



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Sonja M. Ilić**

**PROTEKTIVNI EFEKTI KVERCETINA I  
AMINOGLVANIDINA KOD PACOVA SA  
AKUTNOM BUBREŽNOM INSUFICIJENCIJOM  
IZAZVANOM CISPLATINOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2017.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Sonja M. Ilić**

**PROTECTIVE EFFECTS OF QUERCETIN AND  
AMINO GUANIDINE ON RATS WITH ACUTE  
RENAL FAILURE INDUCED BY CISPLATIN**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2017.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Doc. dr Nenad Stojiljković, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Naslov: Protektivni efekti kvercetina i aminogvanidina kod pacova sa akutnom bubrežnom insuficijencijom izazvanom cisplatinom

Rezime: Cisplatin ima značajan terapijski efekat kod različitih vrsta malignih oboljenja. Njegova upotreba je ograničena zbog nastanka sporednih efekata, naročito nefrotoksičnosti. Kvercetin je prirodni flavonoid koji štiti membranske lipide, nuklearnu DNK i proteine od oksidativnog oštećenja inhibišući oksidativni stres i inflamaciju. Aminogvanidin je inhibitor inducibilne azot oksid sintaze, inhibiše formiranje azot monoksida i reaguje sa peroksinitritom. Cilj ovog istraživanja je bio ispitivanje mehanizma nefrotoksičnosti cisplatina kao i protektivnih efekata kvercetina i aminogvanidina kod pacova sa cisplatinom izazvanom nefrotoksičnošću. Eksperimenti su izvedeni na 48 Wistar pacova podeljenih u 6 grupa po 8 životinja. Kontrolna grupa je dobijala fiziološki rastvor (1 ml/dan) intraperitonealno (i.p.) 9 dana. Životinje u grupama Q i AG su predstavljale pozitivne kontrole i primale i.p. kvercetin (50 mg/kg), tj. aminogvanidin (100 mg/kg) tokom 9 dana. Grupa CIS je dobila jednokratno cisplatin i.p. (8 mg/kg). Životinje u CISQ grupi tretirane su istom dozom cisplatina i kvercetinom (50 mg/kg) i.p. tokom 9 dana. Grupa CISAG je tretirana istom dozom cisplatina i aminogvanidinom (100 mg/kg) i.p. tokom 9 dana. Kvantitativna evaluacija strukturnih i funkcionalnih oštećenja bubrega izazvanih cisplatinom je vršena pomoću patohistoloških, biohemijskih i morfometrijskih analiza. Aplikacija cisplatina je izazvala izraženu nefrotoksičnost sa porastom serumskog kreatinina i ureje. Značajno povećanje malondialdehida, uznapredovalih produkata oksidacije proteina i smanjenje katalaze u tkivu bubrega CIS grupe ukazuje na oksidativni stres kao jednog od mehanizama cisplatinom izazvane nefrotoksičnosti. Ultrastrukturalne promene u bubregu nakon tretmana cisplatinom bile su u vidu uvećanja glomerula, infiltracije zapaljenskih ćelija, zadebljanja glomerularne bazalne membrane i edema i vakuolizacije ćelija proksimalnih tubula. Primena kvercetina i aminogvanidina je zaštitila bubreg od oksidativnog oštećenja i nefrotoksičnog dejstva cisplatina. Rezultati ove studije ukazuju da kvercetin i aminogvanidin umanjuju posledice oksidativnog stresa u bubregu kod pacova izazvanih cisplatinom, i dovode do značajnog smanjenja morfoloških i funkcionalnih oštećenja u bubregu izazvanih cisplatinom.

Naučna oblast: Medicina  
Naučna disciplina: Fiziologija

Ključne reči: Cisplatin, nefrotoksičnost, oksidativni stres, kvercetin, aminogvanidin, morfometrija, pacovi

UDK: 615.277.03:616.61-008.6]:547.972.3+615.355(043.3)

CERIF klasifikacija: B470 Fiziologija

Tip licence kreativne zajednice: CC BY-NC-ND

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

Ennad Stojiljkovic, assistant professor, University of Nis, Faculty of Medicine

Title:

Protective effects of quercetin and aminoguanidine on rats with acute renal failure induced by cisplatin

Abstract:

Cisplatin has a significant therapeutic effects in treatment of different types of cancers. Its usefulness is limited by side effects, particularly nephrotoxicity. Quercetin is natural flavonoid which protects membrane lipids, nuclear DNA and proteins, from oxidative damage through its strong capacity to inhibit oxidative stress and inflammation. Aminoguanidine is an inhibitor of inducible nitric oxide synthase which inhibits generating of nitric oxide and reacts with peroxynitrite. The aim of this study was to investigate the mechanism of cisplatin nephrotoxicity and protective effects of quercetin and aminoguanidine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Experiments were done on 48 Wistar rats divided into 6 groups of 8 animals each. The control group received saline (1 ml/day) intraperitoneally (i.p.) for 9 days. Animals in the Q and AG groups, serving as positive controls, received quercetin i.p. (50 mg/kg) and aminoguanidine i.p. (100 mg/kg) for 9 days. CIS group received cisplatin in a single dose of 8 mg/kg i.p. Animals in CISQ group received the same dose of cisplatin and quercetin (50 mg/kg) i.p. for 9 days. Animals in CISAG group received the same dose of cisplatin and aminoguanidine (100 mg/kg) i.p. for nine days. Quantitative evaluation of cisplatin-induced structural and functional alterations of kidneys was performed by histopathological, biochemical and morphometric analyses. Treatment with cisplatin caused a severe nephrotoxicity which was evidenced by an elevation of serum urea and creatinine levels. The significant increase in malondialdehyde levels and advanced oxidative protein products and decrease of catalase in kidneys of rats in CIS group indicated that one of mechanisms of cisplatin nephrotoxicity is mediated through oxidative stress. Ultrastructural changes in kidney after cisplatin treatment included enlargement of glomeruli, infiltration, thickened of glomerular basement membrane and oedema and vacuolization of tubular cells. Quercetin and aminoguanidine administration protected kidney tissue against the oxidative damage and the nephrotoxic effect caused by cisplatin. The results from our study indicate that quercetin and aminoguanidine attenuate oxidative-stress in cisplatin-treated rats and significantly reduce morphological and functional kidney alterations induced by cisplatin.

Scientific Field:

Medicine

Scientific  
Discipline:

Physiology

Key Words:

Cisplatin, nephrotoxicity, oxidative stress, quercetin, aminoguanidine, morphometry, rats

UDC:

615.277.03:616.61-008.6]:547.972.3+615.355(043.3)

CERIF  
Classification:

B470 Physiology

Creative  
Commons  
License Type:

**CC BY-NC-ND**

“We can only draw our future clearly and wisely if we know the paths that have led us to the present days”

Adlai Stevenson

*Mom Đedu,  
koji je bio moja najveća podrška i učitelj,  
izvor mudrosti, znanja, spokoja i ljubavi.*

Za izradu ove doktorske disertacije iskrenu zahvalnost dugujem:

Mom mentoru, Doc. dr Nenadu Stojiljkoviću, za nesebičnu pomoć, uloženi trud i rad, dragocene savete i sugestije, posvećeno vreme i konstantnu stručnu, prijateljsku i moralnu podršku u svakom trenutku realizacije ovog istraživanja;

Prof. dr Slavimiru Veljkoviću za ukazano poverenje, savete i iskrenu podršku;

Prof. dr Gordani Kocić za korisne sugestije, podršku i stručno usmeravanje;

Prof. dr Gordani Stojanović za ljubaznost, poverenje, vredne savete i stručnu pomoć u pripremi i izradi ovog istraživanja;

Prof. dr Ivanu Jovanoviću za nesebičnu kolegijalnu i stručnu pomoć;

Svim kolegama i osoblju Katedre za fiziologiju za podršku, strpljenje i razumevanje;

Svojoj porodici za razumevanje i bezrezervnu podršku.

## SPISAK NAJČEŠĆE KORIŠĆENIH SKRAĆENICA

AG – aminogvanidin

AIF – faktor koji indukuje apoptozu

AOPP – uznapredovali produkti oksidacije proteina

AP-N – aminopeptidaza N

ATP – adenzin trifosfat

CAT – katalaza

CYP – citohrom P450

DFO – deferoksamin

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

ER – endoplazmatski retikulum

ERK – ekstracelularnim signalom regulisana kinaza

GBM – glomerularna bazalna membrana

GF – glomerularna filtracija

GGT –  $\gamma$ -glutamil-transpeptidaza

GR – glutation reduktaza

GSH – glutation

GSH-Px – glutation peroksidaza

GST – glutation-S-transferaza

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vodonik peroksid

HOCl – hipohlorna kiselina

IFN  $\gamma$  – interferon- $\gamma$

IL – interleukin

i.p. – intraperitonealno

JNK – jun N-terminalna kinaza

Kf – koeficijent ultrafiltracije

LPS – lipopolisaharid

MAPK – mitogen aktivisana protein-kinaza

MDA – malondialdehid

MPO – mijeloperoksidaza

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NF- $\kappa$ B – nuklearni transkripcioni faktor B

NO – azot monooksid

NO<sub>2</sub> i NO<sub>3</sub> – nitriti i nitrati

NOS (nNOS, iNOS, eNOS) – azot oksid sintaza (neuralna, inducibilna, endotelna)

O<sub>2</sub><sup>-</sup> – superoksidni anjon

OH – hidroksilni anjon

ONOO – peroksinitrit

PAF – faktor aktivacije trombocita

PKC – protein kinaza C

PUMA- $\alpha$  – modulator apoptoze regulisan tumor supresorom p53

RNK – ribonukleinska kiselina

RVK – reaktivne vrste kiseonika

RVA – reaktivne vrste azota

SH – tiolne grupe

SOD – superoksid dismutaza

TNF- $\alpha$  – faktor nekroze tumora- $\alpha$

XO – ksantin oksidaza



## SADRŽAJ

1. UVOD .....	10
2. PREGLED LITERATURE .....	11
2.1. Cisplatin kao antitumorski lek.....	11
2.1.1. Nefrotoksičnost cisplatina .....	13
2.1.2. Uloga oksidativnog i nitrozativnog stresa kod cisplatinke nefrotoksičnosti .....	18
2.1.3. Uloga inflamatornog odgovora kod cisplatinke nefrotoksičnosti.....	21
2.1.4. Nastanak apoptoze kod cisplatinke nefrotoksičnosti .....	23
2.2. Kvercetin .....	26
2.2.1. Antioksidativna aktivnost kvercetina .....	28
2.3. Aminogvanidin.....	29
2.3.1. Antioksidativna aktivnost aminogvanidina .....	31
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	34
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA .....	35
4.1. Biohemijske analize .....	36
4.2. Određivanje količine proteina .....	36
4.3. Određivanje koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP) u homogenatu .....	36
4.4. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (LPO).....	36
4.5. Određivanje aktivnosti katalaze .....	37
4.6. Histopatološka ispitivanja .....	37
4.7. Morfometrijska analiza .....	37
4.8. Statistička analiza.....	38
5. REZULTATI.....	39
5.1. Rezultati biohemijskih analiza krvi pacova.....	39
5.2. Rezultati analize markera oksidativnog stresa u tkivu bubrega .....	42
5.3. Rezultati histopatoloških ispitivanja .....	44
5.4. Rezultati morfometrijskih ispitivanja bubrega.....	53
5.4.1. Morfometrijska analiza proksimalnih tubula .....	53
5.4.2. Morfometrijska analiza distalnih tubula.....	54
5.4.3. Morfometrijska analiza glomerula .....	56
6. DISKUSIJA.....	59
6.1. Protektivno dejstvo kvercetina na akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvanu cisplatinom .....	72
6.2. Protektivno dejstvo aminogvanidina na akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvanu cisplatinom .....	77
7. ZAKLJUČCI.....	81
8. LITERATURA.....	83
BIOGRAFIJA AUTORA .....	119

## 1. UVOD

Hemoterapija je već više godina najčešći vid terapije za stotine hiljada novootkrivenih pacijenata koliko godišnje oboleli od malignih tumora. Novi i efikasniji lekovi su produžili životni vek mnogim pacijenatima i u nekim slučajevima rezultirali remisijom i izlečenjem.

Primena hemoterapije u lečenju karcinoma datira od početka 20. veka kada je primena aminopterina i azotnog iperita u kliničkoj praksi obezbedila neophodni stimulans za razvoj antitumorskih lekova. Ishod hemoterapije ne zavisi samo od osetljivosti tumora na lek već i od važnih farmakokinetičkih faktora kao što su apsorpcija leka, metabolizam i eliminacija, koji u najvećoj meri određuju dozu, raspored i način primene leka.

Citostatici deluju na ćelijskom nivou različitim mehanizmima čiji je krajnji cilj ubijanje malignih ćelija. Citostatski lekovi inhibiraju, odnosno remete sintezu makromolekula (DNK, RNK) i funkcije ćelijskih organela. Zbog brojnih neželjnih dejstava citostatika, veoma je teško odrediti optimalnu dozu i učestalost primene hemoterapije. Ukoliko je doza mala onda nema adekvatnog antitumorskog efekta, dok ukoliko je prevelika onda toksičnost leka može izazvati neželjene efekte pa čak i ugroziti život pacijenta. Većina neželjenih efekata hemoterapije je reverzibilna i oni nestaju nakon završetka hemoterapije. Vreme potrebno da se neka neželjena dejstva hemoterapije otklone i povrati normalna funkcija organizma varira od osobe do osobe i zavisi od mnogih faktora, uključujući i opšte zdravstveno stanje bolesnika, vrstu primenjenih lekova, itd. Neka neželjena dejstva mogu potrajati i više meseci ili godina pre nego što potpuno nestanu. Ponekad neželjena dejstva mogu trajati i doživotno, ako na primer hemoterapija izazove trajno oštećenja srca, bubrega, pluća i drugih organa.

Cisplatin je antitumorski lek koji sadrži platinu. Delotvoran je kod velikog broja malignih oboljenja. Međutim, jedan od najčešćih faktora koji ograničavaju njegovu kliničku upotrebu jeste nefrotoksičnost. Pretpostavlja se da je jedan od glavnih mehanizama u nastanku nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom generisanje slobodnih radikala koji dovode do oštećenja bubrežnog tkiva peroksidacijom lipida, oksidativnim oštećenjem proteina i reakcijom sa DNK. Shodno tome, danas se u velikoj meri ispituje primena antioksidanasa istovremeno sa aplikacijom cisplatina kako bi se neutralisalo dejstvo slobodnih radikala i umanjile neželjene posledice oksidativnog stresa. Ova istraživanja ukazuju da se neželjeni efekti hemoterapije na ovaj način smanjuju i da se primenom različitih antioksidanasa mogu sve više i bolje neutralisati.

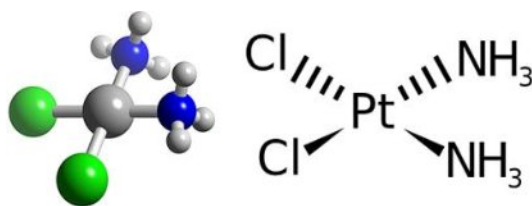
## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Cisplatin kao antitumorski lek

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum) pripada grupi antitumorskih lekova. Ima značajan terapijski efekat kod velikog broja malignih oboljenja i često se koristi, uglavnom u sklopu kombinovanih hemoterapijskih protokola, za lečenje brojnih solidnih tumora kao što su: tumori testisa (uključujući i ekstragonadne tumore germinativnih ćelija), karcinomi ovarijuma, mikrocelularni i nemikrocelularni karcinomi pluća, karcinomi skvamoznih ćelija glave i vrata itd. Uz to, pokazano je da cisplatin ima antitumorsku aktivnost i kod: karcinoma grlića materice, karcinoma mokraćne bešike, osteosarkoma, melanoma, neuroblastoma, karcinoma ezofagusa.

Cisplatin je sintetisao Michel Peryone 1845. godine, a njegovu strukturu opisao je Alfred Wegner 1893. godine. Njegove citotoksične osobine prvi je zapazio Barnett Rosenberg i utvrdio da cisplatin deluje kao inhibitor ćelijske deobe (Daugaard i sar., 1989; Rosenberg i sar., 1965). Američka asocijacija za hranu i lekove je 1978. dozvolila kliničku upotrebu cisplatina kod karcinoma bešike, cerviksa, jednjaka, glave, vrata, jajnika i testisa (Lebwohl i sar., 1998).

Cisplatin je neorgansko jedinjenje, hidrosolubilni kompleks koji sadrži u centru atom platine okružen sa dva atoma hlora i dve amonijum grupe (Slika 1).



Slika 1. Hemijska struktura cisplatina

Cisplatin se može davati kao monoterapija ili u kombinaciji sa drugim antiproliferativnim lekovima. Da bi se dobio optimalni terapijski rezultat uz minimalna neželjena dejstva, doza cisplatina se mora bazirati na kliničkom, renalnom i hematološkom statusu pacijenta. Uobičajene doze, kada se lek daje intravenski kao pojedinačni agens, kreću se u rasponu od 50 do 120 mg/m<sup>2</sup> telesne površine tokom 6 do 8 časova jednom u 3-4 nedelje u skladu sa tipom tumora i statusom pacijenta ili 15 do 20 mg/m<sup>2</sup> telesne površine /dnevno u intravenskoj infuziji tokom pet uzastopnih dana, što se ponavlja na svake 3-4 nedelje. Iako se cisplatin obično daje intravenski, ovaj lek se daje i intraperitonealnom instilacijom kod pacijenata sa

intraperitonealnim malignitetima. Ovim načinom primene može se postići visoki gradijent koncentracije između koncentracije leka u plazmi i koncentracije leka u intraperitonealnoj šupljini.

Platina se široko distribuira u telesnim tečnostima i tkivima, tako da tri časa nakon infuzije lek dostiže najveću koncentraciju u bubrezima, a nakon četrdeset časova u jetri, crevima, kao i testisima odnosno jajnicima. Cisplatin i njegovi metaboliti koji sadrže platinu se brzo i ekstenzivno vezuju za proteine tkiva i plazme, uključujući albumine, gama-globuline i transferin. Tri sata posle bolus injekcije i dva sata po završetku tročasovne infuzije 90% platine biva vezano za proteine plazme (Weiner i sar., 1983), a samo oko 10% preostalog cisplatina ostaje aktivno u nevezanom obliku.

Ispitivanja koja su imala za cilj određivanje poluvremena eliminacije leka pokazala su veoma velike varijacije između rezultata dobijenih u različitim studijama: 2 do 72 časa kod zdravih dobrovoljaca i 1 do 240 časova kod pacijenata u terminalnoj fazi bubrežne insuficijencije. Cisplatin se uglavnom eliminiše preko bubrega. Njegov klirens plazme je bifazičan, primarni poluživot je 25-49 minuta (distribucija), a sekundarni poluživot 59-73 sati (eliminacija). Posle uzastopnih terapija, izgleda da se platina nagomilava u telesnim tkivima, a u nekim tkivima se registruje i 6 meseci posle primene leka. Eliminacija cisplatina i njegovih metabolita kod pacijenata sa bubrežnom insuficijencijom nije u potpunosti ispitana. Cisplatin se može eliminisati iz sistemske cirkulacije dijalizom, ali samo u roku od 3 sata po davanju i to u ograničenoj meri.

Iako mehanizam dejstva nije detaljno utvrđen, smatra se da cisplatin deluje slično kao bifunkcionalni alkilirajući agensi, tj. unakrsnim vezivanjem i poremećajem funkcije DNK. Primarno farmakodinamsko dejstvo cisplatina vezano je za inhibiciju ćelijskog rasta, i to nespecifično za ciklus i fazu. Uz tumorske ćelije, ciljna tkiva delovanja cisplatina su uglavnom ona koja se odlikuju brzom ćelijskom proliferacijom, kao što su kostna srž, gastrointestinalna sluznica, gonade.

Antikancerogena svojstva cisplatina proističu iz relativno lake supstitucije hlora sa nukleofilnim mestima poput nukleinskih kiselina DNK lanca. Pre nego što se cisplatin veže, obično se konvertuje u aktivan oblik. Konverzija se dešava unutar ćelije, gde su niže koncentracije hlorida, što podstiče razmenu hlorida za molekule vode i samim tim nastaje aktivna hidratizovana forma cisplatina. Zatim se ovaj oblik cisplatina vezuje za različite makromolekule, što najviše doprinosi njegovoj citotoksičnosti.

Detaljnije studije o molekularnom mehanizmu delovanja cisplatina otkrile su sposobnost cisplatina da formira kovalentne veze sa nukleofilnim mestima, naročito sa guaninom

prisutnim u svim DNK lancima. Pošto je cisplatin bifunkcionalni agens, sposoban je da se veže za dva mesta u DNK lancu. Ovo rezultuje formiranjem među- i unutar -lančanih unakrsnih veza koje ometaju ćelijsku transkripciju i replikaciju. Regulatorni mehanizmi zatim detektuju abnormalnu DNK i tako aktiviraju lanac mehanizama za popravku DNK (repair system), što na kraju izaziva ćelijsku smrt (apoptoza) (Jamieson i sar., 1999). Otkriće da su ćelije deficijentne u sistemima za reparaciju oštećenja DNK osetljivije na ćelijsku smrt izazvanu cisplatinom podržava koncept da cisplatin ostvaruje svoj antitumorski efekat oštećenjem DNK.

Glavna prepreka za širu upotrebu cisplatina je upornost ozbiljnih toksičnih sporednih efekata. Odnos koncentracija leka u plazmi i uticaja na kliničku toksičnost nije jasno utvrđen. Ipak, rezultati in vitro studija ukazuju da samo cisplatin koji nije vezan za proteine ili njegovi produkti koji sadrže platinu imaju citotoksično dejstvo. Postoje određeni dokazi da pacijenti sa oslabljenom funkcijom bubrega mogu da imaju u plazmi povišene koncentracije platine koja nije vezana za proteine (Reece i sar., 1987).

U toksičnosti ovog leka spadaju ototoksičnost, gastrotoksičnost, mijelosupresija i alergijske reakcije (Hartmann i sar., 2000; Hartmann i sar., 2003), ali glavni dozno-zavisni neželjeni efekat cisplatina jeste nefrotoksičnost (Sastry i sar., 2005; Arany i sar., 2003).

### **2.1.1. Nefrotoksičnost cisplatina**

Dok većina alkilirajućih antineoplastičnih lekova prouzrokuju oštećenja DNK isključivo kod brzorastućih ćelija, cisplatin može da izazove i značajne promene na relativno mirnim, zdravim ćelijama proksimalnih tubula bubrega (Naughton i sar., 2008; Sirota i sar., 2011; dos Santos i sar., 2012). Nefrotoksičnost cisplatina otkrivena je pre više od 25 godina, tj. od uvođenja cisplatina u terapiju. Prvi izveštaj o nefrotoksičnosti cisplatina kod životinja dat je 1971. godine (Kociba i sar., 1971), kada su prikazane histopatološke promene u vidu akutne tubularne nekroze udružene sa azotemijom.

Rana klinička upotreba cisplatina je pokazala dozno-zavisnu cisplatinom indukovanu akutnu bubrežnu insuficijenciju kod 14 do 100% bolesnika, incidenca je varirala u zavisnosti od kumulativne doze (Goldstein i sar., 1983). Incidenca renalne insuficijencije u skorašnjim iskustvima sa korišćenjem hidratacije i diureze je oko 20-30% bolesnika (Hartmann i sar., 1999).

Nefrotoksičnost se povećava sa dozom i frekvencijom administracije i kumulativnom dozom cisplatina (Madias i sar., 1978). Pik koncentracije slobodne platine u plazmi korelira sa nefrotoksičnošću (Reece i sar., 1987), a studija Hartmann i sar. (1999) ukazuje da nivo

glomerularne filtracije i koncentracije magnezijuma u plazmi opadaju posle cisplatina datog u dozi većoj od  $50\text{mg}/\text{m}^2$  telesne površine, ali se ne menjaju pri dozama manjim od  $20\text{mg}/\text{m}^2$  telesne površine. I druge varijable koreliraju sa povećanim rizikom od nefrotoksičnosti, uključujući ženski pol, godine starosti, pušenje i hipoalbuminemiju (de Jongh i sar., 2001; de Jongh i sar., 2003). Uopšteno, već postojeća bubrežna disfunkcija je rizik za akutnu bubrežnu insuficijenciju.

