београду, 3.9.2012.

Потпис докторанта

Милан Иванов

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

УЛОГА АНГИОТЕНЗИНА II И РЕАКТИВНИХ ВРСТА КИСЕОНИКА ТОКОМ РАЗВОЈА АКУТНЕ БУБРЕЖНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОЈ ХИПЕРТЕНЗИЈИ

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Београду, 3.9.2012.

Потпис докторанта

Urošević Miroslav

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.