Cisplatin se uglavnom izlučuje putem bubrega, dok je njegovo intestinalno izlučivanje minimalno. Međutim, lek se akumulira u bubrezima, pa čak i netoksični nivoi u krvi dostižu toksične nivoe u bubrezima. Koncentracije cisplatina u tubularnim epitelnim ćelijama su i do pet puta veće nego u krvi. Daugaard i sar. (1989) su utvrdili da se cisplatin nakuplja u tubularnim ćelijama S3 segmenta proksimalnih bubrežnih tubula. Cisplatinom-izazvana renalna toksičnost je dozno-zavisna, i time ograničava mogućnost povećanja doze. Shodno tome može biti umanjena efikasnost antitumorske terapije.

Bubrežna insuficijencija, koja je povezana sa tubularnim oštećenjem, obično se registruje tokom druge nedelje po davanju leka, a manifestuje se povećanjem nivoa kreatinina, ureje i mokraćne kiseline u serumu i/ili smanjenjem klirensa kreatinina. Visoke ili ponovljene doze cisplatina mogu da pojačaju težinu i produže trajanje bubrežne insuficijencije i mogu da dovedu do ireverzibilne bubrežne insuficijencije.

Patofiziologija cisplatinске nefrotoksičnosti je proučavana tri decenije. Oštećenja koja cisplatin izaziva u bubregu možemo podeliti u četiri grupe:

- a) oštećenja tubula, koja se često manifestuju kroz poremećaje bilansa vode i elektrolita i akutnu bubrežnu insuficijenciju nastalu nekrozom tubula;
- b) vaskularna oštećenja malih i srednjih arterija koja rezultiraju smanjenjem protoka krvi u bubregu;
- c) oštećenja glomerula, što je ređe od drugih nefropatija, i uzrokuje nastanak proteinurije, hematurije, nefrotskog sindroma i
- d) oštećenja intersticijuma, kod dugotrajne primene cisplatina, koja mogu napredovati do hronične bubrežne insuficijencije.

Uobičajeno, bubrežna insuficijencija izazvana cisplatinom u eksperimentalnim modelima se karakteriše smanjenim protokom krvi kroz bubrežni parenhim već tri sata nakon aplikacije leka, što uslovljava smanjeni nivo glomerularne filtracije sa porastom vaskularnog otpora nekoliko dana nakon prve doze cisplatina, na šta ukazuju povećanja koncentracija kreatinina i ureje u krvi. Urin može da sadrži glukozu i male količine proteina. Hipomagnezijemija je takođe česta, naročito posle ponovljenih doza cisplatina, čak i kada nema pada glomerularne filtracije.

Takođe, mogu nastati hiponatremija, hipokalcemija i hipokalijemija (Ali i sar., 2008; Goren i sar., 2003; Peres i sar., 2013). Poliurija se javlja u dve faze. Prva faza poliurije i pad osmolarnosti urina se javlja 24-48h nakon administracije cisplatina, a zatim spontano prestaje. Druga faza povećanog izlučivanja urina se javlja 72-96 sati nakon primene cisplatina. Ova faza je udružena sa smanjenjem nivoa glomerularne filtracije i duže vreme perzistira (Kishore i sar., 2000). Enzimurija je takođe važan pokazatelj oštećenja proksimalnih tubula bubrega cisplatinom i zapaženo je da se u urinu pojačano izlučuju alanin aminopeptidaza, alkalna fosfataza, gama-glutamil transpreptidaza i N-acetil-beta-D-glukozaminidaza (Skalova, 2005; Uehara i sar., 2005). Oporavak bubrežnih funkcija se obično javlja u periodu od 2-4 nedelje, mada su registrovani i duži periodi oporavka, kao i nepotpuni oporavak. Progresivna i permanentna nefrotoksičnost se javlja i pored uzastopnih tretmana i preventivnih mera (Santoso i sar., 2003; Taguchi i sar., 2005).

Nedavne studije pokušavaju da razjasne ćelijske i molekularne mehanizme nefrotoksičnosti, povezujući je sa akumulacijom cisplatina unutar proksimalnih tubula, intraćelijskom konverzijom leka u toksične metabolite, oštećenjem DNK, disfunkcijom mitohondrija, oksidativnim i nitrozativnim stresom, inflamatornim odgovorom, aktivacijom transdukcije signala i intraćelijskih glasnika, i aktiviranjem apoptotičnih puteva (dos Santos i sar., 2012; Pabla i sar., 2008a; Sanchez-Gonzalez i sar., 2011a).

Cisplatin je jedinjenje male molekulske težine koje se slobodno filtrira u glomerul i gotovo u potpunosti doprema u urin. U ovom procesu, lek prodire u tubularne ćelije i dostiže visoke koncentracije u ćelijama proksimalnih tubula unutrašnjeg korteksa bubrega i spoljašnje medule (S3 segment), tj. mesto najdrastičnije pogođeno cisplatinom. Dozno-zavisno oštećenje može se takođe pojaviti u distalnim i sabirnim tubulima (Taguchi i sar., 2005; Kuhlmann i sar., 1997). Proksimalni tubuli gube epitel odgovoran za prolazak supstanci u ćelije, što dovodi do povećanih nivoa potencijalnih toksina u tubularnoj tečnosti i pasivne difuzije toksina u tubularne ćelije (Sanchez-Gonzalez i sar., 2011a).

Cisplatin se odstranjuje putem bubrega glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom (Yao i sar., 2007). Cisplatin ulazi u tubularne ćelije prostom ili olakšanom difuzijom, što dovodi do nesrazmerne akumulacije leka. Koncentracije cisplatina u bubregu su više nego u krvi, što ukazuje na aktivnu akumulaciju leka u bubrežnim parenhimalnim ćelijama. U prethodnim studijama koje su koristile isečke bubrega (Safirstein i sar., 1984), kulture bubrežnih epitelih ćelija (Endo i sar., 2000), i izolovane perfundovane segmente proksimalnih tubula (Kolb i sar., 2003) dokazan je bazolateralno-apikalni transport cisplatina. U novijim studijama su identifikovana dva različita membranska transportera koja mogu da

prenose cisplatin u ćeliju: Ctr1 i OCT. Ctr1 je transporter bakra koji posreduje u preuzimanju cisplatina u ćelije sisara (Ishida i sar., 2002), uključujući ćelije karcinoma jajnika (Holzer i sar., 2004). Ctr1 je visoko eksprimiran u bubrezima odraslih i lokalizovan na bazolateralnoj membrani proksimalnih tubula. Nishodna regulacija ekspresije Ctr1 u ćelijama bubrega in vitro smanjuje ulazak cisplatina i citotoksičnost, ukazujući na važnost Ctr1 za ulazak cisplatina u ove ćelije (Pabla i sar., 2009). Tri izoforme OCT-a su identifikovane kod ljudi. OCT2 je glavni organski katjonski transporter u bubrezima, OCT1 u jetri, a OCT3 je naročito izražen u placenti. Kod pacova, OCT1 je glavni transporter kod proksimalnih tubula (S1 i S2 segment), sa niskim nivoima ekspresije u spoljnim medularnim proksimalnim tubulima (S3 segment); dok je OCT2 uglavnom izražen u S2 i S3 segmentima proksimalnih tubula i predstavlja kritičan transporter u prenosu cisplatina i citotoksičnosti u ovim tubulima bubrega (Ludwig i sar., 2004; Ciarimboli i sar., 2005; Filipski i sar., 2008; Yonezawa i sar., 2006). Dokazano je da cisplatin inhibiše vezivanje drugih supstrata OCT2 koji imaju isti mehanizam transporta. Takođe, cimetidin, supstrat OCT2, smanjuje vezivanje cisplatina i citotoksičnost in vitro (Pabla i sar., 2009; Ludwig i sar., 2004; Ciarimboli i sar., 2005) i nefrotoksičnost cisplatina in vivo (Ciarimboli i sar., 2010). Skorašnja ispitivanja su ukazala na veoma bitnu ulogu OCT2 u posredovanju u preuzimanju cisplatina u bubregu i njegovoj citotoksičnosti. Dokazano je da su OCT1/OCT2-deficijentni miševi zaštićeni od oštećenja tubula izazvanih cisplatinom (Filipski i sar., 2009; Ciarimboli i sar., 2010). Značaj ovih otkrića doprinosi prevenciji nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom.

Metabolizam cisplatina nije u potpunosti razjašnjen. Studije na pacovima i miševima su ukazale da se cisplatin metaboliše u bubregu u još potentniji toksin. Ovaj proces započinje formiranjem konjugata glutationa u cirkulaciji što je verovatno posredovano glutation-S-transferazom (Townsend i sar., 2009; Sadzuka i sar., 1994). Kako konjugati glutationa prolaze kroz bubreg, njih gama glutamil transpeptidaza (GGT) koja je eksprimovana na površini ćelija proksimalnih tubula, razlaže na cisteinil-glicin konjugate (Townsend i sar., 2002; Townsend i sar., 2003). Zatim nastale cisteinil-glicin konjugate aminopeptidaze N (AP-N), koje su takođe eksprimovane na površini ćelija proksimalnih tubula, razlažu na cisteinske konjugate (Townsend i sar., 2003), koji se zatim transportuju u ćelije proksimalnih tubula bubrega gde se dalje metabolišu posredstvom cistein-S-konjugat beta liaze (C-S liaze) do visoko reaktivnih tiola (Townsend i sar., 2002; Townsend i sar., 2003; Zhang i sar., 2003), koji interreaguju sa makromolekulima i na kraju dovode do smrti bubrežnih ćelija (Wainford i sar., 2008). Pokazano je da su miševi deficijentni u GGT-u bili rezistentni na nefrotoksične efekte cisplatina (Hanigan i sar., 2001), kao i da inhibicija GGT-a acivicinom štiti od



nefrotoksičnosti cisplatina (Hanigan i sar., 1994). Inhibicija C-S liazna sa aminooksiacetičnom kiselinom štiti miševu tretiranu sa 15 mg/kg cisplatina (Zhang i sar., 2003).

Smatra se da jedinjenja platine svoj citotoksični efekat postižu vezivanjem za DNK. U tečnoj sredini, hloridi se zamenjuju molekulima vode, stvarajući pozitivno naelektrisane jone. Hidratirani oblici cisplatina lako reaguju sa nuklearnom DNK, formirajući kovalentne veze sa purinskim bazama, pre svega u N7 položaju, što rezultuje među- i unutar-lančanim unakrsnim vezama (dos Santos i sar., 2012; Cepeda i sar., 2007). Veza platine i DNK stvara produkte ili nova jedinjenja koja aktiviraju različite ćelijske odgovore, uključujući signalizaciju za oštećenje DNK, reparaciju DNK i ćelijsku smrt (Wang i sar., 2005). Unakrsne veze između DNK i cisplatina dovode do smanjenja replikacije i transkripcije, što dovodi do zastoja ćelijskog ciklusa i na kraju apoptoze (Jiang i sar., 2008; dos Santos i sar., 2012; Cepeda i sar., 2007).

Pored nuklearne, cisplatin može oštetiti i i mitohondrijalnu DNK, a takođe utiče i na druge komponente ćelija kao što su RNK, proteini i fosfolipidi. Oksidativna oštećenja i zapaljenje mogu da objasne efekte povezane sa toksičnošću cisplatina. Nekoliko dokaza ukazuju da je nefrotoksičnost cisplatina povezana uglavnom sa mitohondrijskim reaktivnim vrstama kiseonika (RVK) (Pabla i sar., 2008b; Jiang i sar., 2008; Cullen i sar., 2007).

Jedan deo nefrotoksičnosti cisplatina nastaje i zbog vaskularnog oštećenja i vazokonstrikcije, koje proističu uglavnom iz endotelne disfunkcije i poremećaja vaskularne autoregulacije. Cisplatin može imati direktne toksične efekte na vaskularni endotel, dovodeći do oštećenja mikrovaskulature. Mikroangiopatija može prouzrokovati smanjenje protoka krvi u bubregu (BPK), što dalje može dovesti do smanjenja nivoa glomerularne filtracije (GF) i hipoksičnih oštećenja tubula. I kod ljudi i eksperimentalnih životinja, smanjenje GF i BPK, verovatno odražavaju povećanje otpora bubrežne vaskulature koji nastaje zbog perzistentne bubrežne vazokonstrikcije. Dalje, bubrežna vazokonstrikcija pojačava efekat tubuloglomerularne sprege (Yatsu i sar., 2003).

Oštećenja glomerula su ređa od vaskularnih i tubulointersticijalnih, jer se uglavnom javljaju posle duge izloženosti cisplatinu. Cisplatin može oštetiti glomerularne ćelije direktno i izazvati morfološke promene glomerula i poremećenu propustljivost glomerularne membrane izazivajući proteinuriju. Ultrastrukturne promene izazvane cisplatinom uključuju oštećenja svih komponenti glomerula: glomerularne kapilare, uključujući njihove endotelijalne ćelije; bazalnu membranu, podocyte, mezangijalne ćelije i parijetalne ćelije Boumanove kapsule (Kohn i sar., 2002).

Cisplatinom-indukovana oštećenja glomerula odlikuje značajan pad GF i BPK koji je povezan sa izraženim smanjenjem ultrafiltracijskog koeficijenta (Kf) i porastom bubrežnog vaskularnog otpora, ukazujući na preglomerularnu vazokonstrikciju (Safirstein 1986 i sar., Winston i sar., 1985). Cisplatin menja veličinu glomerularne filtracije, uglavnom smanjenjem propustljivosti filtracione membrane, koja nastaje kao rezultat kontrakcije mezangijalnih ćelija (Delbancut i sar., 1994). Osim toga, in vitro studije na izolovanim glomerulima i mezangijalnim ćelijama pokazale su da cisplatin izaziva kontrakciju, apoptozu i proliferaciju mezangijalnih ćelija (Delbancut i sar., 1994; Ju i sar., 2014), a da u ovi efekti posredovani endogenim vazoaktivnim agensima oslobođenih iz glomerularnih ćelija, uključujući angiotenzin II, endotelin-1, faktor aktivacije trombocita (PAF), RVK i NO (Rodriguez-Barbero i sar., 2000).

### **2.1.2. Uloga oksidativnog i nitrozativnog stresa kod cisplatinke nefrotoksičnosti**

Oksidativni stres označava stanje neravnoteže između produkcije i uklanjanja reaktivnih vrsta (RV). Ovo može biti posledica hiperprodukcije RV ili iscrpljivanja antioksidativne odbrane (Halliwell i sar., 2006). RV je zajednički termin za oksidativne agense, uključujući slobodne radikale i neke neradikale, koji mogu biti pretvoreni u radikale. Štetno delovanje RV potiče iz potrebe da postignu elektronsku stabilnost i zato reaguju sa prvim susednim stabilnim molekulom uzimajući njegov elektron i započinjući na taj način lančanu reakciju koja dovodi do biohemijskih, strukturnih i funkcionalnih promena biomolekula (Rimbach i sar., 1999). Slobodni radikali su reaktivni molekuli zbog prisustva jednog ili više neuparenih elektrona. Oni se formiraju u ljudskom telu ili kao bitan medijator u vitalnim procesima uključujući neurotransmisiju i inflamatorne reakcije ili kao sporedni proizvod koji nema ulogu u stvarnom procesu. Kod aerobnih vrsta, smanjenje kiseonika je od posebnog interesa. Ovo smanjenje obuhvata vezivanje većine kiseonika za vodonik dajući vodu, proces uključen u oksidativnu fosforilaciju. Međutim, mali deo kiseonika (oko 1-3%) se samo delimično smanjuje tokom ove redoks reakcije (Magder, 2006). Kao rezultat nastaju slobodni radikali koji mogu ili da oksidiraju druga jedinjenja ili lako formiraju radikale. Ovako nastali delimično redukovani oblici kiseonika su kolektivno opisani kao reaktivne vrste kiseonika (RVK). Postoje i reaktivne vrste azota (RVA), ugljenika i sumpora. Najznačajnije mesto zauzimaju RVK, gde spadaju radikali kao što su: superoksidni anjon ( $O_2^-$ ), hidroksil (HO), peroksil ( $RO_2$ ), alkoksil (RO), hidroperoksil ( $HO_2$ ) radikali, ali i neradikali kao što su: vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), hipohlorna kiselina (HOCl), ozon ( $O_3$ ), singletni kiseonik ( $O_2$ ) (Halliwell i sar., 2006).

RVK se produkuju u ćeliji u različitim procesima kao što su: oksidativna fosforilacija u

mitohondrijama, fagocitoza, biotransformacija egzogenih i endogenih supstrata, metabolisanje etanola, enzimske reakcije koje katalizuju oksidaze, sinteza eikosanoida, reakcije oksidoredukcije u prisustvu metala s promenljivom valencom, lipidna peroksidacija nezasićenih masnih kiselina. Oni imaju sposobnost oštećenja skoro svih biomolekula u ćeliji (nukleinskih kiselina, nukleotida, tiola), narušavaju međumolekulske veze i strukture ćelijskih membrana.

Superoksidni anjon ( $O_2^-$ ) može biti generisan dodavanjem elektrona molekularnom kiseoniku, naročito u respiratornom lancu, ali i enzimi kao što su ksantin oksidaza (XO), azot oksid sintetaza (NOS) i nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat (NADPH) oksidaza takođe endogeno proizvode ovaj anjon (Evans i sar., 1999). Superoksidni anjon ima dominantno štetno dejstvo: indukuje lipidnu peroksidaciju i oštećuje ćelijske membrane. U fiziološkim uslovima ne izaziva toksične efekte jer ga enzim superoksid-dismutaza (SOD) transformiše u manje aktivan vodonik-peroksid.

Vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) se stvara redukcijom molekula kiseonika sa dva elektrona ili nekim enzimima koji se nalaze u mikrozomima i peroksizomima (Schrader i sar., 2004). Vodonik peroksid nije slobodan radikal, prekursor je hidroksi radikala (OH) u reakciji katalizovanoj jonima metala ( $Fe^{2+}$  ili  $Cu^+$ ) poznatoj kao Fentonova reakcija. Vodonik peroksid je takođe preteča hipohlorne kiseline (HOCl) u reakciji katalizovanoj mijeloperoksidazom (MPO) (Halliwell i sar., 2006). Iako se ne može definisati kao slobodni radikal jer nema nesparenih elektrona i predstavlja najstabilniji intermedijarni produkt redukcije kiseonika, vodonik-peroksid ipak ispoljava neke toksične efekte. To se pre svega odnosi na poremećaj u deponovanju kalcijuma u mitohondrijama, sa konsekvativnim nagomilavanjem kalcijuma u citosolu i gubitkom sulfhidrilnih grupa belančevina: ovo je kritičan događaj u genezi ćelijskih oštećenja u oksidativnom stresu.

Hidroksilni radikal je najreaktivniji intermedijarni produkt delimične redukcije kiseonika. Ako se vodonik-peroksid ne ukloni, može da reaguje sa fero jonima i formira potentnije RVK, kakav je hidroksilni radikal (Fentonova reakcija). Hidroksilni radikal, in situ, oštećuje mitohondrijalnu membranu (izazivajući gubitak produkcije ATP-a i energije), oštećuje DNK, oštećuje membranu ćelije modifikujući membranske belančevine i izaziva lipidnu peroksidaciju - što je dovoljno za ireverzibilno oštećenje ćelije.

Značajne reaktivne vrste azota (RVA) su azot monoksid (NO.), azot dioksid ( $NO_2$ ) i peroksinitrit (ONOO), dok su iz grupe neradikalnih RVA najznačajniji azot dioksid anjon ( $NO_2^-$ ), azot trioksid ( $N_2O_3$ ), nitronijum jon ( $NO_2^+$ ), peroksinitritni anjon (ONOO<sup>-</sup>), alkil peroksinitrit (ROONO), singlet i triplet nitroksil anjon (NO<sup>•</sup>), nitrozil katjon (NO<sup>+</sup>) i nitril

hlorid ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ) (Kohen i sar., 2002; Suarez i sar. 2013).

Reaktivne vrste azota nastaju iz NO i ovaj molekul sintetišu porodice azot oksid sintaza (NOS) koje katalizuju formiranje NO iz L-arginina u prisustvu NADPH i  $\text{O}_2$ , kada nastaju i L-citrulin i NADP. Kao i RVK i RVA reaguju lako sa praktično svim biomolekulima uključujući DNK, RNK, belančevine, ugljene hidrate i lipide, čime oštećuju napadnute molekule (Diplock i sar., 1998).

S druge strane, celularni antioksidanti sistemi mogu se podeliti u dve glavne grupe: neenzimski i enzimski:

1) enzimsku antioksidantnu zaštitu čine enzimi koji katalitički otklanjaju RVK kao što su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST);

2) neenzimska antioksidantna zaštita obuhvata liposolubilne (vitamin A,  $\beta$ -karoten, vitamin E, koenzim Q) i hidrosolubine antioksidanse (vitamin C, glutation (GSH), albumin, apoceruloplazmin, apotransferin, apoferitin, bilirubin, mokraćna kiselina, poliamini), koji predstavljaju sekundarnu liniju odbrane (Sims-Robinson i sar., 2013).

Mehanizmi kojima ova jedinjenja ostvaruju svoju aktivnost u sistemu antioksidantne zaštite se razlikuju i najčešće su to sakupljači slobodnih radikala, donori protona, inhibitori enzimskih sistema, helatori jona prelaznih metala itd.

Značajni dokazi ukazuju da je oksidativni stres uključen u oštećenje bubrega pri administraciji cisplatina. Produkcija RVK, iscrpljivanje antioksidativnih sistema i stimulacija akumulacije produkata lipidne peroksidacije u bubregu su navedeni kao glavni mehanizmi povezani sa nefrotoksičnošću izazvanom cisplatinom. Ovi mehanizmi izazivaju aktivaciju oksidativnog metabolizma stimulišući proizvodnju RVK u oštećenim mitohondrijama, uključujući superoksidne anjone ( $\text{O}_2^-$ ), vodonik-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hidrosil radikale (OH). Oni takođe mogu narušiti antioksidativne odbrambene mehanizme kao što su GSH, SOD, CAT, i GSH-Px (Chirino i sar., 2009).

Pretpostavlja se da je i nitrozativni stres uključen u oštećenje bubrega cisplatinom. Studije su pokazale da se ćelijski efekti RVK pojačavaju produkcijom velike količine NO, najverovatnije kao posledica indukovane sinteze inducibilnog oblika NOS, što dovodi do kontinuiranog formiranja peroksinitrita (ONOO), koji reakcijom sa superoksidnim anjonima doprinosi oštećenju bubrega cisplatinom.

Uloga nitrozativnog stresa u cisplatinom-indukovanoj nefrotoksičnosti je proučavana praćenjem promena u produkciji NO. Yildirim i sar. (2003) su merili renalne  $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$  koncentracije Griess-ovom reakcijom, peti dan posle tretmana cisplatinom (7 mg/kg, ip.) i

zapazili povećanje indeksa NO proizvodnje. Kasnije, Ozen i sar. (2004) su potvrdili povećanje bubrežne NO<sub>2</sub> / NO<sub>3</sub> produkcije kod pacova tretiranih cisplatinom.

Povećana proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika i azota posle administracije cisplatina izaziva značajno oštećenje struktura i funkcija ćelija, uključujući lipidnu peroksidaciju, nitraciju proteina, inaktivaciju enzima i oštećenja DNK. Shodno tome, ovaj fenomen dovodi do disfunkcije signalizacije za aktivaciju i apoptotičnih i puteva za preživljavanje ćelija, izazivajući ćelijsku smrt i oštećenja bubrega (Ramesh i sar., 2005; Santos i sar., 2007; Chirino i sar., 2009). Ova zapažanja sugerišu da se oksidativni i nitrozativni stres mogu posmatrati kao rani događaji, delimično odgovorni za aktiviranje raznih signalnih puteva koji uzrokuju oštećenja bubrega, i ćelijsku smrt kod nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom (Liu i sar., 2003; Jiang i sar., 2007).

### **2.1.3. Uloga inflamatornog odgovora kod cisplatinske nefrotoksičnosti**

U poslednjih 10 godina identifikovan je veliki broj medijatora inflamatornog oštećenja bubrega. Kelly i sar. (1999) i Deng i sar. (2001) su zapazili povećanje ekspresije faktora nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) u bubregu miševa na modelu cisplatinske nefrotoksičnosti. Da bi pokazali funkcionalnu relevantnost TNF- $\alpha$  u patogenezi cisplatinom indukovane akutne bubrežne insuficijencije Ramesh i sar. (2002) su ispitivali bubrežnu funkciju i patohistološke promene na miševima koji su tretirani cisplatinom u prisustvu ili odsustvu TNF- $\alpha$  inhibitora i kod TNF- $\alpha$  nokaut miševa. Lečenje TNF- $\alpha$  inhibitorima smanjuje cisplatinom indukovanu bubrežnu disfunkciju, a takođe smanjuje histološke promene. TNF- $\alpha$  nokaut miševi takođe imaju manja oštećenja bubrega, a imali su i znatno viši nivo preživljavanja nakon aplikacije cisplatina (Ramesh i sar., 2002). Ovi rezultati, koji su potvrđeni od strane više laboratorija (Tsuruya i sar., 2003a; Kim i sar., 2005), ukazuju na važnu ulogu TNF- $\alpha$  u patogenezi cisplatinske nefrotoksičnosti.

Aktiviranje NF- $\kappa$ B promoviše transkripciju specifičnih gena koji kodiraju inflamatorne medijatore izazivajući imunske, proliferativne, anti-apoptotične i inflamatorne odgovore (Miller i sar., 2010). Ovaj događaj dovodi do povećane ekspresije TNF- $\alpha$  u ćelijama tubula bubrega, važnog medijatora uključenog u sistemsko zapaljenje i akutnu fazu odgovora izazvanog aplikacijom cisplatina. TNF- $\alpha$  može izazvati ćelijsku smrt i oštećenja tkiva neposredno preko TNF receptora tipa 1 (TNFR1) i indirektno izazivanjem jakog inflamatornog odgovora putem TNF receptora tipa 2 (TNFR2). Mnogi od citotoksičnih i proinflamatornih delovanja TNF- $\alpha$  posredovani su preko TNFR1 (Locksley i sar., 2001). Međutim, studije na miševima deficitarnim bilo za TNFR1 ili TNFR2 otkrile su da su

nefrotoksični efekti cisplatina, barem oni posredovani TNF- $\alpha$ , signalizirani preko TNFR2 češće nego preko TNFR1 (Ramesh i sar., 2003). Osim toga, TNF- $\alpha$  / TNFR2 signalizacija doprinosi nefrotoksičnosti cisplatina i može pojačati proapoptotske efekte koji proizilaze iz aktivacije TNFR1.

Faktor nekroze tumora- $\alpha$  je poznat i kao koordinator aktivacije velike mreže proinflamatornih citokina kao što su interleukin-1, 4, 6 (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6), transformišući faktor rasta- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) i protein hemotaksije monocita-1 (MCP-1). Dodatno, TNF- $\alpha$  indukuje ekspresiju adhezivnih molekula, uključujući međućelijski adhezivni molekul 1 (ICAM-1), vaskularni ćelijski adhezioni molekul 1 (VCAM-1), kao i E-selektin, koji izazivaju priliv inflamatornih ćelija u tkiva.

Faktor nekroze tumora- $\alpha$  može biti proizveden od strane različitih imunskih i ne-imunskih ćelija. Da bi utvrdili izvor TNF- $\alpha$ , koji je rezultat cisplatinске nefrotoksičnosti, Zhang i sar., (2007) su proizveli himerične miševе u kojima je koštana srž ablatirana i zamenjena donatorskim ćelijama iz koštane srži ili TNF- $\alpha^+$  ili TNF- $\alpha$  nokaut miševa. Rezultati ove studije ukazali su na to da se znatan deo cirkulišućeg i urinarnog TNF- $\alpha$  nakon administracije cisplatina dobija iz ne-imunskih ćelija, verovatno iz samih epitelnih ćelija bubrega. Proizvodnja TNF- $\alpha$  nakon aplikacije cisplatina upravo umnogome zavisi od RVK, aktivacije nuklearnog transkripcionog faktora B (NF $\kappa$ B) i aktiviranja P38 mitogen aktivisane protein kinaze (MAPK). Sakupljač hidrosilnih radikala dimetiltioureja (DMTU), salicilati i P38 inhibitori, smanjuju kako TNF- $\alpha$  proizvodnju tako i nefrotoksičnost kod miševa tretiranih cisplatinom (Ramesh i sar., 2004; Ramesh i sar., 2005).

Međutim, pojačana signalizacija odgovorna za proizvodnju TNF- $\alpha$  i dalje ostaje nejasna. Zhang i sar. (2008) su ukazali na ulogu Toll-like receptora (TLR), porodicu receptora urođenog odgovora, u proizvodnji citokina i pojavi renalne disfunkcije u slučajevima nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom. Autori su pokazali da je TLR4 bitan u pokretanju intrarenalnog inflamatornog odgovora povezanog sa administracijom cisplatina.

Ekspresija brojnih inflamatornih citokina i hemokina se povećava u bubrezima posle oštećenja bubrega cisplatinom. Međutim, dokazi za funkcionalnu ulogu za mnoge od ovih citokina nedostaju. Na primer, neka istraživanja (Faubel i sar., 2007; Lu i sar., 2008) su utvrdila da je ekspresija IL-1 $\beta$ , IL-18, CX3CL1 i IL-6 povećana kod cisplatinске nefrotoksičnosti. Pored toga, delecija kaspaze 1, koja je odgovorna za stvaranje aktivnog IL-1 $\beta$  i IL-18, smanjuje cisplatinom izazvano oštećenje bubrega i infiltraciju neutrofila in vivo (Faubel i sar., 2004). Međutim, inhibicija ili genetska delecija ovih citokina ne smanjuje cisplatinску nefrotoksičnost, ostavljajući mehanizam kojim kaspaza 1 doprinosi oštećenju

cisplatinom nerazjašnjenim. Takođe, ekspresija interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) je povećana kod cisplatinске nefrotoksičnosti, ali neutrališuća antitela za IFN- $\gamma$  ne pružaju zaštitu od oštećenja bubrega (Tadagavadi i sar., 2010a). Zanimljivo je da su mnogi od ovih citokina ushodno regulisani na TNF-zavisan način (Ramesh i sar., 2002). Može biti da ovi pojedinačni citokini imaju manje uloge u cisplatinскоj nefrotoksičnosti koje je teško eksperimentalno demonstrirati dok inhibicija TNF- $\alpha$  daje bolje efekte zbog kumulativnog delovanja više citokina.

Citokini mogu imati i antiinflamatorno dejstvo. IL-10 je antiinflamatorni citokin koji sprečava aktiviranje leukocita i produkciju proinflamatornih citokina i hemokina (de Waal Malefyt, 2001). Deng i sar. (2001) su pokazali da aplikacija egzogenog IL-10 sprečava povećanu produkciju TNF- $\alpha$ , ekspresiju ICAM-1 i priliv neutrofila u bubreг kao odgovor na cisplatin. IL-10 deficitarni miševi su podložniji cisplatinскоj nefrotoksičnosti i izloženi su većem prilivu neutrofila i većoj ekspresiji proinflamatornih citokina od IL-10<sup>+</sup> tipa miševa (Tadagavadi i sar., 2010a). Deo ovog efekta nastaje zbog produkcije IL-10 od strane dendritskih ćelija.

Pored njihove uloge u patogenezi cisplatinске nefrotoksičnosti, citokini mogu imati dijagnostičku vrednost za ovaj poremećaj. Nivoi nekoliko proinflamatornih citokina, uključujući i TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, interferon gama indukovani protein 10 (IP-10), MCP-1 su povećani u urinu cisplatinom tretiranih miševa (Zhang i sar., 2008). Utvrđeno je da se povećanja nivoa citokina IP-10, liganda hemokina 1 (CXCL1) i faktora stimulacije kolonija granulocita (G-CSF) mogu detektovati u urinu već šest sati posle tretmana cisplatinom, mnogo pre nego povećan nivo kreatinina i ureje u serumu (Zhang i sar., 2008). Isto tako, povećanja urinarnog CXCL1 i G-CSF, IL-2, MCP-1 i IL-8 nivoa zabeležena su tri dana nakon aplikovanja malih doza cisplatina kod pasa (McDuffie i sar., 2010). Merenje urinarnih citokina može omogućiti otkrivanje rane cisplatinске toksičnosti i može biti korisno za određivanje preventivnih mera.

#### **2.1.4. Nastanak apoptoze kod cisplatinске nefrotoksičnosti**

Oštećenja bubrežnih ćelija cisplatinom proučavana su uglavnom in vitro, korišćenjem kultura bubrežnih tubularnih epitelnih ćelija ili sveže izolovanih ćelija. In vitro, niske koncentracije cisplatina prvenstveno dovode do apoptotične ćelijske smrti, dok u većim koncentracijama nastaje nekroza (Lieberthal i sar., 1996; Lee i sar., 2001). In vivo administracija nefrotoksičnih doza cisplatina takođe dovodi do nastanka apoptoze i nekroze u bubregu (Shiraishi i sar., 2000; Megyesi i sar., 1998; Ramesh i sar., 2004).

Nekoliko apoptotičnih puteva učestvuje u cisplatinom izazvanoj ćelijskoj smrti epitelnih ćelija bubrega, uključujući spoljašnji put aktiviran preko receptora smrti, unutrašnji mitohondrijalni put, kao i put stresa endoplazmatskog retikuluma (ER).

Spoljašnji put, iniciran vezivanjem liganada za receptore smrti, dovodi do aktivacije kaspaza 8 i 10, što dalje aktivira kaspazu 3 (Kaushal i sar., 2001; Tsuruya i sar., 2003b). Glavni ligandi uključuju Fas i TNF- $\alpha$  i njihove odgovarajuće receptore (TNFR 1 i 2) (Pabla i sar., 2008b; Sancho-Martínez i sar., 2012) . Dokazi da cisplatin može izazvati apoptozu preko receptora smrti uključuju otkrića da su TNFR1 i Fas-deficijentne bubrežne epitelne ćelije otporne na ćelijsku smrt izazvanu cisplatinom (Tsuruya i sar., 2003b), da cisplatin povećava aktivnost kaspaze 8 (Seth i sar., 2005) i da inhibicija kaspaze 8 smanjuje cisplatinom indukovanu smrt ćelija in vitro (Takeda i sar., 1997). Zapaženo je da je apoptoza ćelija proksimalnih tubula izazvana cisplatinom udružena sa povećanom ekspresijom Fas u bubrežnom tkivu. S druge strane, TNFR1 sadrži “domen smrti” koji nakon vezivanja TNF- $\alpha$ , inicira formiranje kompleksa za aktivaciju kaspaza, dovodeći do apoptoze (Tsuruya i sar., 2003b). Nasuprot tome, TNFR2 ne sadrži “domen smrti” i nije direktno uljučen u inicijaciju apoptoze (Ramesh i sar., 2003).

Nasuprot tome, postoji veliki broj dokaza koji ukazuju da cisplatin aktivira unutrašnji mitohondrijalni put apoptoze. Dakle, izloženost bubrežnih epitelnih ćelija cisplatinu rezultuje translokacijom Bax u mitohondrije, aktiviranjem kaspaze 2, oslobađanjem citohroma C, faktora koji indukuje apoptozu (AIF), SMAC/Diablo, Omi/HtrA2 i endonukleaze G iz mitohondrija i aktiviranjem kaspaze 9 (Jiang i sar., 2006; Wei i sar., 2007a; Jiang i sar., 2009; Yin i sar., 2007; Dursun i sar., 2006). Kaspaze su porodica proteaza ćelijske smrti koje igraju ključnu ulogu u fazi izvršenja apoptoze kod cisplatinom indukovane smrti bubrežnih tubularnih epitelnih ćelija in vitro i in vivo (Jiang i sar., 2009; Fukuoka i sar., 1998; Kaushal i sar., 2001; Yang i sar., 2008). Aktiviranje kaspaza 3, 8 i 9 se javlja već 12 sati nakon tretiranja bubrežnih epitelnih ćelija in vitro cisplatinom (Kaushal i sar., 2001). Inhibicija aktivnosti kaspaza suprimira cisplatinom indukovanu ćelijsku smrt (Jiang i sar., 2009; Kaushal i sar., 2001; Yang i sar., 2008; Jiang i sar., 2004). I p53 zavisna ekspresija kaspaza 6 i 7 (Yang i sar., 2008) i p53-nezavisno aktiviranje kaspaze kroz Bax/Bak posredovano oslobađanje citohroma C (Jiang i sar., 2009) doprinosi cisplatinom indukovanoj smrti ćelija tubularnog epitela. Posle izlaganja signalima smrti, proapoptotski proteini Bax i Bak se strukturno modifikuju i menjaju integritet mitohondrijalne membrane izazivajući oslobađanje apoptogenih faktora kao što su citohrom C (kaspaza aktivator) i faktor koji indukuje apoptozu (AIF), kaspaza-nezavisnih promotora ćelijske smrti. Uprkos oslobađanju citohroma C u odgovoru na



cisplatin, inhibicija citohroma C posredovana aktiviranjem kaspaze pruža samo parcijalnu zaštitu od apoptoze izazvane cisplatinom, što ukazuje na ulogu AIF u ćelijskoj smrti. Pored nishodnih regulatora apoptotičnih puteva i proteina iz Bcl-2 porodice, druga dva važna mehanizma su opisana kod nefrotoksičnosti cisplatina, to su: promotori signalne transdukcije kao što su protein kinaze (MAPK, PI3K i PKB/Akt) i transkripcioni faktori (NF- $\kappa$ B i p53).

Uloga p53 proteina prepoznata je kao kritična za indukciju apoptoze kod cisplatinске nefrotoksičnosti. Tumor supresor p53 izaziva zastoj ćelijskog ciklusa ili apoptozu kao odgovor na oštećenje DNK, aktiviranje onkogenā i hipoksiju (Basset i sar., 2008). Cisplatin aktivira p53 u bubregu in vivo (Wei i sar., 2007a) i bubrežnim epitelnim ćelijama in vitro (Seth i sar., 2005; Cummings i sar., 2002). Studije ukazuju da aktivacija p53 može biti rani znak apoptoze izazvane prisustvom cisplatina, jer promovira aktiviranje kaspaze-2 i oslobađanje AIF iz mitohondrija, ukazujući da je oštećenje DNK izazvano translokacijom AIF i korelira sa p53 (dos Santos i sar., 2012; Sancho-Martinez i sar., 2012; Mukhopadhyay i sar., 2012). Štaviše, farmakološka ili genetska inhibicija p53 transkriptivne aktivnosti smanjuje cisplatinom indukovanu aktivaciju kaspaze i apoptozu in vitro (Seth i sar., 2005; Jiang i sar., 2004; Cummings i sar., 2002), kao i cisplatinom indukovanu apoptozu i oštećenje bubrega in vivo (Wei i sar., 2007b; Molitoris i sar., 2009). Dve ključne tačke regulacije p53 mogu da posreduju u delovanju p53 kod cisplatinom izazvane ćelijske smrti: p53 modulator apoptoze-alfa (PUMA- $\alpha$ ) i p53-indukovan protein sa domenom smrti (PIDD). PUMA- $\alpha$  je proapoptotični protein iz Bcl-2 porodice koji je indukovā cisplatinom na p53-zavisān naćin (Jiang i sar., 2006). Aktiviranje p53 cisplatinom takođe izaziva aktiviranje PIDD, koji zatim aktivira kaspazu 2, što dovodi do oslobađanja AIF iz mitohondrija (Seth i sar., 2005). P53 se može smestiti u mitohondrije u toku ćelijskog stresa gde ima određene netranskripcijske aktivnosti, kao što je održavanje broja kopija mitohondrijalne DNK i proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika (Lebedeva i sar., 2009; Yoshida i sar., 2003a).

Put stresa ER podrazumeva aktiviranje kaspaze 12 i Ca<sup>2+</sup> zavisne fosfolipaze A<sub>2</sub>, dok farmakološka inhibicija ovih enzima smanjuje cisplatinom indukovānu apoptozu (Liu i sar., 2005; Cummings i sar., 2004; Peyrou i sar., 2007). Kaspaza 12, koja se nalazi na citozolnoj strani endoplazmatskog retikuluma, je inicijator ER puta. Ca<sup>2+</sup>-nezavisna fosfolipaza A<sub>2</sub> je još jedan protein povezan sa ER putem ćelijske smrti. Kod bubrežnih tubuluskih ćelija tretiranih cisplatinom, ovaj protein može delovati nishodno na p53 i ushodno na kaspazu-3 (Cummings i sar., 2004).

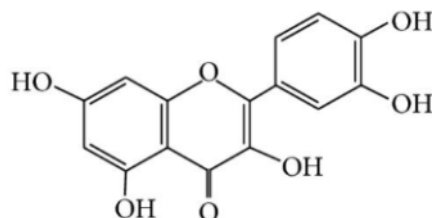
## 2.2. Kvercetin

Nažalost, čak i sa agresivnom hidratacijom, bubrežna toksičnost pri administraciji cisplatina se i dalje javlja. Ovo je podstaklo razvoj efikasnijih preventivnih strategija koje se mogu primenjivati u odnosu na mehanizme nastanka nefrotoksičnosti. Kombinovane strategije koje pogađaju više mehanizama, kao što su smanjenje preuzimanja cisplatina i smanjenje inflamacije, mogu da ponude najbolju šansu za klinički značajnu prevenciju. Međutim, svaka predložena strategija, međutim, mora se pažljivo ispitivati kod životinja koje imaju tumore kako bi se osiguralo da efikasnost hemoterapije cisplatina ne bi bila ugrožena.

Nekoliko eksperimentalnih modela pokazuju zaštitu bubrega antioksidansima kao što su DMTU, melatonin, selen, vitamin E i N acetilcistein (dos Santos i sar., 2012; Pabla i sar., 2008a; Miller i sar., 2010). Od izuzetnog značaja je i činjenica da prirodni antioksidansi mogu smanjiti nivoe RVK u bubrezima, a da pri tome delotvornost cisplatina ostane potpuna.

Flavonoidi pripadaju grupi prirodnih supstanci sa promenljivom fenolnom strukturom i nalaze se u voću, povrću, žitaricama, voćnim napicima, čaju, vinu i kao lekovitom bilju (npr. *Silibum marianum*, *Alpina officinarum*, *Hipericum perforatum*) (Middleton i sar., 1998). Mnoge studije su pokazale da flavonoidi imaju širok spektar bioloških aktivnosti kao što su antikancerogeni, antivirusni, antibakterijski, antioksidansni i antiinflamatorni efekat (Middleton i sar., 1998). Identifikovano je više od 4000 vrsta flavonoida. Flavonoidi uključuju halkone, flavone, flavonole, flavanone, flavanol, antocijanine i izoflavone.

Flavoni se odlikuju planarnom strukturom zbog dvostruke veze u centralnom aromatičnom prstenu (Slika 2). Kvercetin, (3,3,4,5,7-pentahidroksiflavon), je tipičan flavanol prisutan u voću i povrću, semenu, orasima, čaju i vinu, kao i u velikom broju dodataka ishrani (Knekt i sar., 1997).



Slika 2. Strukturna formula kvercetina

Prosečan dnevni unos kvercetina je oko 30 mg u većini zapadnih zemalja, a njegova bioraspoloživost zavisi od metaboličke forme prisutne u hrani. Kvercetin dobijen iz biljnih izvora je u formi kvercetin-konjugata glukoze (kvercetin glukozidi), koje se apsorbuju preko

apikalne membrane enterocita. Na primer, kvercetin koji se obično nalazi u jabukama, luku i zelenom čaju (Scalbert i sar., 2000), zastupljen je uglavnom kao glukozid, odnosno šećer (glukoza, galaktoza, rutinoza ili ksiloza) vezan za jednu od hidroksil grupa flavonola (Middleton i sar., 1993). Oblik flavonoida određuje brzinu apsorpcije. Hollman i sar., (1999) su utvrdili da se glikozilirani oblici kvercetina apsorbuju lakše nego aglikonski. I druge studije su potvrdile da je apsorpcija kvercetina znatno poboljšana njegovom konjugacijom sa šećerom (Hollman i sar., 1997a; Erlund i sar., 2000). Moguće objašnjenje za povećanu apsorpciju jeste omogućavanje apsorpcije glikozida bilo deglikozilacijom (Nemeth i sar., 2003) ili transportom preko nosača (Gee i sar., 2000; Walgren i sar., 2000a, Walgren i sar., 2000b), što rezultuje višim koncentracijama u plazmi i povećanom bioraspoloživosti. Posebno crevna laktaza florizin hidrolaza (LPH) pokazuje određenu aktivnost prema glikozidima flavonoida (Day i sar., 2000) i njena uloga u apsorpciji kvercetina je potvrđena na perfuzionom modelu tankog creva pacova (Sesink i sar., 2003). Nosačima-posredovan transport glikozida kvercetina može uključivati natrijum zavisni transporter glukoze-1 (Gee i sar., 2000). Nakon oslobađanja kvercetina sa transportera, kvercetin glukozidi se hidrolizuju intracelularnom  $\beta$ -glukozidazom (Nemeth i sar., 2003). U nekonjugovanom obliku, apsorpcija kvercetina je manje efikasna i koncentracija u plazmi je manja od 0.33  $\mu\text{mol/l}$ . Zbog hidrofilnog karaktera glukozida, sam kvercetin bez šećera, odnosno aglikon, se apsorbuje pasivnom difuzijom (Griffiths, 1982). Aglikonski oblici flavonoida se mogu lako apsorbovati u epitelne ćelije debelog creva, jer im liposolubilnost olakšava prolazak kroz fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane.

Kada se jednom absorbuju, kvercetin-glukozidi se hidrolizuju i stvaraju kvercetin aglikon koji se dalje metaboliše u metilirane, sulfatne i glukuronidne oblike posredstvom enterocitične transferaze (Hollman i sar., 1996). Metaboliti kvercetina se zatim transportuju u lumen creva, a potom u jetru, gde se odvijaju reakcije konjugacije i formira se kvercetin-3-glukuronid i kvercetin-3-sulfat koji su glavna cikulišuća jedinjenja kvercetina u humanoj plazmi. Metaboliti formirani u tankom crevu i jetri uključuju metilirane, sulfatne i glukuronidne forme (Hollman i sar., 1997b; Day i sar., 2000). Značajan deo tih metabolita može biti izlučen u žuč i vraćen na taj način u lumen creva gde se mogu još jednom, hidrolizovati i reapsorbovati ili izlučiti preko debelog creva.

Normalno, koncentracije kvercetina u plazmi su u opsegu niskih nanomolarnih, ali suplementacijom kvercetina mogu se povećati do visokih nanomolarnih ili niskih mikromolarnih. Nedavna istraživanja vezana za distribuciju kvercetina u tkivima pacova i svinja, pokazala su da nakon suplementacije kvercetina dolazi do njegove akumulacije u

plućima kod pacova, kao i u jetri i bubrezima kod svinja. U zavisnosti od studije, poluživot kvercetina i njegovih metabolita u plazmi je u rasponu od 11 do 28 sati i zavisi od oblika jedinjenja i načina administracije (Hollman i sar., 1996; Conquer i sar., 1998).

Brojne in vitro studije su otkrile različite biološke efekte kvercetina, uključujući indukciju apoptoze, inhibiciju protein kinaze C (PKC), inhibiciju lipoksigenaze, inhibiciju oslobađanja histamina, aktivnosti slične superoksid dismutazi (SOD), modulaciju ćelijskog ciklusa, inhibiciju angiogeneze i inhibiciju angiotenzin konvertujućeg enzima II (Formica i sar., 1995).

### **2.2.1. Antioksidativna aktivnost kvercetina**

U porodici flavonoida, kvercetin je najmoćniji sakupljač RV, uključujući RVK (Cushnie i sar., 2005), i RVA kao što su NO (Haenen i sar., 1999) i ONOO (Heijnen i sar., 2001). Ovi antioksidativni kapaciteti kvercetina pripisuju se specifičnom molekulu koji ima optimalnu konfiguraciju za sakupljanje slobodnih radikala, odnosno katehol grupu u B prstenu i OH grupu na poziciji 3 AC prstena (Heijnen i sar., 2001). Upravo, zbog velikog broja hidroksilnih grupa i konjugovanih  $\pi$  orbitala, kvercetin može sakupljati mitohondrijalne RVK, kao što su  $O_2^-$  - i vodonik peroksid (Heijnen i sar., 2001). Reakcija kvercetina sa  $O_2^-$  dovodi do stvaranja semikvinon radikala i  $H_2O_2$ . Zatim, kvercetin reaguje sa  $H_2O_2$  i smanjuje njegove nivoe u prisustvu peroksidaza i time štiti ćelije od oštećenja. Studije rađene na pacovima pokazale su da kvercetin može imati zaštitnu ulogu u ishemijskim/reperfuzionim oštećenjima različitih vrsta ćelija mozga i srca, ublažavanjem citotoksičnih efekata RVK i smanjenjem apoptoze posredovane mitohondrijama (Sanhueza i sar., 1992, Cevik i sar., 2013; Ghosh i sar., 2013).

Kvercetin je takođe i odličan in vitro antioksidans. Osim toga, utvrđeno je da kvercetin znatno pojačava endogenu antioksidantnu zaštitu zbog svog doprinosa u ukupnom plazma antioksidativnom kapacitetu koji je 6.24 puta veći od referentne vrednosti antioksidansa troloks, dok je na primer doprinos vitamina C i mokraćne kiseline praktično jednak troloksu (Arts i sar., 2004). Kvercetin je posebno poznat po svojoj sposobnosti helatiranja gvožđa i stabilizacije gvožđa. Takođe je dokazana sposobnost kvercetina u direktnoj inhibiciji lipidne peroksidacije (Sorata i sar., 1984).

Poznato je da kvercetin ima i jake antiinflamatorne kapacitete (Orsolice i sar., 2004). Ciklooksigenaze i lipoksigenaze igraju važnu ulogu kao inflamatorni medijatori koji su uključeni u oslobađanje arahidonske kiseline, koja je onda polazna tačka za opšti inflamatorni odgovor. Neutrofili koji sadrže lipoksigenaze stvaraju hemotaktična jedinjenja iz arahidonske kiseline i izazivaju oslobađanje citokina. Utvrđeno je da određena fenol jedinjenja inhibiraju

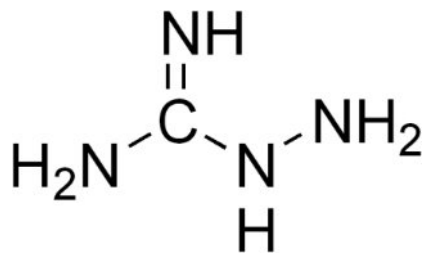
ciklooksigenazu i 5-lipoksigenazne puteve (Ferrandiz i sar., 1990; Laughton i sar., 1991). Ova inhibicija smanjuje oslobađanje arahidonske kiseline (Yoshimoto i sar., 1983). Kvercetin posebno, inhibira aktivnost i ciklooksigenaze i lipoksigenaze, čime umanjuje formiranje tih inflamatornih metabolita (Robak i sar., 1996; Kim i sar., 1998). Pored toga, pokazano je in vitro da kvercetin takođe poseduje antifibrotična (Lee i sar., 2003), antikoagulaciona (Bucki i sar., 2003), antibakterijska (Cushnie i sar., 2005), antiaterogena (Perez-Vizcaino i sar., 2006a), antihipertenzivna (Perez-Vizcaino i sar., 2006b) i antiproliferativna svojstva (Orsolich i sar., 2004, Gulati i sar., 2006). Nadalje, kvercetin direktno menja gensku ekspresiju enzima uključenih u biotransformacije (Pacifici i sar., 2004; Schwarz i sar. 2005) i inhibiše ćelijsku proliferaciju interakcijom sa vezujućim mestima za estrogen (Caltagirone i sar., 1997).

Protektivna svojstva kvercetina, dokazana su i u brojnim studijama nefrotoksičnosti kao i u modelima u kojima je cisplatin izazvao oštećenja različitih tkiva i organa. Upravo ovi rezultati su nas podstakli da ispitamo eventualna protektivna dejstva kvercetina na nefrotoksičnost izazvanu cisplatinom kod pacova. Štaviše, Sanchez-Gonzalez i sar. (2011b) su dokazali da kvercetin ne remeti antitumorski efekat cisplatina. Pored toga, pokazano je da kvercetin inhibiše rast karcinomskih ćelijskih linija in vitro (Yoshida i sar., 1992; Avila i sar., 1994; Hosokawa i sar., 1990; Larocca i sar., 1990; Scambia i sar., 1991) i da flavonoidi, kao antioksidansi, mogu sprečiti karcinogenezu (de Stefani i sar., 1999).

Dodatno, pretpostavlja se da flavonoidi mogu da inhibišu angiogenezu (Fotsis i sar., 1997). Angiogeneza je obično strogo kontrolisani proces u ljudskom telu. Proces angiogeneze je regulisan različitim endogenim angiogenetskim i angiostatičkim faktorima. Patološki, neregulisana angiogeneza se javlja kod karcinoma (Fan i sar., 1995). Inhibitori angiogeneze mogu ometati različite stadijume u angiogenezi, kao što su proliferacija i migracija endotelnih ćelija i formiranje lumena. Među poznatim inhibitorima angiogeneze, verovatno je da flavonoidi igraju važnu ulogu (Fotsis i sar., 1997; Paper, 1998). Međutim, mehanizam inhibicije angiogeneze još uvek nije dovoljno razjašnjen.

### **2.3. Aminogvanidin**

Aminogvanidin (AG),  $\text{HN-NH-C-NH}$ , analog L-arginina, u svojoj hemijskoj strukturi sadrži ostatak gvanidina i hidrazin grupu (Jianmongkol i sar., 2000) (Slika 3). Prvi put je sintetisan redukcijom nitrogvanidina 1892. godine (Lieber i sar., 1939). Takođe se može sintetisati hidratacijom ili hidrolizom jedinjenja vezanih za gvanidin. AG je jedan od mnogih derivata gvanidina, ali ima mnoga zajednička svojstva sa hidrazinima pa se često klasifikuje kao hidrazin.



Slika 3. Hemijska struktura aminogvanidina

Prvi značajniji biološki efekti ovog molekula zapaženi su 1950. godine kada je dokazano da AG inhibiše diamin oksidazu, koja katalizuje oksidativnu deaminaciju biološki aktivnog diamin histamina i putrescina (Sculer, 1952). Drugi važan biološki efekat AG-a je inhibicija inducibilnog oblika azot oksid sintaze (iNOS) (Mustafa i sar., 2002; Sanha i sar., 2004.).

Takođe, postoje studije koje su pokazale da AG smanjuje komplikacije i patofiziološke promene povezane sa prekomernom produkcijom NO u dijabetesu (Corbett i sar., 1992) i eksperimentalno izazvanom autoimunom encefalomijelitisu (Cross i sar., 1994). Neka istraživanja su pokazala i da aminogvanidin, delujući preko regulacije gena povezanih sa apoptozom u hipokampusu, ima zaštitni efekat kod poremećaja učenja i pamćenja kod streptozotocinom-indukovanog dijabetesa pacova, (Firouzjaei i sar., 2014). Štaviše, aminogvanidin utiče na kontra-obrtnu snagu koštanih implantata kod dijabetesa izazvanog streptozotocinom kod pacova (Aiala i sar., 2013).

Utvrđeno je da je AG bezbedan za lečenje komplikacija dijabetesa u dozi od 1 g/l (E Nico i sar., 2013). Glikacija je proces u kome se šećer vezuje za proteine (amino kiseline) bez posredstva enzima. Posebno je saharoza izuzetno moćan proinflamatorni agens koji stvara takozvane, napredne krajnje produkte glikacije (Advanced glycation end products – AGEs) i ubrzava proces starenja. Glikacija takođe promovira rast masnih ćelija oko naših vitalnih organa koje su obeležje dijabetesa i bolesti srca. Istraživanja su pokazala da aminogvanidin može kompetitivno da se veže za rane produkte glikacije, generiše neaktivna jedinjenja koja ne izazivaju unakrsno povezivanje proteina i na taj način sprečavaju stvaranje krajnjih produkata glikacije (Schmitt i sar., 1986). Krajnji produkti glikacije mogu dovesti do promene u funkciji i strukturi ćelija, lezija i oksidativnog stresa matriksa kože što dalje dovodi do usporenog zarastanja rana (Lapolla i sar., 2005; Singh i sar., 2001; Ahmed, 2005). Aminogvanidin može da ubrza zarastanje rana kod dijabetesa blokiranjem nakupljanja krajnjih produkata glikacije što poboljšava uslove za zarastanje rana (Tian i sar., 2013). Štaviše, aminogvanidin se uspešno primenjuje u lečenju mnogih drugih komplikacija

dijabetesa, uključujući dijabetesne nefropatije, aterosklerozu i druge komplikacije (E Nico i sar., 2013; Corbett i sar., 1992; Hammes i sar., 1991; Ozturk i sar., 2012).

### **2.3.1. Antioksidativna aktivnost aminogvanidina**

Veliki broj studija je pokazao da je AG relativno selektivni inhibitor inducibilne NO sintaze i da tako inhibiše NO formaciju i reaguje sa peroksinitritima (Misko i sar., 1993, Cross i sar., 1994; Suzuki i sar., 2002). Azot oksid sintaza (NOS) je enzim koji je uključen u sintezu NO (Misko i sar., 1993). NO molekul ima veliki fiziološki i patofiziološki značaj i uključen je u kontrolu vaskularnog tonusa, prenosa signala neurona, imunoloških procesa i zapaljenja. Azot monoksid nastaje iz L-arginina dejstvom azot oksid sintaze (NOS), u prisustvu NADPH i O<sub>2</sub>, i tom prilikom pored NO nastaju citrulin i NADP (Moncada i sar., 1991).

Azot oksid sintaza obuhvata tri izoforme: neuronalnu NOS (nNOS), inducibilnu NOS (iNOS) i endotelnu NOS (eNOS) (Kone, 2004). U bubregu, eNOS i nNOS su identifikovane u bubrežnoj vaskulaturi sabirnih tubula unutrašnje medule (Roczniak i sar., 2000). eNOS je lokalizovana u endotelu, uključujući aferentne i eferentne arteriole i vasa recta (Plato i sar., 2000.). iNOS je lokalizovana u proksimalnim tubulima, ushodnom kraku Henleove petlje i distalnim tubulima (Wang, 2002). Neuronska i endotelna NOS, predstavljaju konstitutivne izoforme koje se u odgovoru na fiziološke stimuluse, zavisno od jona kalcijuma aktiviraju i stvaraju male količine NO, koji aktivira guanilat ciklaze, što dovodi do formiranja cGMP, koji tada posreduje endotel-zavisnoj relaksaciji (Moncada i sar., 1991) i neuronskoj transmisiji (Lowenstein i sar., 1994). Ovako stvoren NO ima kratak poluživot, tako da se njegova bioraspoloživost procenjuje na svega nekoliko sekundi.

Inducibilna NO sintaza je Ca<sup>2+</sup> i kalmodulin nezavisna. Aktiviranje inducibilne izoforme citokinima i/ili bakterijskim endotoksinom uzrokuje proizvodnju velikih količina NO. S obzirom na činjenicu da ova indukcija može trajati duže u prisustvu patogenog stimulusa, aktivacijom iNOS stvara NO u većoj količini za sve vreme stimulacije iNOS, čime se njegovo štetno dejstvo višestruko povećava (Jaffrey i sar., 2001; Kone, 2004; Pautz i sar., 2010). Velike količine NO dovode do indukcije nitrozativnog stresa, a glavni medijator u ovom procesu je slobodni radikal peroksinitrit.

Peroksinitrit se formira reakcijom viška NO sa O<sub>2</sub><sup>-</sup>, što se često odvija u uslovima smanjene koncentracije SOD. Peroksinitrit je moćan oksidans koji iscrpljuje antioksidantnu odbranu, uključujući glutation i antioksidativne enzime (Olas i sar., 2004, Varma i sar., 2007; Reinartz i sar., 2008). Insuficijencija zaštitnih antioksidantnih sistema rezultuje pojačanom peroksidacijom lipida i povredama tkiva.

Pretostavlja se da AG može biti i delotvoran sakupljač hidroksilnih radikala (Courderot-Masuyer i sar., 1999). Yildiz i sar. (1998) su zaključili da AG ima direktne sakupljačke aktivnosti za hidroksil radikale. Polat i sar. (2006) su ispitali dejstvo AG na gentamicinom indukovana bubrežna oštećenja, gde je AG delovao kao snažan sakupljač slobodnih radikala i sprečio depleciju ćelijskih antioksidanasa. Osim toga, AG može da inhibira lipidnu peroksidaciju indukcijom GSH-Px i SOD ili sakupljanjem i inaktivacijom  $H_2O_2$  i HO (Babu i sar., 1995). Takođe, pokazano je da AG poboljšava GSH sadržaj i inhibiše lipidnu peroksidaciju kod amikacin-indukovanog oštećenja bubrega (Parlakpınar i sar., 2004). Giardino i sar. (1998) su pokazali da AG deluje kao antioksidans in vivo, sprečavajući formiranje RVK i lipidnu peroksidaciju u ćelijama i tkivima, kao i oksidativno indukovanu apoptozu. Kelly i sar. (2003) su ukazali da AG smanjuje ototoksičnost izazvanu cisplatinom upravo sakupljanjem hiroksi radikala. Dodatno, Yildirim i sar. (2004) su pokazali da je AG uspešno sprečio depleciju superoksid dismutaze i glutation peroksidaze i smanjio aktivnost mijeloperoksidaze, azot monoksida, kao i nivoe MDA kod bleomicinom izazvane fibroze pluća. Corbett i sar., (1992) su izvestili da AG inhibiše interleukinom-1b indukovanu NO sintazu sa polovinom maksimalne inhibicije pri dozi od 10 mM. Ove rezultate su potvrdili Hasan i sar. (1993) kada su utvrdili da AG snažno inhibiše citokinima indukovanu inducibilnu NO sintazu, dok je inhibicija vaskularne konstitutivne izoforme NO sintaze, odgovorne za vaskularnu kontrolu, bila znatno slabija.

Aminogvanidin ima i mnoge druge korisne efekte. Inhibiše diamin oksidazu (Tilton i sar., 1993) koja katalizuje degradaciju biološki aktivnih diamina kao što su histamin i putrescin. Takođe je utvrđeno da AG ublažava vaskularne i neurološke komplikacije kod eksperimentalno indukovano dijabetesa verovatno zahvaljujući svojim antioksidativnim svojstvima (Nordberg i sar., 2001). Osim toga, neke studije ukazuju i na antioksidativne efekte AG kao sakupljača peroksinitrita (Ihm i sar., 1999; Szabo i sar., 1997). Aminogvanidin efikasno odstranjuje malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE) (Young i sar., 2001; Burcham i sar., 2002). AG je ekvipotentan NG-monometil-L-argininu (L-NMA), inhibitoru inducibilne izoforme NO sintaze, ali 10-100-puta manje potentan kao inhibitor konstitutivnih izoformi, što čini ovaj lek korisnim selektivnim inhibitorom iNOS-a (Misko i sar., 1993).

Na osnovu istraživanja nekih autora AG je preporučen kao agens potencijalne koristi kod oboljenja poput fokalne cerebralne ishemije kod pacova (Zhang i sar., 1996) i eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa kod miševa (Cross i sar., 1994). Pored toga, AG može umanjiti pogoršane funkcije vaskularne barijere u toku odbacivanja alografta



(Worrall i sar., 1996) i alergijskog konjuktivitisa (Meijer i sar., 1995). Istraživano je i dejstvo AG na promene vaskulature prouzrokovane administracijom endotoksina - to jest, kod septičkog šoka, gde je utvrđeno da AG znatno ublažava nastale promene (Brian i sar., 1995).

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Na osnovu podataka izloženih u poglavlju "PREGLED LITERATURE" postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

-određivanje lokalizacije nefrotoksičnog dejstva cisplatina patohistološkim i morfometrijskim metodama i analiza morfoloških i funkcionalnih promena u bubregu nastalih pod dejstvom cisplatina,

-ispitivanje parametara oksidativnog stresa, kao jednog od mogućih mehanizama nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom,

-određivanje odnosa između morfoloških promena u bubregu, biohemijskih promena u krvi i promena markera oksidativnog stresa kod svih eksperimentalnih grupa pacova,

-ispitivanje mogućeg protektivnog dejstva kvercetina i aminogvanidina na nefrotoksičnost izazvanu cisplatinom.

#### 4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Studija je obuhvatila analizu 48 laboratorijskih belih pacova Wistar soja, oba pola, prosečne telesne mase 270 grama. Životinje su uzgajane na Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu i čuvane u polikarbonatskim kavezima pri standardnim laboratorijskim uslovima, na temperaturi  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , vlažnosti vazduha (60%) uz dvanaestočasovni dnevno/noćni ciklus i sa "ad libitum" dostupnom hranom i pijaćom vodom. Sve eksperimentalne procedure su izvedene u skladu sa pravilima Normativa Evropske Unije (86/609/EEC) i pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Medicinskog fakulteta u Nišu i odobrene su od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu (broj 01-5518-8).

Nakon perioda adaptacije u trajanju od 7 dana, eksperimentalne životinje su podeljene u 6 grupa od 8 pacova. Ispitivanim eksperimentalnim grupama intraperitonealno su aplikovani cisplatin, kvercetin, aminogvanidin i fiziološki rastvor u sledećim dozama i kombinacijama:

1. Prva eksperimentalna grupa (8 pacova) ili kontrolna grupa tretirana je fiziološkim rastvorom u dozi od 1 ml/24h u toku 9 dana (K-grupa).
2. Druga eksperimentalna grupa (8 pacova) tretirana je kvercetinom (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) rastvorenim u fiziološkom rastvoru u dozi od 50 mg/kg/24h 9 dana (Q-grupa).
3. Treća eksperimentalna grupa (8 pacova) tretirana je aminogvanidinom (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) rastvorenim u fiziološkom rastvoru u dozi od 100 mg/kg/24h 9 dana (AG-grupa).
4. Četvrta eksperimentalna grupa (8 pacova) tretirana je jednokratno cisplatinom (Pfizer PTY.Limited, Bentley, Australia) u dozi od 8 mg/kg petog dana od početka eksperimentalnog istraživanja (CIS-grupa).
5. Peta eksperimentalna grupa (8 pacova) tretirana je jednokratno cisplatinom u dozi od 8 mg/kg petog dana od početka eksperimentalnog istraživanja i kvercetinom u dnevnoj dozi od 50 mg/kg u trajanju od 9 dana (CISQ-grupa).
6. Šesta eksperimentalna grupa (8 pacova) tretirana je jednokratno cisplatinom u dozi od 8 mg/kg petog dana od početka eksperimentalnog istraživanja i aminogvanidinom u dnevnoj dozi od 100 mg/kg u trajanju od 9 dana (CISAG-grupa).

Desetog dana od početka eksperimentalnog istraživanja eksperimenta, sve životinje su anestezirane ketaminom u dozi od 80 mg/kg (Ketamidol 10%, Richter Pharma AG, Wels, Austria) i potom žrtvovane. Neposredno nakon anesteziranja i vivisekcije uzimano je 2 ml krvi iz aorte za biohemijske analize. Uzorak tkiva bubrega svake eksperimentalne životinje podeljen je na dva dela, jedan za određivanje parametara oksidativnog stresa, dok je drugi deo tkiva bubrega služio za svetlosno mikroskopsko ispitivanje.

#### **4.1. Biohemijske analize**

Biohemijske analize krvi eksperimentalnih životinja obuhvatile su određivanje vrednosti natrijuma, kalijuma, ureje i kreatinina, a urađene su pomoću automatskog biohemijskog analizatora (A25 Biosystems, Barselona, Španija) u laboratoriji Klinike za nefrologiju i hemodijalizu KC u Nišu.

Za određivanje nivoa oksidativnog stresa tkivo bubrega je sečeno na male komadiće, a potom su uz pomoć homogenizatora (IKA Works de Brasil Ltda Taquara, RJ 22713-00) pripremani 10% homogenati u destilovanoj vodi. Homogenati (10% w/v) su centrifugirani na 1500 x g, 10 minuta na 4°C.

#### **4.2. Određivanje količine proteina**

Količina ukupnih proteina u tkivima, određivana je metodom po Lowry-u (Lowry, 1951), sa bovinim serum albuminom kao standardom.

#### **4.3. Određivanje koncentracije uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP) u homogenatu**

Koncentracija AOPP u tkivu određivana je spektrofotometrijskom metodom po Witko-Sarsat i sar. (1996), koja se bazira na reakciji AOPP-a sa kalijum-jodidom u kiseloj sredini. Intenzitet boje je očitavan na 340 nm. Koncentracija je izražavana u  $\mu\text{mol/mg}$  hloramina T/mg proteina.

#### **4.4. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (LPO)**

Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu bubrega određivan je spektrofotometrijski na osnovu reakcije sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) (Ohkawa, 1979). Apsorpcija homogenata je merena na 532 nm. Koncentracija malondialdehida (MDA), krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije, izražavana je po miligramu proteina, koristeći koeficijent molekularne ekstinkcije MDA ( $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol cm}^{-1}$ ).

#### **4.5. Određivanje aktivnosti katalaze**

Aktivnost katalaze određivana je spektrofotometrijskom metodom po Gothu (Goth, 1991), koja se zasniva na sposobnosti katalaze da razlaže supstrat ( $H_2O_2$ ), pri čemu se enzimska reakcija stopira dodatkom amonijum molibdata, a nastali žuti kompleks  $H_2O_2$  i molibdata se meri na 405 nm prema slepoj probi. Aktivnost enzima izražena je u katalitičkim jedinicama na gram proteina (kU/g).

#### **4.6. Histopatološka ispitivanja**

Za mikromorfološka ispitivanja iseći bubrega svih eksperimentalnih grupa, fiksirani su u 10% rastvoru formaldehida. Nakon rutinske obrade tkiva u autotehniku i kalupljenja u parafinu kao i pravljenja laboratorijskih preseka debljine 5 mikrometra, iseći tkiva bubrega bojeni su sledećim metodama bojenja:

- a. Hematoksilin-eozin (HE) metode za proučavanje morfoloških promena bubrega;
- b. Perjodna kiselina-Šifovo bojenje (PAS) histohemijske metode bojenja za verifikaciju sadržaja glikogena;
- c. JONES bojenje (srebro metenamin) za bojenje bazalnih membrana tubula i kapilara glomerula.

Svi preparati su ispitivani na svetlosnom mikroskopu Leica DMR (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany).

#### **4.7. Morfometrijska analiza**

Za kvantifikaciju promena utvrđenih histološkom analizom bubrežnog tkiva korišćena je morfometrijska analiza ispitivanih struktura bubrega (glomeruli, proksimalni i distalni tubuli). Morfometrijske analize su izvršene na svetlosnom mikroskopu Leica DMR (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) uz pomoć Image J kompjuterskog programa. Iz svake eksperimentalne grupe analizirana je struktura bubrega šest nasumično izabranih životinja.

Za analizu glomerula korišćeni su preparati bojeni HE metodom i slikani pod uvećanjem objektiva 10 puta. Analizirano je po pet glomerula uočenih na 10 vidnih polja po jednom slučaju. Za morfometrijsku analizu ispitivanih struktura bubrega određivani su sledeći morfometrijski parametri: area, celularnost, perimetar, Feret-ov dijametar, cirkularnost i solidnost.

Za analizu debljine glomerularne bazalne membrane (GBM) korišćeni su preparati bojeni JONES metodom, a koji su prethodno slikani pod uvećanjem objektiva 40 puta. Analizirani su svi glomeruli uočeni na 10 odabranih vidnih polja po jednom slučaju.

Za analizu tubula bubrega korišćeni su preparati bojeni PAS metodom prethodno slikani pod povećanjem objektiva 40 puta. Analizirano je po pet proksimalnih i pet distalnih tubula uočenih na 10 odabranih vidnih polja po jednom slučaju. Određivani su sledeći morfometrijski parametri: površina epitela i nukleocitoplazmatski odnos.

#### **4.8. Statistička analiza**

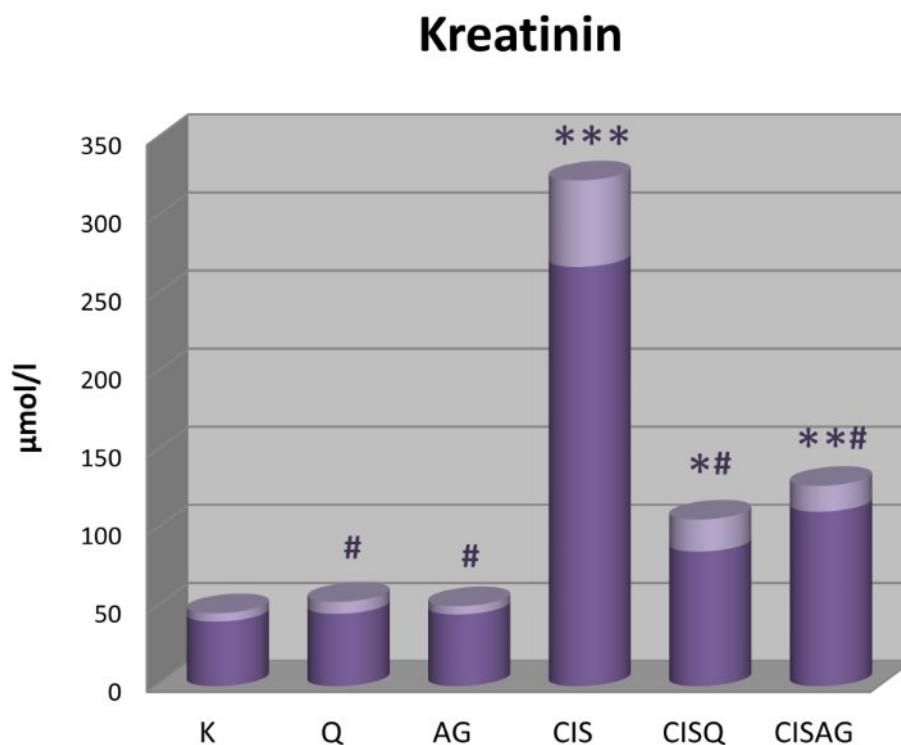
Vrednosti parametara izražene su kao srednja vrednost i standardna devijacija. Statistička značajnost utvrđena je jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) i post hoc Takijevim (Tukey) testom. Vrednost  $p < 0.05$  je smatrana statistički značajnom. Statistička obrada rezultata urađena je primenom kompjuterskog programa Graphpad Prism 5.03, San Diego, CA, USA.

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

## 5. REZULTATI

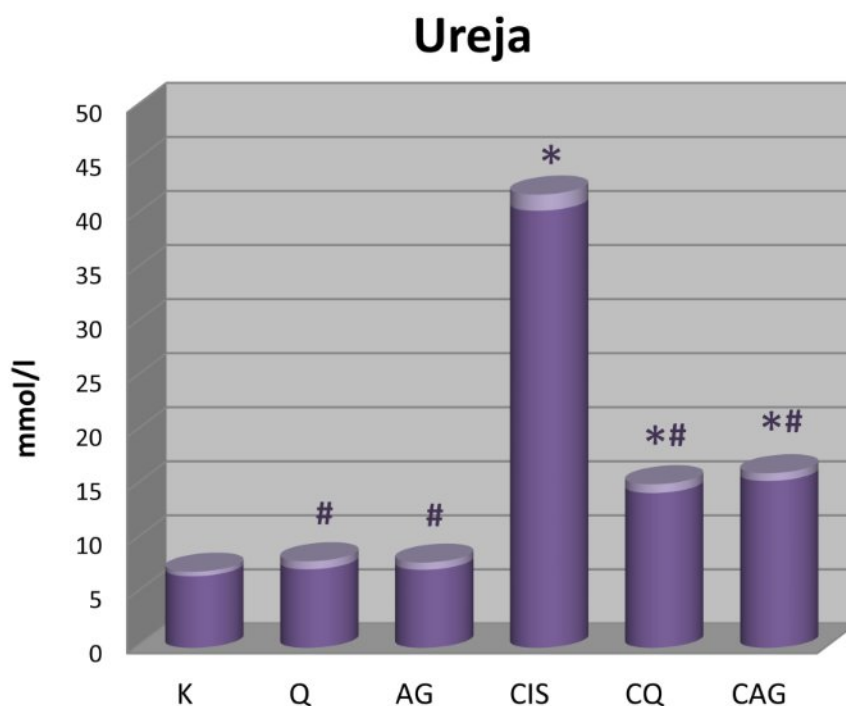
### 5.1. Rezultati biohemijskih analiza krvi pacova

Analiza biohemijskih analiza krvi pokazala je signifikantno povećanje koncentracije kreatinina u serumu kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom i aminogvanidinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti koncentracija kreatinina u serumu u grupi tretiranoj cisplatinom i kvercetinom bile su statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.05$ ), dok su statistički značajno bile manje u odnosu na koncentracije kreatinina u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti koncentracija kreatinina u serumu u grupi tretiranoj cisplatinom i aminogvanidinom bile su statistički značajno povećane u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ), ali su statistički značajno bile manje u odnosu na koncentracije kreatinina u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ) (Grafikon 1).



**Grafikon 1. Prosečne vrednosti koncentracija kreatinina u serumu eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* $p < 0.01$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.001$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

Prosečne vrednosti koncentracije ureje u serumu bile su signifikantno povećane kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na K grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom i aminogvanidinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti koncentracije ureje u serumu u CISQ grupi bile su statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), ali su statistički značajno bile manje u odnosu na koncentraciju ureje u CIS grupi ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti koncentracije ureje u serumu u CISAG grupi bile su statistički značajno povećane u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), dok su značajno statistički bile manje u odnosu na koncentraciju ureje u CIS grupi ( $p < 0.001$ ) (Grafikon 2).

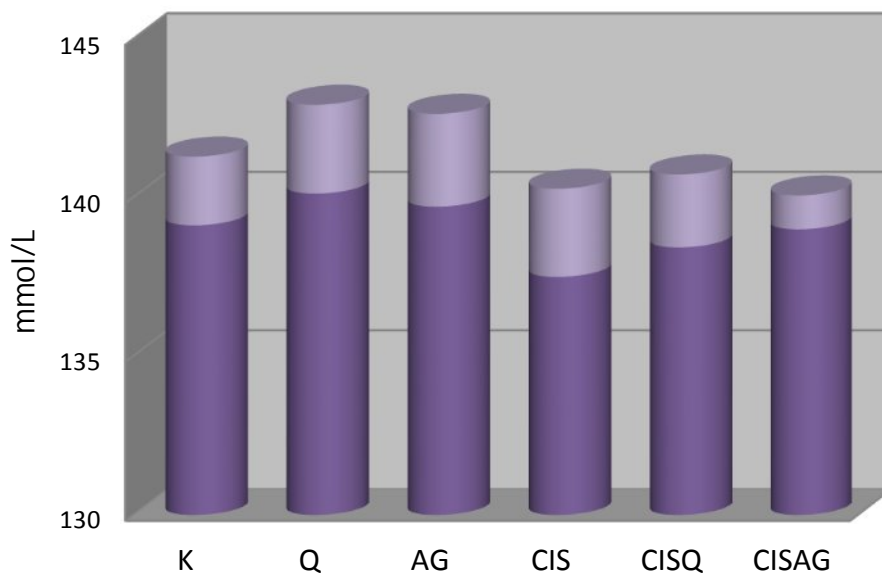


**Grafikon 2. Prosečne vrednosti koncentracije ureje u serumu eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.001$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

Prosečne vrednosti koncentracije natrijuma u serumu životinja tretiranih samo cisplatinom bile su smanjene u odnosu na K, Q i AG grupe pacova, ali nije bilo statistički značajnih razlika. Prosečne vrednosti koncentracije natrijuma u serumu životinja u CISQ i CISAG grupi bile su veće u odnosu na pacove tretirane samo cisplatinom, ali ove razlike nisu bile statistički značajne (Grafikon 3).

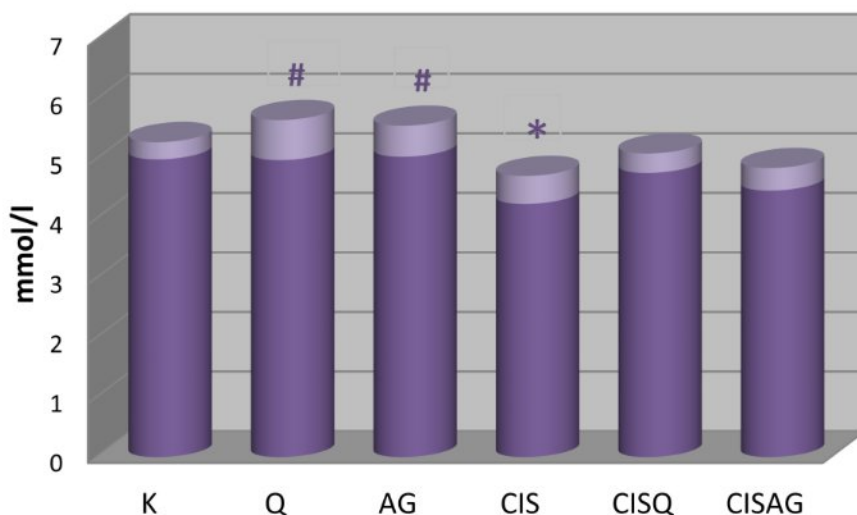


## Natrijum



**Grafikon 3. Prosečne vrednosti koncentracije natrijuma u serumu eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD.

## Kalijum

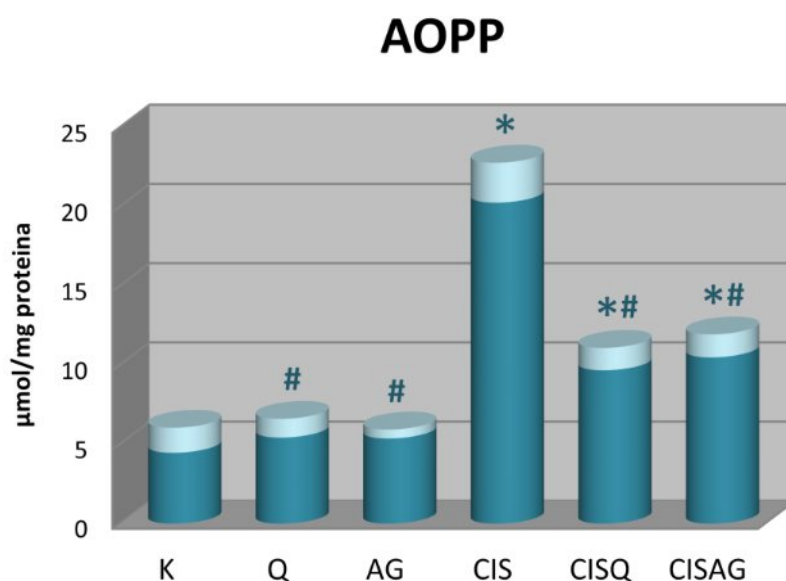


**Grafikon 4. Prosečne vrednosti koncentracije kalijuma u serumu eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.05$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

Prosečne vrednosti serumske koncentracije kalijuma kod životinja tretiranih cisplatinom bile su statističke značajno smanjene u odnosu na kontrolnu grupu, kao i u odnosu na grupe koje su primale kvercetin i aminogvanidin ( $p < 0.05$ ). Prosečne vrednosti serumske koncentracije kalijuma kod životinja tretiranih cisplatinom i kvercetinom i životinja tretiranih cisplatinom i aminogvanidinom bile su veće u odnosu na pacove tretirane samo cisplatinom, ali bez statističke značajnosti (Grafikon 4).

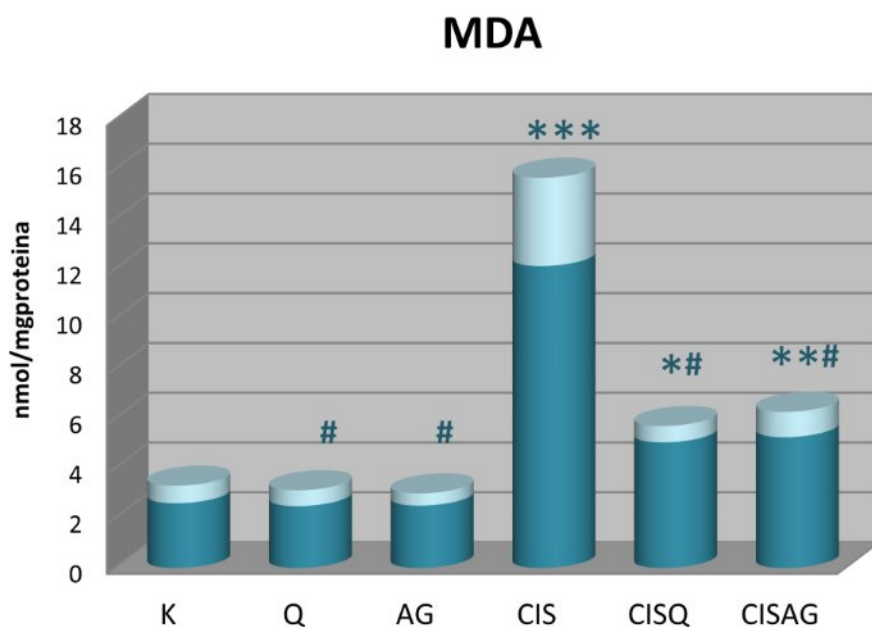
## 5.2. Rezultati analize markera oksidativnog stresa u tkivu bubrega

Prosečne vrednosti koncentracije AOPP-a u homogenatu bubrežnog tkiva bile su signifikantno povećane kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom i aminogvanidinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti koncentracije AOPP-a u homogenatu bubrežnog tkiva kod životinja tretiranih cisplatinom i kvercetinom i životinja tretiranih cisplatinom i aminogvanidinom bile su statistički značajno manje u odnosu na koncentracije AOPP-a u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ) (Grafikon 5).



**Grafikon 5. Prosečne vrednosti koncentracije AOPP u homogenatu bubrežnog tkiva eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.001$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

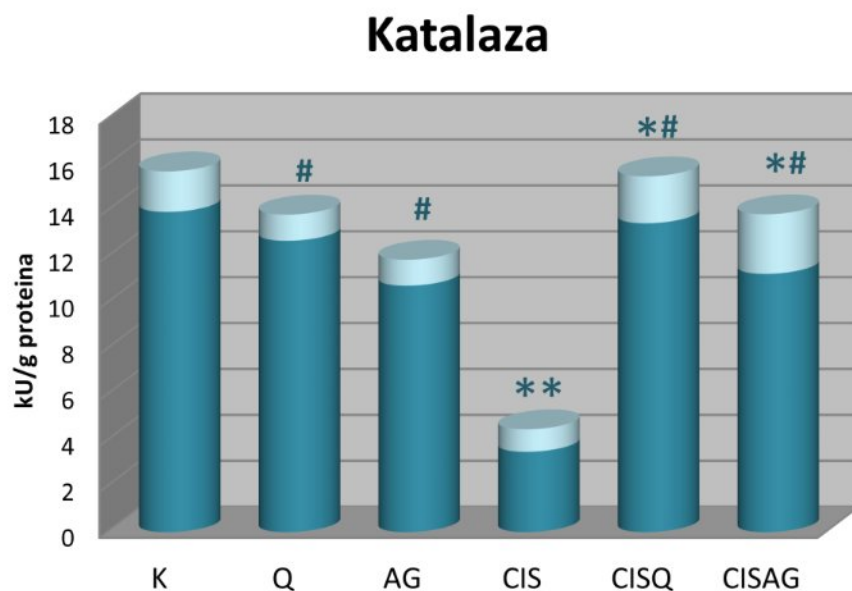
Prosečne vrednosti koncentracije MDA u homogenatu bubrežnog tkiva bile su signifikantno povećane kod pacova CIS grupe u odnosu na K, Q i AG grupe ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti koncentracije MDA u homogenatu bubrežnog tkiva kod CISQ grupe životinja bile su statistički značajno manje u odnosu na koncentracije MDA u CIS grupi ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile povećane u odnosu na koncentracije MDA u K grupi pacova ( $p < 0.05$ ). Prosečne vrednosti koncentracije MDA u homogenatu bubrežnog tkiva kod CISAG grupe životinja bile su statistički značajno manje u odnosu na koncentracije MDA u CIS grupi ( $p < 0.001$ ), ali su statistički značajno bile povećane u odnosu na koncentracije MDA u K grupi pacova ( $p < 0.01$ ) (Grafikon 6).



**Grafikon 6. Prosečne vrednosti koncentracija malondialdehida u homogenatu bubrežnog tkiva eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* $p < 0.01$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.001$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

Prosečne vrednosti aktivnosti katalaze u homogenatu bubrežnog tkiva bile su signifikantno smanjene kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom i aminogvanidinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti aktivnosti katalaze u homogenatu bubrežnog tkiva kod životinja tretiranih cisplatinom i

kvercetinom i životinja tretiranih cisplatinom i aminogvanidinom bile su statistički značajno povećane u odnosu na aktivnosti katalaze u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile manje u odnosu na kontrolnu grupu pacova ( $p < 0.05$ ) (Grafikon 7).



**Grafikon 7. Prosečne vrednosti koncentracije katalaze u homogenatu bubrežnog tkiva eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.001$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

### 5.3. Rezultati histopatoloških ispitivanja

Histopatološki nalaz tkiva bubrega kontrolne grupe (Slika 4) i pacova tretiranih kvercetinom i aminogvanidinom (Slike 5 i 6) pokazuju intaktnu morfologiju sa normalnom strukturom glomerula i tubula.

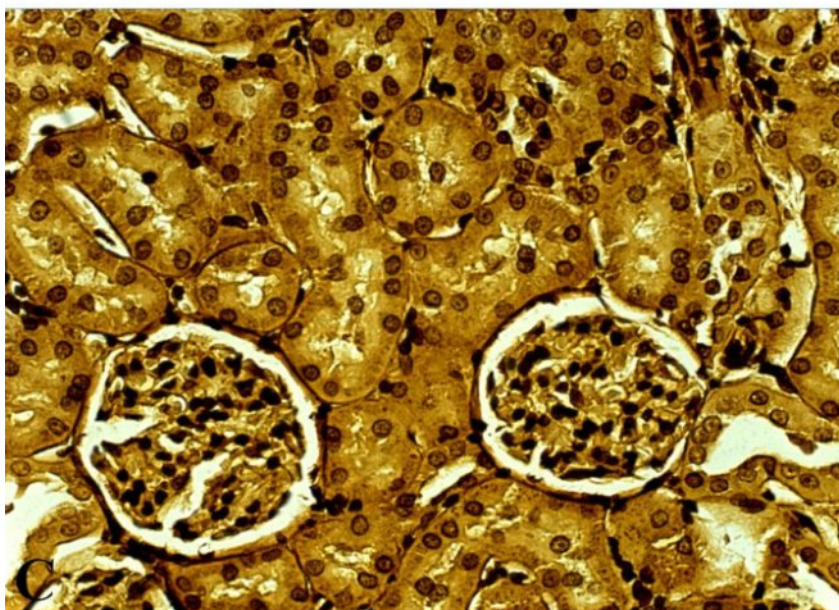
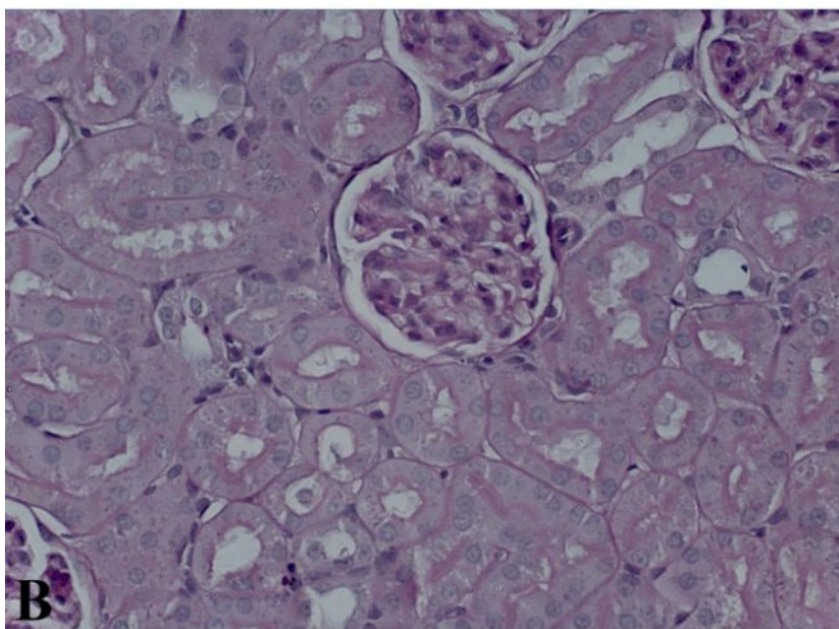
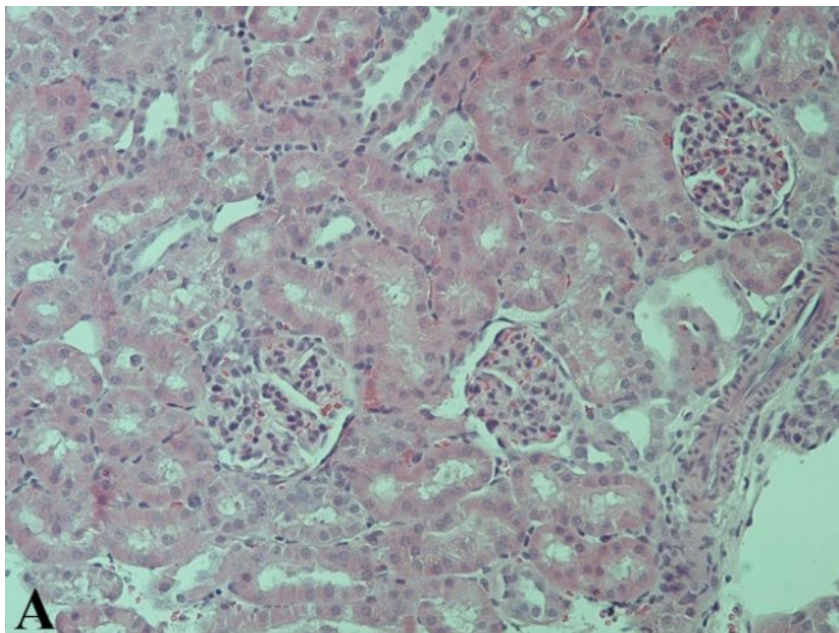
U grupi pacova tretiranih cisplatinom prisutna je degeneracija tubularne arhitekture kod velikog broja proksimalnih tubula sa edematoznim ćelijama i brojnim vakuolama u citoplazmi tubularnih ćelija kao i apoptozom tubulocita (Slike 7A i 7B). Lumen ovih tubula često je ispunjen degenerativno izmenjenim i deskvamiranim epitelnim ćelijama, a mestimično su prisutni i hijalini cilindri i peritubularna infiltracija inflamatornim ćelijama (Slike 7B i 8B). Pojedini distalni tubuli u CIS grupi pacova su dilatirani, dok je većina bez histoloških promena (Slike 7 i 8). U grupi pacova tretiranih cisplatinom zapažene su i promene na glomerulima. Glomeruli pacova tretiranih cisplatinom imaju redukovani lobularni izgled,

izraženu hiperemiju i značajno su veći u odnosu na glomerule kontrolne grupe pacova. Boumanov prostor ovih glomerula je sužen, a prisutna je i periglomerularna infiltracija zapaljenjskim ćelijama (Slike 7A, 7C, 8A, 8C). Na preparatima bojenim JONES metodom zapaža se da je bazalna membrana kapilara glomerula nejednako zadebljana u CIS grupi pacova (Slike 7C i 8C).

Kod pacova grupe tretirane cisplatinom i kvercetinom promene su značajno manje izražene u odnosu na grupu tretiranu samo cisplatinom. U CISQ grupi zapažene su fokalne degenerativne promene epitelnih ćelija u proksimalnim tubulima, dok su glomeruli blago uvećani (Slika 9A i 9B). Na preparatima CISQ grupe bojenim JONES metodom uočava se da je bazalna membrana kapilara glomerula zadebljana samo u pojedinim segmentima (Slika 9C).

Tretman aminogvanidinom smanjio je morfološke promene izazvane cisplatinom. Na isečcima tkiva bubrega pacova CISAG grupe prebojenim HE i PAS metodom bojenja uočena je minimalna degeneracija epitelnih ćelija tubula bez dilatacije i vakuolizacije njihovih ćelija (Slika 10A i 10B). Na preparatima bojenim JONES metodom uočava se da su promene na glomerulima značajno manje sa blagim suženjem Boumanovog prostora, dok je bazalna membrana kapilara glomerula zadebljana samo u pojedinim segmentima (Slika 10C).

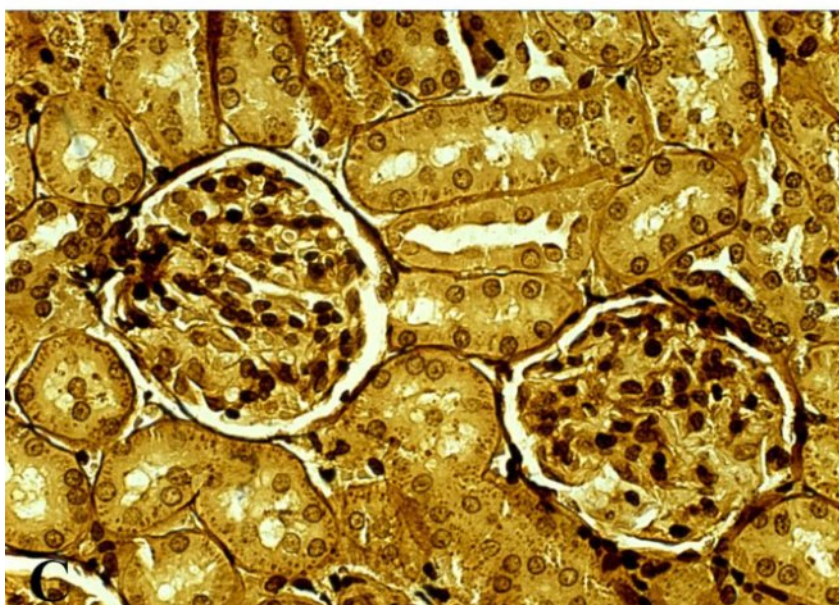
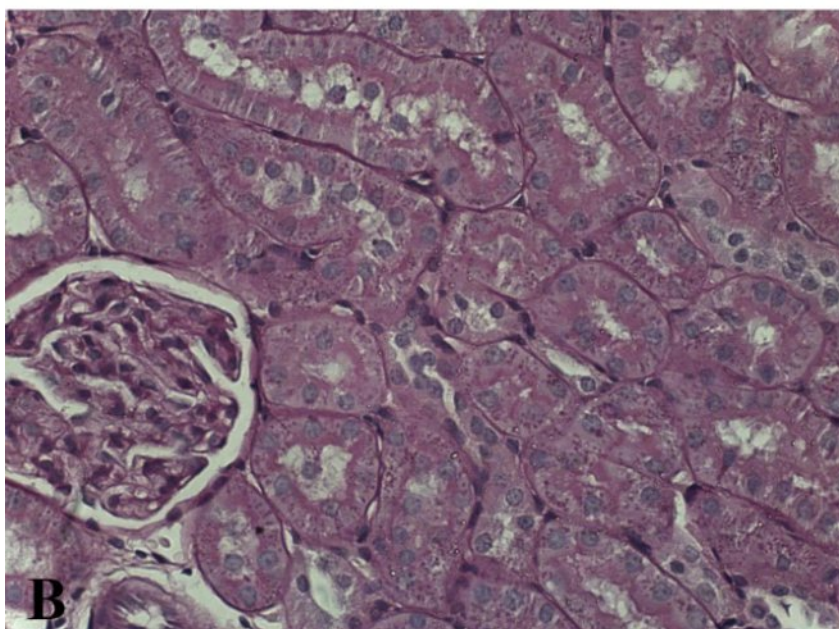
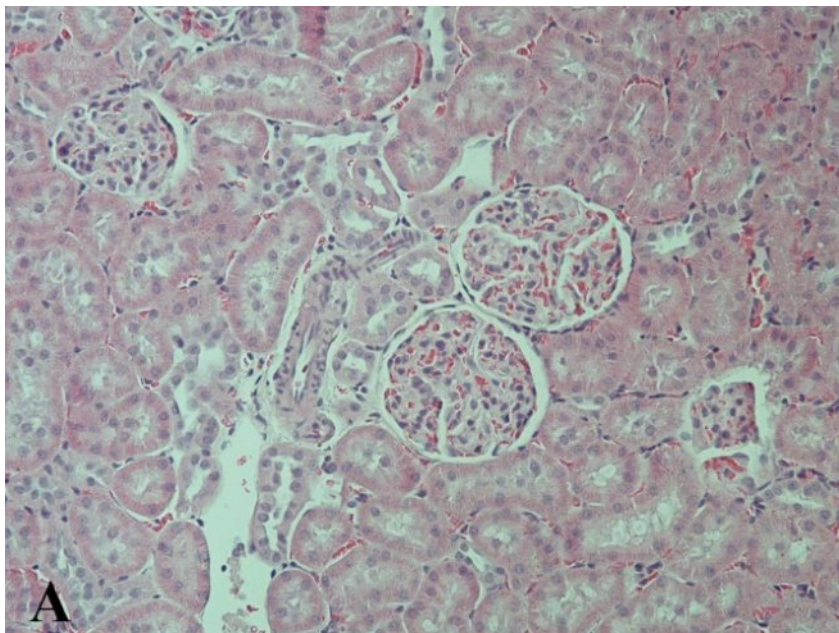




**Slika 4. Tkivo bubrega kontrolne grupe životinja sa normalnom histološkom građom glomerula i tubula:**

A) HE  $\times$  200 B) PAS  $\times$  400 C) JONES  $\times$  400

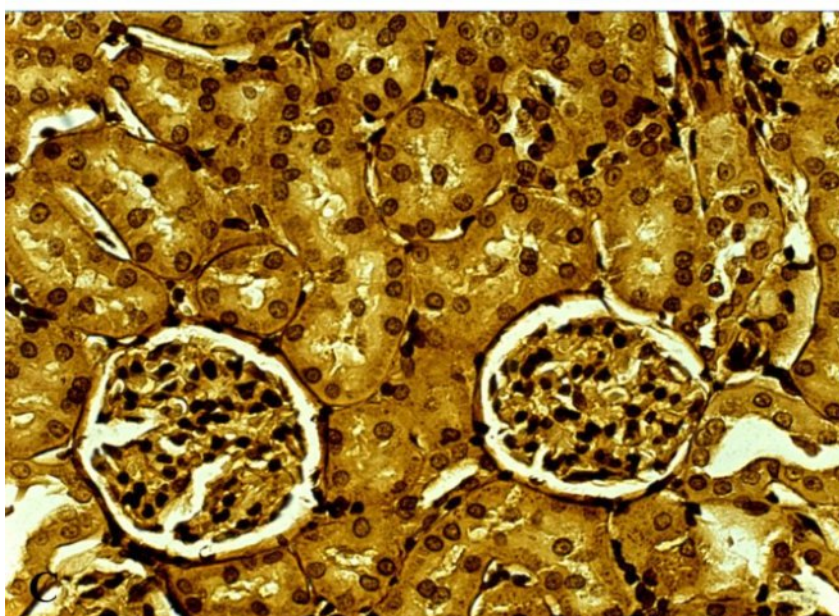
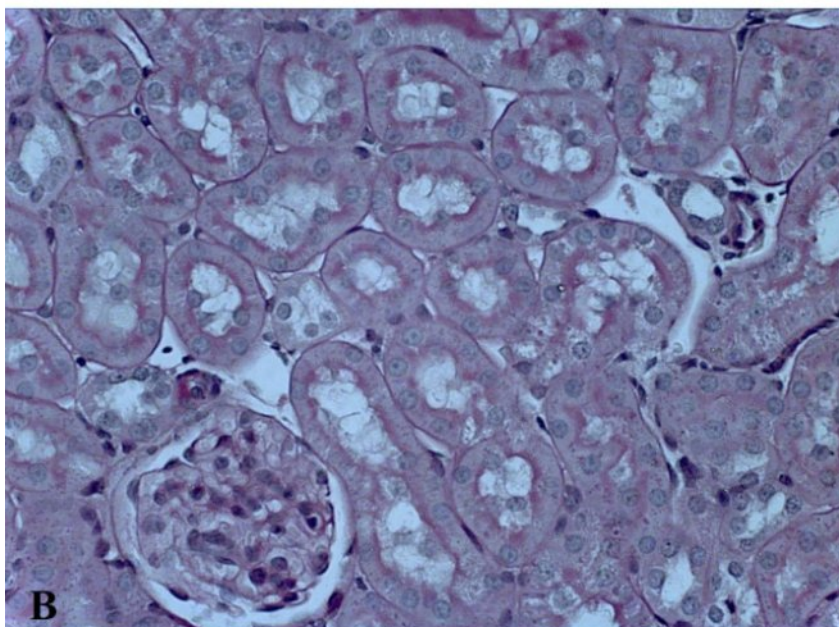
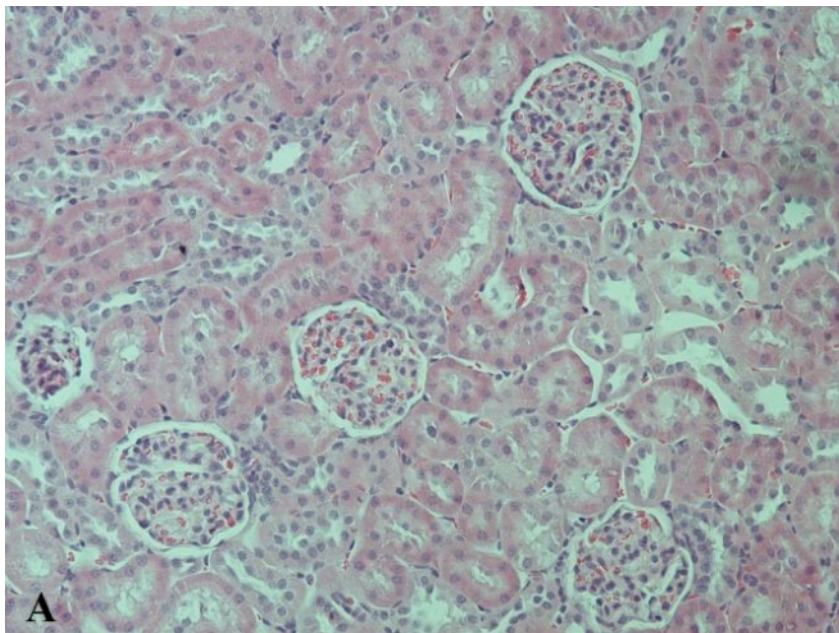




**Slika 5. Tkivo bubrega grupe pacova tretiranih samo kvercetinom sa očuvanom strukturom glomerula i tubula:**

A) HE  $\times$  200 B) PAS  $\times$  400 C) JONES  $\times$  400

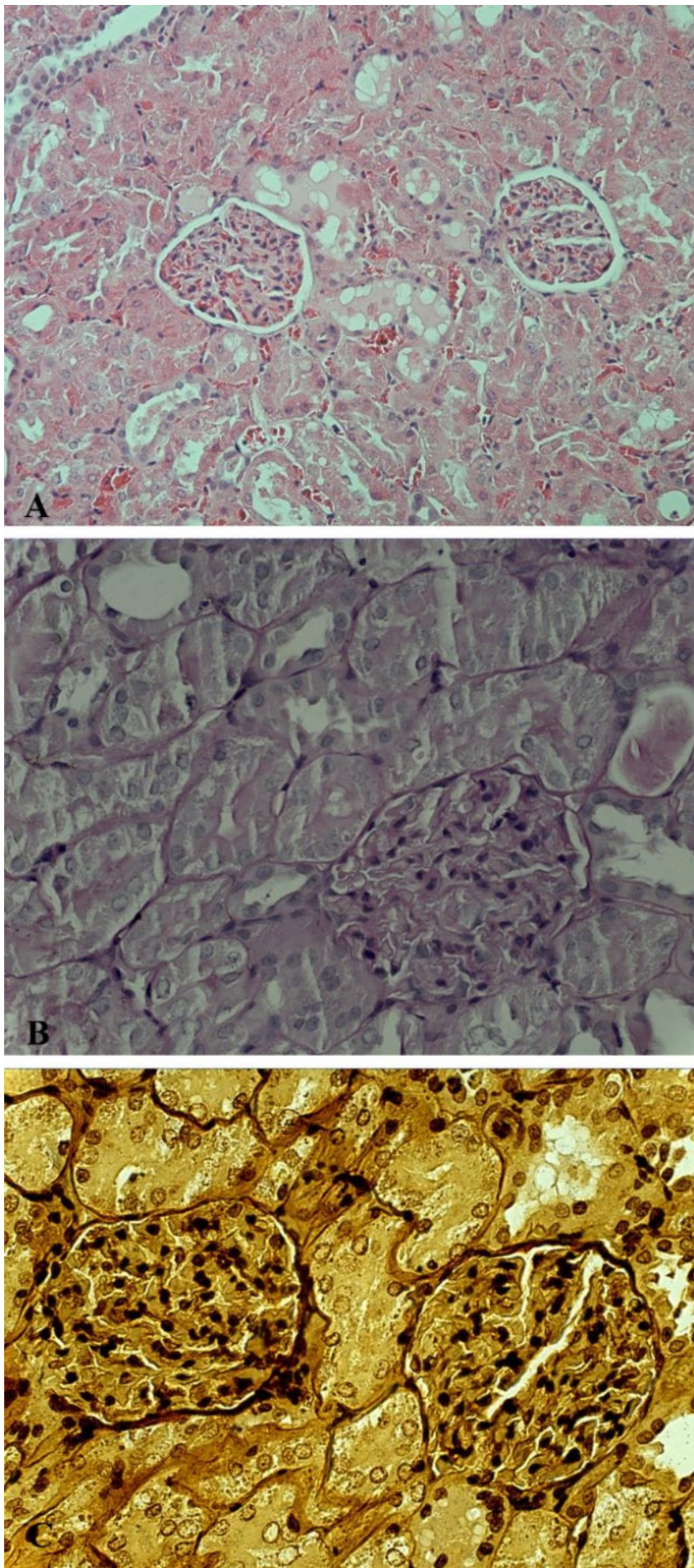




**Slika 6. Tkivo bubrega grupe pacova tretiranih aminogvanidinom sa intaktnom strukturom glomerula i tubula:**

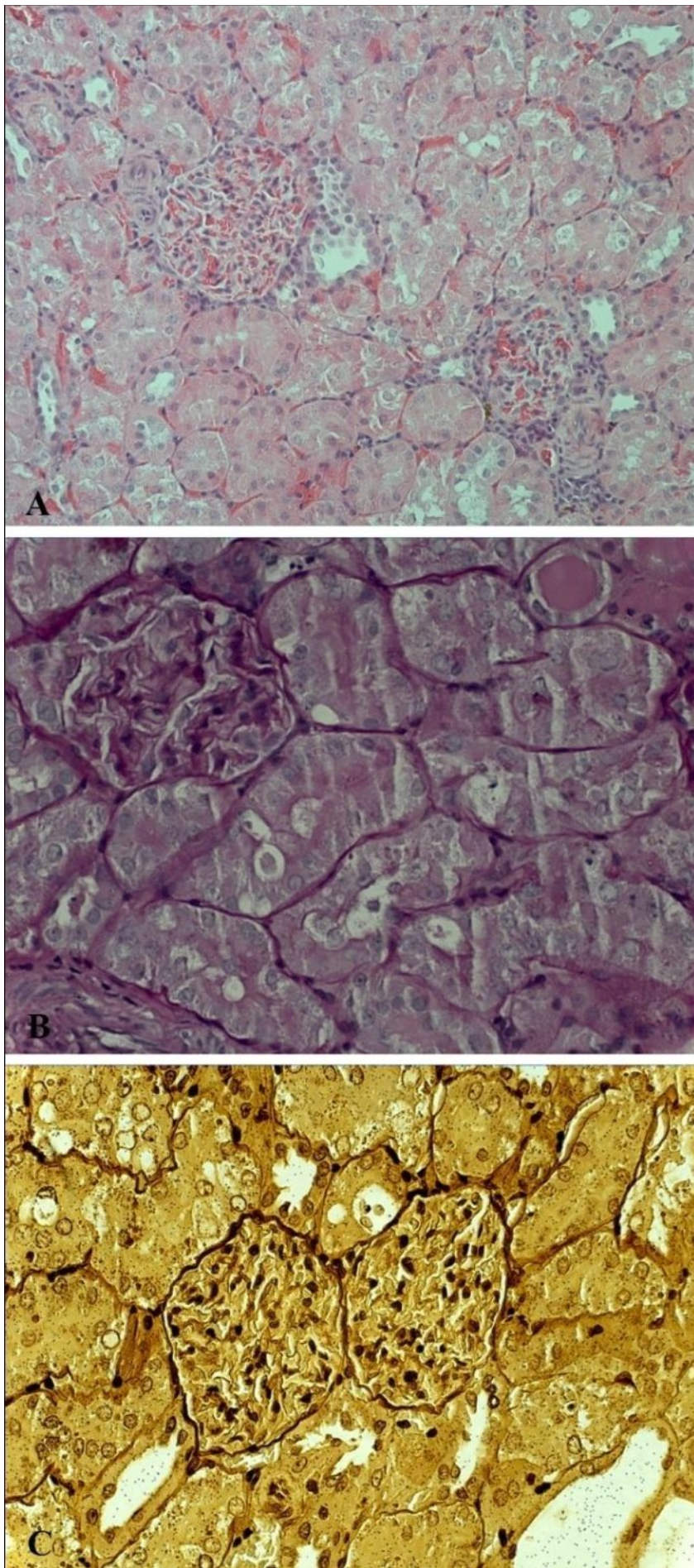
A) HE  $\times$  200 B) PAS  $\times$  400 C) JONES  $\times$  400





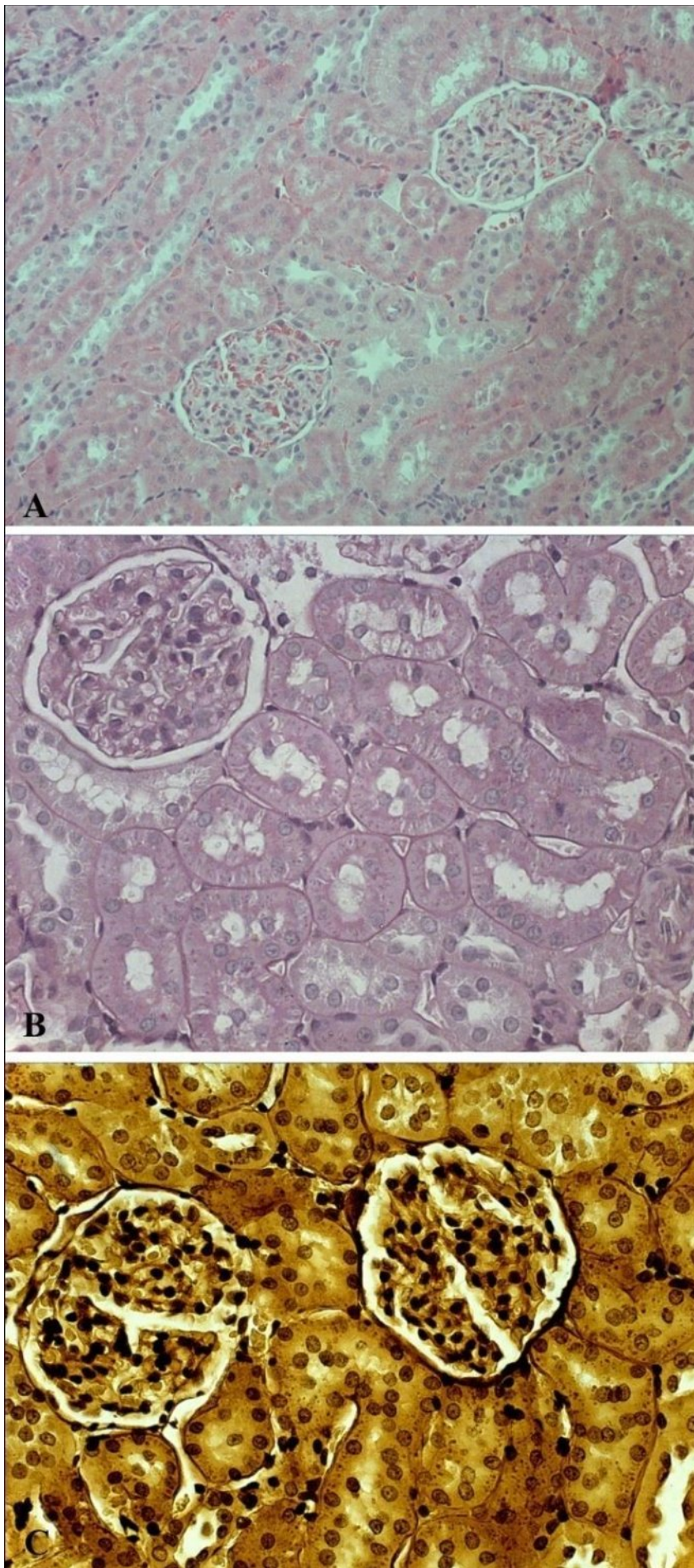
**Slika 7. Tkivo bubrega grupe pacova tretiranih cisplatinom: Prisutan je edem epitelnih ćelija proksimalnih tubula sa vakuolizacijom citoplazme ćelija, dilatacijom tubula i prisustvom hijalinih cilindara. A) HE  $\times$  200 B) PAS  $\times$  400 C) JONES  $\times$  400**





**Slika 8. Tkivo bubrega grupe pacova tretiranih cisplatinom:** Uvećani glomeruli sa suženim Boumanovim prostorima, bazalna membrana kapilara je zadebljana i nejednake debljine. Prisetna je periglomerularna infiltracija. A) HE  $\times$  200 B) PAS  $\times$  400 C) JONES  $\times$  400

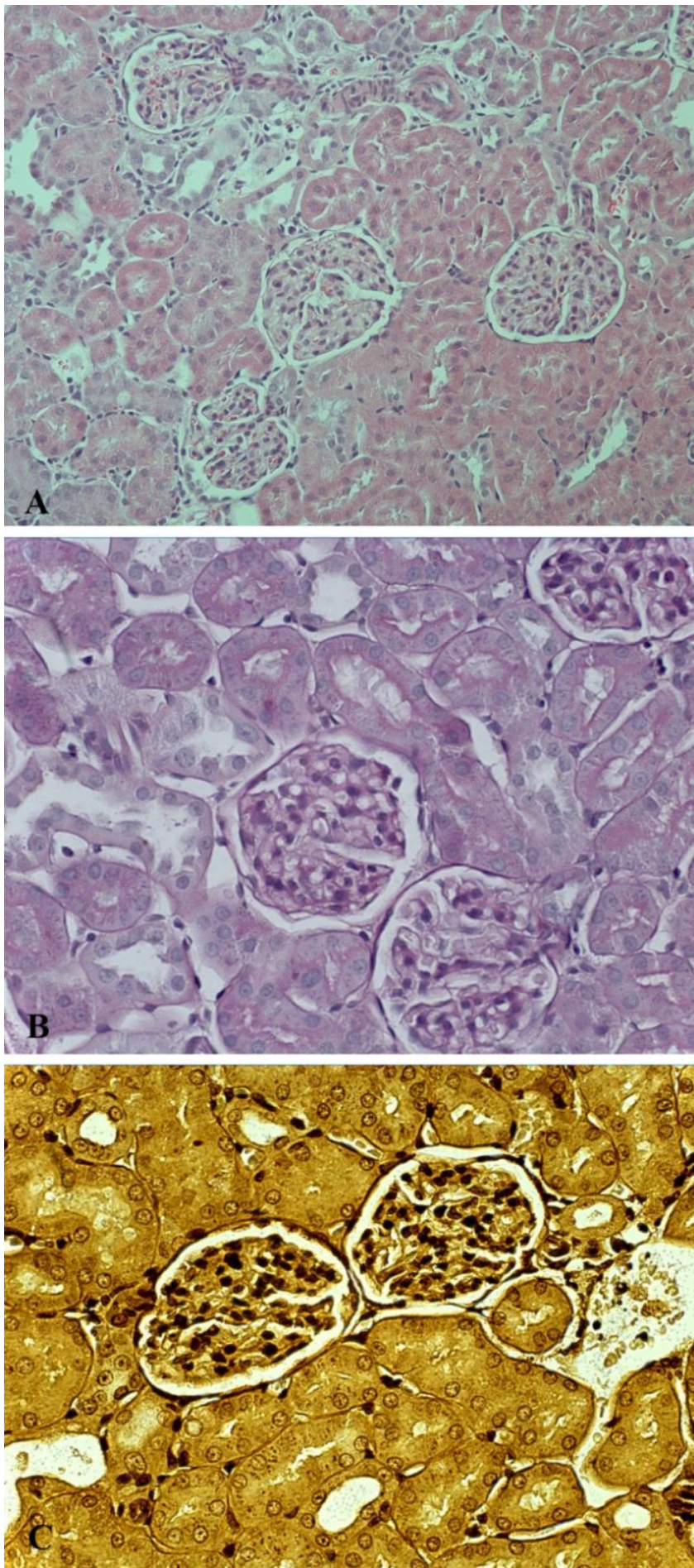




**Slika 9. Tkivo bubrega grupe pacova tretiranih kvercetinom i cisplatinom:** Prisutna je apoptoza pojedinih tubulocita u proksimalnim tubulima, dok su glomeruli blago uvećani, bazalna membrana kapilara glomerula je zadebljana samo u pojedinim segmentima.

A) HE  $\times$  200 B) PAS  $\times$  400 C) JONES  $\times$  400



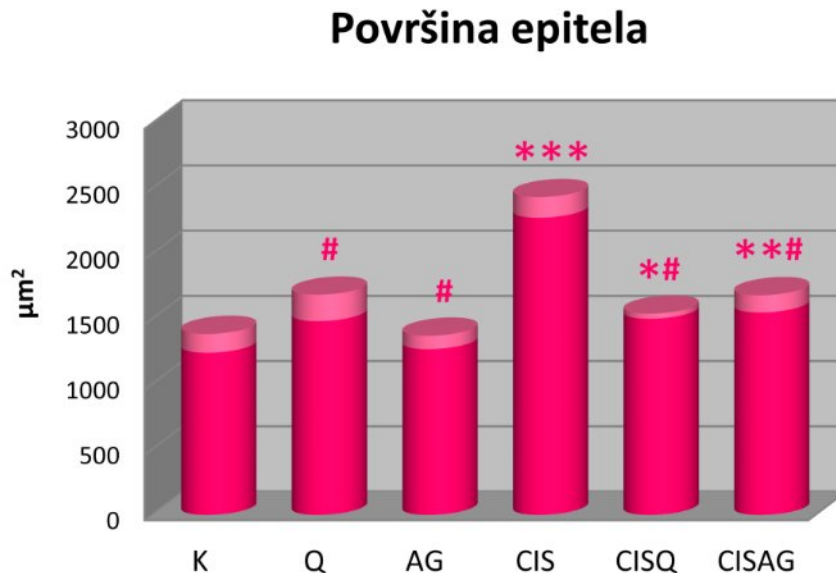


**Slika 10. Tkivo bubrega grupe pacova tretiranih aminogvanidinom i cisplatinom:** Prisutna je blaga degeneracija epitelnih ćelija proksimalnih tubula i fokalna apoptoza, glomeruli su blago uvećani, bazalna membrana kapilara glomerula je zadebljana samo u pojedinim segmentima. A) HE  $\times$  200 B) PAS  $\times$  400 C) JONES  $\times$  400

## 5.4. Rezultati morfometrijskih ispitivanja bubrega

### 5.4.1. Morfometrijska analiza proksimalnih tubula

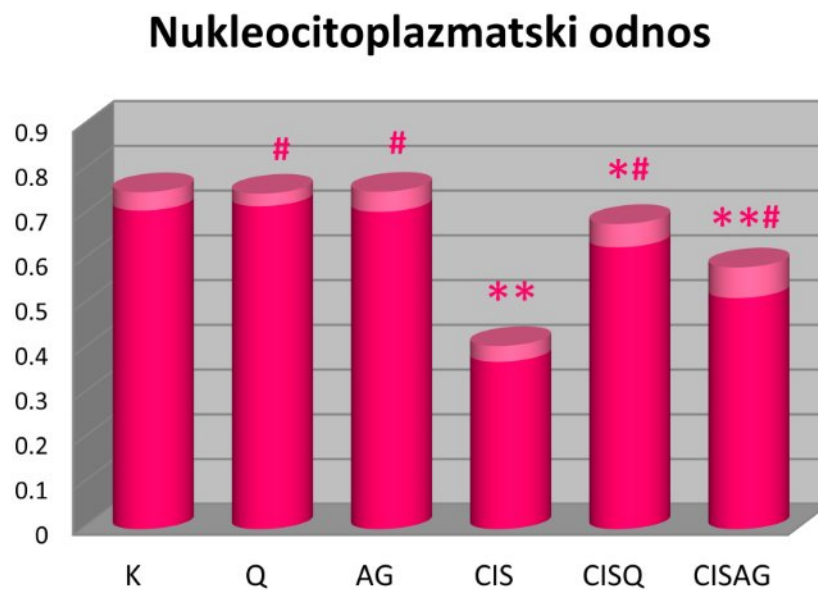
Prosečne vrednosti površine epitela proksimalnih tubula bubrega bile su signifikantno veće kod pacova u CIS grupi u odnosu na eksperimentalne životinje K, Q i AG grupe ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti površine epitela proksimalnih tubula bubrega u CISQ grupi pacova bile su statistički značajno manje u odnosu na površinu epitela u CIS grupi ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile veće u odnosu na K grupu ( $p < 0.05$ ). Prosečne vrednosti površine epitela proksimalnih tubula bubrega kod životinja CISAG grupe bile su statistički značajno manje u odnosu na površinu epitela u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ) (Grafikon 8).



**Grafikon 8. Prosečne vrednosti površine epitela proksimalnih tubula eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* $p < 0.01$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.001$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS).

Prosečne vrednosti nukleocitoplazmatskog odnosa epitelnih ćelija proksimalnih tubula bile su signifikantno smanjene kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom i aminogvanidinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti nukleocitoplazmatskog odnosa kod životinja tretiranih cisplatinom i kvercetinom bile su statistički značajno veće u odnosu na isti parametar u grupi tretiranoj

samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ). Takođe, prosečne vrednosti nukleocitoplazmatskog odnosa životinja tretiranih cisplatinom i kvercetinom bile su statistički značajno manje u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.05$ ). Prosečne vrednosti nukleocitoplazmatskog odnosa epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega kod životinja tretiranih cisplatinom i aminogvanidinom bile su statistički značajno veće u odnosu površinu epitela u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile manje u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ) (Grafikon 9).



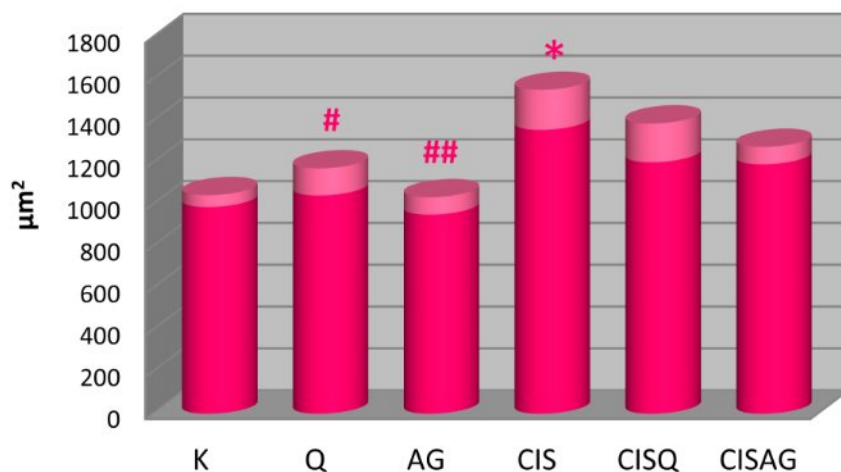
**Grafikon 9. Nukleocitoplazmatski odnos ćelija epitela proksimalnih tubula eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.001$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

#### 5.4.2. Morfometrijska analiza distalnih tubula

Prosečne vrednosti površine epitela distalnih tubula bubrega bile su signifikantno povećane kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom ( $p < 0.01$ ) i aminogvanidinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti površine epitela distalnih tubula bubrega kod životinja tretiranih cisplatinom i kvercetinom i životinja tretiranih cisplatinom i aminogvanidinom bile su manje u odnosu površinu epitela u grupi tretiranoj samo cisplatinom, ali bez statističke značajnosti (Grafikon 10).



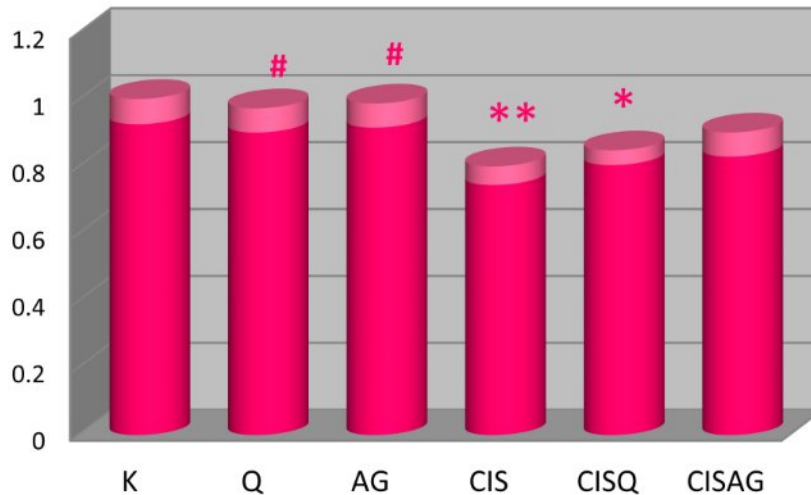
## Površina epitela



**Grafikon 10. Prosečne vrednosti površine epitela distalnih tubula eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.01$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS); ## $p < 0.001$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

Prosečne vrednosti nukleocitoplazmatskog odnosa epitelnih ćelija distalnih tubula bubrega bile su signifikantno smanjene kod CIS grupe pacova u odnosu na K grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na Q i AG grupe ( $p < 0.01$ ). Prosečne vrednosti nukleocitoplazmatskog odnosa kod CISQ grupe životinja bile su signifikantno smanjene u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.05$ ), dok su bile povećane u odnosu na grupu tretiranu samo cisplatinom, ali bez statističke značajnosti. Prosečne vrednosti nukleocitoplazmatskog odnosa kod CISAG grupe životinja bile su povećane u odnosu na grupu tretiranu samo cisplatinom, ali bez statističke značajnosti (Grafikon 11).

## Nukleocitoplazmatski odnos



**Grafikon 11. Nukleocitoplazmatski odnos ćelija epitela distalnih tubula eksperimentalnih i kontrolne grupe pacova.** Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.01$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

### 5.4.3. Morfometrijska analiza glomerula

Prosečne vrednosti površine glomerula u CIS grupi pacova bile su signifikantno povećane u odnosu na površinu glomerula u K, Q i AG grupi ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti površine glomerula u CISQ grupi bile su statistički značajno manje u odnosu na površinu glomerula u CIS grupi ( $p < 0.001$ ), ali su statistički značajno bile veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.05$ ). Prosečne vrednosti površine glomerula kod životinja iz CISAG grupe bile su statistički značajno manje u odnosu na površinu glomerula u CIS grupi ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ) (Tabela 1).

Prosečne vrednosti celularnosti glomerula bile su signifikantno manje kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom i aminogvanidinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti celularnosti glomerula kod životinja CISQ grupe bile su statistički značajno veće u odnosu na celularnost glomerula u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), ali su statistički značajno bile smanjene u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.05$ ). Prosečne vrednosti celularnosti glomerula kod životinja CISAG grupe bile su statistički značajno veće u odnosu na celularnost glomerula u grupi tretiranoj



samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile manje u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ) (Tabela 1).

Prosečne vrednosti perimetra glomerula bile su signifikantno povećane kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom i aminogvanidinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti perimetra glomerula kod životinja CISQ grupe bile su statistički značajno manje u odnosu na perimetar glomerula u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti perimetra glomerula kod životinja CISAG grupe bile su statistički značajno manje u odnosu na perimetar glomerula u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ) (Tabela 1).

Prosečne vrednosti Feret-ovog dijametra glomerula bile su signifikantno povećane kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom i aminogvanidinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti Feret-ovog dijametra glomerula životinja iz CISAG grupe bile su statistički značajno smanjene u odnosu na prosečne vrednosti Feret-ovog dijametra glomerula grupe tretirane samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile povećane u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ). Prosečne vrednosti Feret-ovog dijametra glomerula životinja iz CISAG grupe bile su statistički značajno smanjene u odnosu na prosečne vrednosti Feret-ovog dijametra glomerula u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile povećane u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ) (Tabela 1).

Rezultati statističke analize su pokazali da se srednje vrednosti cirkularnosti i solidnosti glomerula ispitivanih grupa statistički ne razlikuju međusobno (Tabela 1).

Prosečne vrednosti debljine GBM su bile statistički značajno povećane u CIS grupi u odnosu na kontrolne (K, Q, AG) grupe životinja ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti debljine GBM u CISQ grupi bile su statistički značajno manje u odnosu na debljinu GBM u CIS grupi ( $p < 0.001$ ), dok su bile statistički značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ). Prosečne vrednosti debljine GBM kod životinja CISAG grupe bile su statistički značajno manje u odnosu na debljinu GBM u CIS grupi ( $p < 0.001$ ), dok su statistički značajno bile veće u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Rezultati morfolometrijske analize glomerula

	K	Q	AG	CIS	CISQ	CISAG
AREA ( $\mu\text{m}^2$ )	7482.297 $\pm$ 266.170	7634.271 $\pm$ 437.647 <sup>#</sup>	7497.628 $\pm$ 252.636 <sup>#</sup>	11598.395 $\pm$ 121.895 <sup>***</sup>	8111.265 $\pm$ 301.119 <sup>*#</sup>	8252.421 $\pm$ 366.449 <sup>**#</sup>
CELULARNOST (broj ćelija/ $\mu\text{m}^2$ )	0.0076 $\pm$ 0.0006	0.0074 $\pm$ 0.0004 <sup>#</sup>	0.0073 $\pm$ 0.0005 <sup>#</sup>	0.0052 $\pm$ 0.0001 <sup>***</sup>	0.0068 $\pm$ 0.0002 <sup>*#</sup>	0.0065 $\pm$ 0.0003 <sup>**#</sup>
PERIMETAR ( $\mu\text{m}$ )	312.478 $\pm$ 3.369	316.871 $\pm$ 8.115 <sup>#</sup>	316.092 $\pm$ 5.523 <sup>#</sup>	391.327 $\pm$ 1.913 <sup>***</sup>	329.871 $\pm$ 5.354 <sup>**#</sup>	331.839 $\pm$ 6.329 <sup>**#</sup>
FERETOV DIJAMETAR ( $\mu\text{m}$ )	108.154 $\pm$ 1.578	113.826 $\pm$ 10.032	111.024 $\pm$ 2.388	137.407 $\pm$ 1.224 <sup>***</sup>	119.101 $\pm$ 2.492 <sup>**#</sup>	119.155 $\pm$ 3.109 <sup>**#</sup>
CIRKULARNOST	0.9317 $\pm$ 0.0075	0.9318 $\pm$ 0.0045	0.9392 $\pm$ 0.0061	0.9368 $\pm$ 0.0047	0.9318 $\pm$ 0.0036	0.9374 $\pm$ 0.0033
SOLIDNOST	0.9899 $\pm$ 0.0043	0.9923 $\pm$ 0.0012	0.9926 $\pm$ 0.0014	0.9931 $\pm$ 0.0017	0.9907 $\pm$ 0.0008	0.9927 $\pm$ 0.0011
DEBLJINA GBM ( $\mu\text{m}$ )	0.5867 $\pm$ 0.0041	0.5814 $\pm$ 0.0120 <sup>#</sup>	0.5810 $\pm$ 0.0052 <sup>#</sup>	0.8668 $\pm$ 0.0089 <sup>***</sup>	0.6191 $\pm$ 0.0293 <sup>**#</sup>	0.6143 $\pm$ 0.0147 <sup>*#</sup>

Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SD; \* $p < 0.05$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\* $p < 0.01$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; \*\*\* $p < 0.001$  u odnosu na kontrolnu (K) grupu; # $p < 0.001$  u odnosu na grupu tretiranu cisplatinom (CIS)

## 6. DISKUSIJA

Cisplatin je antineoplastični lek koji se uobičajeno koristi u lečenju različitih solidnih tumora kao što su: tumori germinativnih ćelija, karcinom jajnika, karcinom pluća, karcinom bešike i karcinom skvamoznih ćelija glave i vrata (Hanigan i sar., 2003; Rjiba-Touati i sar., 2012). Klinička upotreba cisplatina je ograničena zbog njegovih neželjenih efekata, a naročito zbog dozno- i vremenski-zavisne nefrotoksičnosti (Taguchi i sar., 2005, Saad i sar., 2009). Tačan mehanizam cisplatin-indukovane nefrotoksičnosti je kompleksan i nepotpuno razjašnjen. Pokazano je da je jedan od patogenih mehanizama formiranje reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) i inhibicija aktivnosti antioksidativnih enzima u renalnom tkivu. Reaktivne vrste kiseonika, kao što su vodonik peroksid, hidroksilni radikal, singlet kiseonik, superoksidni anjon i peroksil radikal, se formiraju unutar ćelija i mogu izazvati oštećenje ćelija i nekrozu putem nekoliko mehanizama, uključujući peroksidaciju membranskih lipida, denaturaciju proteina i oštećenje DNK (Karadeniz i sar., 2011; Silici i sar., 2011; Yao i sar., 2007). Iako tačan mehanizam cisplatinom-indukovane nefrotoksičnosti nije potpuno razjašnjen, mnoge studije pokazuju da cisplatin ima višestruke intraćelijske efekte koji se ostvaruju njegovom akumulacijom u ćelijama proksimalnih tubula i konverzijom u nefrotoksine što potom dovodi do oštećenja nuklearne i mitohondrijalne DNK, aktiviranja puteva ćelijske smrti, kao i pokretanja snažnog inflamatornog odgovora (Yao i sar., 2007; Arjumand i sar., 2011). S obzirom na ozbiljnost i klinički značaj cisplatinom-indukovane nefrotoksičnosti, postoji sve veće interesovanje u identifikaciji osnovnih mehanizama koji oštećuju bubreg kako bi se odredile terapijske strategije koje bi mogle sprečiti ova oštećenja izazvana cisplatinom.

U našoj eksperimentalnoj studiji akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvali smo jednokratnom primenom cisplatina u dozi od 8 mg/kg. Nefrotoksično delovanje smo potvrdili laboratorijskim nalazima koji su pokazali da su koncentracije kreatinina i ureje u serumu bile statistički značajno povećane u grupi pacova tretiranoj cisplatinom u odnosu na ostale grupe pacova. Koncentracije natrijuma i kalijuma u serumu pacova koji su tretirani samo cisplatinom bile su statistički značajno smanjene u odnosu na kontrolnu i ostale eksperimentalne grupe pacova. Laboratorijski rezultati su u korelaciji sa prethodnim studijama rađenim na sličnim eksperimentalnim modelima (Palipoch i sar., 2013; Ashrafi i sar., 2012; Hadjzadeh i sar., 2012). Analiza laboratorijskih parametara u našoj eksperimentalnoj studiji bila je u korelaciji sa dobijenim patohistološkim rezultatima. Patohistološki nalaz dobijen analizom renalnih sekcija bojenih HE, PAS i JONES metodom pokazao je pojavu apoptoze, degeneracije, vakuolizaciju i edem ćelija proksimalnih tubula,

kao i dilataciju lumena ovih tubula kod pacova tretiranih cisplatinom. Naši rezultati su potvrdili ranija zapažanja da cisplatin primarno oštećuje proksimalne tubule, zbog njegove akumulacije u ovom delu nefrona i konverzije u nefrotoksine. Palipoch i sar. (2013) su administracijom različitih doza cisplatina i analizom nastalih promena pokazali da je nefrotoksičnost cisplatina dozno zavisna. Njihova ispitivanja su pokazala da primena cisplatina u dozi od 10 mg/kg izaziva promene u vidu apoptoze, vakuolizacije i prisustva hijalinih cilindra u lumenu tubula. Pri većim dozama bila je prisutna i nekroza, i to naročito u proksimalnim tubulima bubrega.

Disfunkciji proksimalnih tubula kod nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom prethode alteracije u bubrežnoj hemodinamici. Četrdeset osam do 72 sata nakon administracije cisplatina, nastaje smanjena reapsorpcija na nivou proksimalnih i distalnih tubula i povećan vaskularni otpor (Daugaard i sar., 1989). Nefrotoksičnost indukovana cisplatinom se karakteriše disfunkcijom ćelija proksimalnih tubula bubrega. Cisplatin remeti transport vode, hranljivih materija i elektrolita koji je posredovan pumpama za natrijum na apikalnoj i bazolateralnoj strani ćelija, kao što su  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATP-aza,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  kotransporter III,  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  pumpa i kanalima propustljivim za vodu, uključujući akvaporine 1, 2, i 3 (Bae i sar., 2009; Lajer i sar., 2005).

Cisplatin inhibiše aktivnost transportera u četkastom pokrovu i u in vivo i in vitro modelima (Yoshiki i sar., 2000). Oštećenja izazvana cisplatinom mogu uticati na integritet citoskeleta i polaritet ćelija, što dovodi do promena koncentracija jona vodonika, kalijuma, magnezijuma i kalcijuma i doprinosi smanjenju reapsorpcije ovih jona u proksimalnim i distalnim tubulima, kao i povećanom izlučivanju ovih jona putem mokraće (Lajer i sar., 2005). Dakle, rezultati tretmana cisplatinom jesu poremećena tubularna reapsorpcija i poliurija (Daugaard i sar., 1989; Lajer i sar., 2005). Poliurija koja prati administraciju cisplatina, javlja se u 2 različite faze. Prva faza se javlja u prvih 24 do 48 h posle administracije i odlikuje se smanjenom osmolarnošću urina ali stabilnom GF. To je verovatno prostaglandinima posredovana faza i može se sprečiti vazopresinom i aspirinom ili prestaje spontano. Druga faza počinje između 72 i 96 sati nakon davanja cisplatina i karakteriše se smanjenjem GF. Ova faza je povezana sa poremećajem cirkulisanja ureje kroz medulu što dovodi do smanjenja medularnog tonusa i oštećenog NaCl transporta u proksimalnim tubulima i debelom ascedentnom kraku Henleove petlje. Ova faza ne reaguje na lekove (Isnard-Bagnis, 2003; Meyer i sar., 1994). Efekat na transport natrijuma i vode predstavlja ranu promenu u cisplatinskoj toksičnosti jer se inhibicija transportera javlja kod pacova bez povećanja ureje i kreatinina (Daugaard i sar., 1989; Kintzel, 2001).

Patološke promene u cisplatin-indukovanoj nefrotoksičnosti se javljaju uglavnom u S3 segmentu proksimalnog tubula u spoljašnjem delu medule. Ova zona bubrega je podložnija ishemijskim oštećenjima, a oštećenja ovog segmenta javljaju se i u drugim modelima toksične akutne bubrežne insuficijencije (Winston i sar., 1985). Hipoksija tubula u spoljnoj meduli identifikovana je pimonidazol bojenjem kod nefrotoksičnosti cisplatina, gde su analize isečaka tkiva bubrega ukazale da su značajan deo hipoksičnih ćelija upravo ćelije proksimalnih tubula (Tanaka i sar., 2005). Dakle, hipoksija može imati važnu ulogu u cisplatin-izazvanoj nefrotoksičnosti, koja se verovatno razvija tokom smanjenog bubrežnog protoka krvi tokom početne faze cisplatinске nefrotoksičnosti. Međutim, hipoksijom-indukovani faktor 1 (HIF-1) se aktivira u S3 segmentu proksimalnih tubula kod oštećenja izazvanih cisplatinom in vivo. HIF-1 je transkripcijski faktor koji posreduje ćelijske odgovore na hipoksiju, uključujući i angiogenezu, eritropoezu i glikolitičku adaptaciju. Životinje koje su HIF-1 negativne pojačano su osetljive na oštećenja izazvana cisplatinom posredovana apoptozom koja je povezana sa povećanim oslobađanjem citohroma C, gubitkom potencijala mitohondrijalne membrane i povećanjem aktivnosti kaspaze 9 (Tanaka i sar., 2005), tako da je neto efekat hipoksije u cisplatinom-izazvanim oštećenjem bubrega nejasan.

Pitanje je da li je oštećenje DNK primarni događaj i uzrok cisplatinom uzrokovane ćelijske smrti. U stvari, samo male količine ćelijske platine (<1%) se vezuje za nuklearnu DNK i slaba je povezanost između senzitivnosti ćelija na cisplatinom izazvanu ćelijsku smrt i stepena platinacije DNK (Burger i sar., 1997). Štaviše, Mandić i sar. (2003) su koristili bezjedarne ćelije da pokažu da se cisplatinom izazvani apoptotički signali javljaju nezavisno od oštećenja nuklearne DNK. Brojni su dokazi koji ukazuju da su mitohondrijalna DNK i uopšte mitohondrijalne mete verovatno važnije nego oštećenja jedarne DNK u cisplatinom uzrokovanoj ćelijskoj smrti (Cullen i sar., 2007). Cisplatin se hidrolizuje i stvara pozitivno naelektrisane metabolite koji se pre svega nakupljaju u negativno naelektrisanim mitohondrijama, tako da senzitivnost ćelija na cisplatin korelira sa brojem mitohondrija (Qian i sar., 2005) i membranskim potencijalom mitohondrija (Hirama i sar., 2006). Dejstvo cisplatina na mitohondrije dovodi do gubitka mitohondrijalnih sulfhidril grupa proteina, inhibicije preuzimanja kalcijuma i smanjenja membranskog potencijala mitohondrija (Saad i sar., 2004). Ovo može objasniti posebnu osetljivost proksimalnih bubrežnih tubula na cisplatinску citotoksičnost, jer ovaj segment sadrži najveći broj mitohondrija u bubregu (Gullans i sar., 2000). Poređenje cisplatin senzitivnih i cisplatin rezistentnih ćelija karcinoma jajnika pokazalo je razliku u nižem membranskom potencijalu mitohondrija, kao i manje oštećenje mitohondrijalne DNK kod rezistentnih ćelija (Hirama i sar., 2006). Osim toga,

zmanjenje mitohondrijalne DNK izazvano rastom ćelija u ethidium bromidu stvara ćelije izuzetno otporne na cisplatin (Qian i sar., 2005). Konačno, mitohondrijalna DNK može biti osetljivija od nuklearne DNK na cisplatinom indukovano oštećenje, zbog manje efikasnih mehanizama za popravku DNK (Olivero i sar., 1997).

Kada se akumulira u mitohondrijama bubrežnih ćelija, cisplatin remeti bioenergetiku mitohondrija, povećavajući generisanje reaktivnih vrsta kiseonika (RVK), smanjujući apsorpciju kalcijuma u mitohondrije i izazivajući oslobađanje pro-apoptotičkih faktora, što na kraju dovodi do smrti tubularnih ćelija (Santos i sar., 2008). Mitohondrijalna energetika poremećena cisplatinom može doprineti razvitku nefrotoksičnosti. Masne kiseline su glavni izvor energije za proksimalni tubul, primarno mesto oštećenja bubrega cisplatinom. Cisplatin inhibiše oksidaciju masnih kiselina u bubregu miša i u kulturama ćelija proksimalnih tubula kroz smanjenje ekspresije receptora aktiviranih peroksizomalnim proliferatorom alfa (PPAR- $\alpha$ ), posredovano genima koji učestvuju u iskorišćavanju ćelijskih masnih kiselina (Li i sar., 2004a; Portilla i sar., 2002). Agonisti PPAR- $\alpha$  smanjuju cisplatinu nefrotoksičnost in vivo (Li i sar., 2004a, Li i sar., 2004b). Cisplatin takođe utiče na respiratorne mitohondrijalne komplekse i njihovu funkciju. Izloženost kultivisanih ćelija proksimalnih tubula cisplatinu in vitro inhibiše mitohondrijalne komplekse I - IV respiratornog lanca a kao rezultat toga, smanjuje količine intraćelijskog ATP-a (Kruidering i sar., 1997). Cisplatin in vivo takođe rezultuje mitohondrijalnom disfunkcijom što potvrđuje pad elektrohemijskog membranskog potencijala, osetan pad mitohondrijalnog kalcijuma i iscrpljivanje mitohondrijalnog antioksidativnog odbrambenog sistema (Arany i sar., 2008; Miller i sar., 2010; Portilla i sar., 2002).

Osim oštećenja proksimalnih tubula, cisplatin deluje i na glomerule gde može izazvati različite promene, o čemu nema dovoljno podataka u dosadašnjoj literaturi. Najizraženije promene opisane su u mitohondrijama endotelijalnih ćelija u vidu parakristalnih inkluzija, a opisane su i deplecija organela, formiranje intracitoplazamatskih vakuola, lipidnih tela i konstrikcija lumena kapilara (Kohn i sar., 2002).

U našoj studiji, patohistološka analiza bubrežnih isečaka u CIS grupi pokazala je da su glomeruli bili uvećani sa suženjem Boumanovog prostora, generalizovanom kongestijom i periglomerularnom infiltracijom inflamatornim ćelijama. Glomerularna bazalna membrana je bila nejednako zadebljana kod pacova CIS grupe.

Oštećenje glomerula, naročito glomerularne bazalne membrane dovodi do alteracije glomerularne filtracije. Glomerularna filtracija se smanjuje putem nekoliko mehanizama: prvo, poremećena tubularna reapsorpcija aktivira tubuloglomerularnu povratnu spregu; drugo,

oštećenja zidova tubula dovode do vraćanja tubularne tečnosti u krv; treće, vazokonstrikcija i vaskularna kongestija povećavaju renalni vaskularni otpor i smanjuju renalni protok krvi i četvrto, kontrakcija mezangijalnih ćelija smanjuje koeficijent filtracije (Kf) (Cornelison i sar., 1993).

Promene GF i bubrežnog krvotoka najverovatnije odražavaju povećan renalni vaskularni otpor nastao kao odgovor tubuloglomerularne povratne sprege zbog povećanog natrijum-hlorida u oblasti ćelija makule densa. Tubuloglomerularna povratna sprega se prilagođava u roku od nekoliko sati nakon aktivacije, što ukazuje da su direktni i indirektni vaskularni efekti koji ograničavaju protok krvi uglavnom odgovorni za održavanje smanjene GF, uključujući i poremećenu renalnu ekskreciju i akumulaciju otpadnih produkata u krvi. Među njima, najznačajniji su: (a) smanjenje bubrežnog protoka krvi što dovodi do povećanog bubrežnog vaskularnog otpora, (b) smanjenje koeficijenta filtracije (Kf) i (c) nekroza tubula sa posledičnom opstrukcijom tubula i vraćanjem tubularne tečnosti u krvotok (Fent i sar., 1988). Značajno smanjenje GF indukovano ciklosporinom, cisplatinom ili gentamicinom povezano je sa приметnim smanjenjem Kf (dos Santos i sar., 1991; McCauley, 1993). Najverovatnije je kontraktilno stanje glomerula glavna odrednica bubrežne hemodinamske regulacije i koeficijenta filtracije (Kf) (Mene i sar., 1989). Smanjenje glomerularne filtracione površine izazvane glomerularnom kontrakcijom takođe može biti logično objašnjenje za pad GF. Pored toga, cisplatin je u stanju da izazove kontrakciju mezangijalnih ćelija (Delbancut i sar., 1994), a patofiziološki mehanizmi koji regulišu Kf upravo zavise od aktivnosti intraglomerularne kontrakcije mezangijalnih ćelija (Martinez-Salgado i sar., 2007).

Mezangijalne ćelije su perivaskularne ćelije locirane unutar centralnog dela glomerula između kapilarnih petlji (Mene i sar., 1989) i imaju različite funkcije, uključujući: (a) sintezu i izgradnju mezangijalnog matriksa, što zauzvrat reguliše viskoelastične i hidrauličke osobine mezangijuma; (b) endocitozu i obradu makromolekula plazme uključujući imunokomplekse; (c) kontrolu glomerularne hemodinamike, uglavnom Kf, preko njihove kontrakcije ili oslobađanjem vazoaktivnih hormona; i (d) mehaničku trakciju glomerularne bazalne membrane i oblaganje endotelnih kapilara prisustvom značajnih kontrakcijskih elemenata citoskeleta. Većina autora se slaže da mezangijalne ćelije igraju glavnu ulogu u glomerularnoj kontrakciji i skupljanju filtracione površine, kao i regulacije Kf (Mene i sar., 1989; Pfeilschifter, 1989).

Nizak nivo GF tokom rane akutne bubrežne insuficijencije izazvane cisplatinom je praćen smanjenim bubrežnim protokom krvi, ukazujući na preglomerularnu vazokonstrikciju (Winston i sar., 1985; Safirstein, 1986). Renalni protok krvi se može smanjiti u roku od 3 sata

nakon aplikacije cisplatina, a GF opada nakon smanjenja bubrežnog protoka krvi (Cornelison i sar., 1993).

Poznato je da je važna komponenta patofiziološkog mehanizma akutnog oštećenja bubrega cisplatinom povezana sa smanjenjem medularnog protoka krvi i smanjenim dopremanjem kiseonika i hranljivih materija tubularnim ćelijama i posledičnim ćelijskim oštećenjem nastalim usled neravnoteže između dopremanja i potrošnje kiseonika (Winston i sar., 1985). Umesto normalne autoregulacije i nastanka renalne vazodilatacije koja se dešava tokom smanjenja bubrežne perfuzije, ishemični bubrezi pokazuje izrazitu vazokonstrikciju i mogu da podlegnu hipoksičnim povredama sa gubitkom normalne vaskularne autoregulacije protoka krvi (Schrier i sar., 2004). Takođe, povećavajući reaktivnost na vazokonstriktorne agense i smanjenjem vazodilatatornih agenasa kao što su azotoksid (NO) i prostaglandini, dolazi do abnormalnog vaskularnog tonusa koji je takođe dokazan kod tretmana cisplatinom. Vazokonstrikcija nastaje delimično zbog oslobađanja angiotenzina II (Saad i sar., 2007), endotelina-1 (Bae i sar., 2009) i faktora aktivacije trombocita PAF (dos Santos i sar., 1991). Štaviše, postoje dokazi da proizvodnja vazodilatatornih prostaglandina, kao što je prostaglandin E1 (PGE1), opada posle aplikacije cisplatina, doprinoseći napredovanju renalne vazokonstrikcije izazvane cisplatinom. Bubrežne hemodinamske promene mogu biti i u vezi sa povećanjem nivoa kalcijuma u citoplazmi glomerularnih arteriola (Kawai i sar., 2006). Štaviše, pokazalo se da blokatori kalcijumovih kanala povećavaju protok krvi i ublažavaju renalnu disfunkciju povezanu sa cisplatinom (Khan i sar., 2009).

Jedan od ciljeva našeg istraživanja bio je da kvantifikujemo promene izazvane cisplatinom na glomerulima i tubulima, a naročito na glomerularnoj bazalnoj membrani. Morfometrijska analiza glomerula pokazala je da su pacovi koji su dobijali cisplatin imali uvećane glomerule u odnosu na ostale eksperimentalne grupe, a što je bilo potvrđeno signifikantno većim vrednostima glomerularne površine, perimetra i Feretovog dijametra. Debljina GBM je bila statistički značajno veća u CIS grupi u odnosu na ostale grupe životinja. U dosadašnjoj literaturi sličan nalaz je pronađen kod nefrotoksičnosti izazvane gentamicinom (Stojiljkovic i sar., 2012a).

Takođe, utvrdili smo da su prosečne vrednosti celularnosti glomerula bile signifikantno manje kod pacova tretiranih cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu, ali i u odnosu na grupe tretirane kvercetinom i aminogvanidinom. Ovaj rezultat pokazuje da primena cisplatina u jednokratnoj dozi od 8 mg/kg dominantno izaziva apoptozu u odnosu na proliferaciju, s obzirom da je poznato da cisplatin simultano izaziva i proliferaciju i apoptozu glomerularnih ćelija (Rodriguez-Barbero i sar., 2000; Ju i sar., 2014).



Patohistološkom analizom isečaka tkiva bubrega CIS grupe pacova zapažena je primetna peritubularna i periglomerularna infiltracija leukocitima. Ranije je utvrđeno da administracija cisplatina izaziva povećanje neutrofila u bubregu (Ramesh i sar., 2002; Kelly i sar., 1999; Faubel i sar., 2007; Zhang i sar., 2008; Tadagavadi i sar., 2010b). Ublažavanje cisplatinске nefrotoksičnosti, inhibicijom TNF- $\alpha$  ili TLR4 signalizacije, inhibicijom ICAM-1 ili primenom IL-10, je povezano sa smanjenjem neutrofila u bubregu (Ramesh i sar., 2004; Ramesh i sar., 2002; Ramesh i sar., 2003; Zhang i sar., 2008; Kelly i sar., 1999; Deng i sar., 2001). Međutim, Faubel i sar. (2007) su pokazali da deplecija neutrofila korišćenjem anti-neutrofilnih antitela nije imala efekta na cisplatinom indukovanoj renalnoj disfunkciji ili tubularnoj nekrozi, iako je infiltracija neutrofila bila značajno smanjena. Ovi rezultati sugerišu da infiltracija neutrofila nije esencijalna za cisplatin-indukovana oštećenja bubrega i može pre biti odraz težine oštećenja nego uzrok same nefrotoksičnosti.

U našem istraživanju određivali smo i morfometrijske parametre tubula, i to površinu epitela i nukleocitoplazmatski odnos tubularnih ćelija. Rezultati morfometrijske analize su pokazali jaku povezanost sa histološkim promenama koje smo našli u našem eksperimentalnom modelu akutne bubrežne insuficijencije izazvane cisplatinom. Površina epitela i nukleocitoplazmatski odnos ćelija proksimalnih tubula su bili značajno izmenjeni kod životinja kojima je aplikovan cisplatin, tj. površina epitela je bila signifikantno veća a nukleocitoplazmatski odnos značajno manji kod pacova koji su dobijali cisplatin u odnosu na sve ostale grupe životinja. Kod distalnih tubula su nađene znatno blaže promene. Kvantifikacija ovih promena morfometrijskom metodom pokazala je da je površina epitela distalnih tubula bila veća kod pacova tretiranih samo cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj nalaz je u korelaciji sa ranijim pretpostavkama da cisplatin primarno oštećuje proksimalne tubule usled njegove akumulacije u ovom delu nefrona (Yao i sar., 2007).

Apoptoza ćelija bubrežnih tubula je ispitivana kod različitih bubrežnih oboljenja kao i kod cisplatinске nefrotoksičnosti (Yamate i sar., 2000), kod koje se nekrotična ćelijska smrt povezuje sa većim dozama cisplatina, dok manje koncentracije indukuju apoptozu (Lieberthal i sar., 1996; Baek i sar., 2003). Morfološke karakteristike nekroze i apoptoze su sasvim drugačije. Apoptotične ćelije su pokazale gubitak kontakta između ćelija veoma rano tako da su ćelije pojedinačno odvojene od monosloja. Nekrotične ćelije postaju postepeno uvećane sa povećanjem citoplazme i odvajanjem od monosloja u vidu povezanih delova mrtvih ćelija, dok se kondenzacija hromatina ne javlja u jedrima (Lieberthal i sar., 1996). Baek i sar. (2003) su potvrdili povećano oslobađanje citohroma C iz mitohondrija i zapazili su porast aktivnosti

kaspaze-3 u primarnim kulturama proksimalnih tubula zeca nakon njihovog izlaganja cisplatinu.

Aktivacija kaspaze je ključni korak u započinjanju apoptoze. Različiti stimulusi mogu aktivirati kaspaze uključujući i one koji aktiviraju receptore smrti plazma membrane (kaspaza 8) i izazivaju mitohondrijske disfunkcije (kaspaza 9). Kaspaze su ili inicijatori ili egzekutori apoptoze. Inicijatorne kaspaze uključuju kaspaze 8 i 9, i aktiviranje ovih kaspaza rezultira aktivacijom kaspaza kao što su 3 i 7 (Salvesen i sar., 2004). Ove kaspaze su odgovorne za mnoge biohemijske karakteristike apoptoze, uključujući cepanje i aktiviranje polimeraza i inhibitornih domena proteina koji aktiviraju kaspaze, što dovodi do DNK fragmentacije. Cisplatin prvenstveno izaziva smrt ćelije apoptozom i defekt u apoptotskoj signalizaciji takođe može doprineti rezistenciji na cisplatin. Spoljašnji put apoptoze započinje kada se ligandi vezuju za receptore super familije faktora tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) što je praćeno aktiviranjem prokaspaze-8 preko molekula adaptera i formiranjem kompleksa signala koji izazivaju ćelijsku smrt. Unutrašnji put se inicira ćelijskim stresom, kao što je oštećenje DNK, što dovodi do oslobađanja citohroma C iz mitohondrija, izaziva aktivaciju prokaspaze-9 kroz interakciju sa apoptoza-promovišućim aktivirajućim faktorom-1 (APAF-1) i formiranje aktivnog apoptotskog kompleksa. Bcl-2 familija proteina reguliše oštećenjem DNK-indukovanu apoptozu regulišući oslobađanje mitohondrijalnog citohroma C kao odgovor na oštećenje DNK. Cisplatinom-indukovan genotoksičan stres aktivira višestruke transdukcione signale, koji mogu doprineti apoptozi ili hemorezistenciji.

Cisplatinom izazvana nefrotoksičnost je posredovana i intraćelijskim putevima signalizacije preko mitogenom-aktiviranih protein kinaza (MAPK). Sistem signalizacije mitogen-aktiviranih protein kinaza (MAPKs) se sastoji od više aktivacionih puteva serin/treonin protein kinaza, koje se aktiviraju različitim ekstracelularnim signalima i regulišu mnoge ćelijske procese kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija, apoptoza i preživljavanje (Dhillon i sar., 2007; Owens i sar., 2007). Jun N-terminalna kinaza (JNK) i p38 MAPK, aktivirani različitim biološkim, fizičkim i hemijskim stimulusima, su ključni medijatori stresa, inflamatornog odgovora, kao i apoptotičnih puteva (Francescato i sar., 2007; Ramesh i sar., 2005), dok su ekstracelularnim-signalom-regulisane kinaze (ERKs) uglavnom indukovane faktorima rasta i povezane su sa mehanizmima ćelijske smrti i preživljavanja ćelija (Jo i sar., 2005; Kim i sar., 2005; Wei i sar., 2007a). Brojni autori su opisali različite obrasce za aktiviranje tri glavna MAPKs puta (ERK, JNK, i p38) korišćenjem in vitro i in vivo eksperimentalnih modela kod nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom (Pabla i sar., 2008b; Francescato i sar., 2009). ERK put se tipično aktivira ekstraćelijskim faktorima rasta, p38 i

JNK putevi se aktiviraju različitim vrstama stresa, npr. oksidansima, UV zračenjem, hiperosmolarnošću, inflamatornim citokinima. Ovi događaji nishodno regulišu aktivaciju p38 MAPK što dovodi do sinteze TNF-alfa kod oštećenja bubrega cisplatinom. Takođe, Arany i sar. (2004) su pokazali na in vivo modelu da rana aktivacija ERK, p38 i JNK cisplatinom prethodi razvitku akutne bubrežne insuficijencije. ERK takođe aktivira i kaspazu 3, koja kontroliše apoptozu u tubularnim ćelijama. Fosforilisana ERK je lokalizovana u distalnim tubulima, tako da aktivacija ERK posreduje oštećenju ovih nefrona. Još uvek je nejasno da li ERK doprinosi i oštećenju proksimalnih tubula, ali moguće je da promene koje nastaju u distalnim tubulima indukuju i oštećenje proksimalnih preko autokrinih i parakrinih procesa (Jo i sar., 2005). Aktivacija p38 posreduje u oštećenju proksimalnih tubula čiju stimulaciju uzrokuju hidroksilni radikali čija je produkcija izazvana cisplatinom (Ramesh i sar., 2005). JNK put još uvek nije dovoljno proučen. Svakako, uloga MAPKs kod oštećenja bubrega cisplatinom je veoma kompleksna i zavisi od vrste ćelija, jačine i vrste stresa kojima se ćelije izlažu kao i od eksperimentalnog modela. Aktivacija MAP kinaza može biti delimično odgovorna za aktivaciju različitih signalnih puteva koji dovode do oštećenja i smrti bubrežnih ćelija.

Iako je tačan mehanizam nastanka cisplatinom izazvane nefrotoksičnosti još uvek nejasan, mnoge studije su potvrdile da cisplatin ima višestruke intraćelijske efekte izazivajući citotoksičnost preko delovanja RVK, aktivacijom mitogenom-aktivirane protein kinaze, indukcijom apoptozu i zapaljenskih procesa (Arjumand i sar., 2011). U našem istraživanju, ispitivali smo mehanizme cisplatinske nefrotoksičnosti analizom parametara oksidativnog stresa MDA, CAT i AOPP. MDA je pokazatelj nivoa lipidne peroksidacije, CAT ukazuje na stanje antioksidativnog sistema, a AOPP je parametar oksidativne modifikacije proteina.

Lipidna peroksidacija (LPO) predstavlja autokatalitički proces koji se najčešće završava ireverzibilnim oštećenjima funkcije i strukture ćelijske membrane (Pavlovic, 2006). Ova reakcija započinje oduzimanjem vodonikovog atoma sa masne kiseline, tako da nastaju lipidni radikali sa neuparenim elektronima koji brzo reaguju sa kiseonikom i stvaraju peroksil radikal (Gutteridge, 1995). Nakon toga nastali peroksil radikal dovodi do stvaranja hidroperoksida i novih lipidnih radikala, što predstavlja lančanu reakciju koja se naziva peroksidacija lipida (Halliwell, 1993). Da bi proces lipidne peroksidacije otpočeo i bio kontinuirano nastavljen, a potom i kontrolisano zaustavljen, neophodno je prisustvo supstrata koji oksidiše, prisustvo RKV sa visokim oksidativnim potencijalom, prisustvo O<sub>2</sub>, metala sa promenljivom valencom, kao i delovanje antioksidativnih enzima, vitamina i antioksidanasa važnih za završetak ovog procesa. Serijom kompleksnih reakcija dolazi do stvaranja produkata koji sadrže karbonilnu

grupu kao što su nonenal, 4-hidroksi pentenal i kratkolančani malondialdehid (MDA) (Pavlovic, 2006). Produkti lipidne peroksidacije, posebno MDA, reaguju sa slobodnim SH i NH<sub>2</sub> grupama aminokiselina, peptida, proteina, nukleotida i fosfolipida, dovodeći do poremećaja funkcije ćelijske membrane i njene propustljivosti za vodu i jone i inaktivisanja enzima prisutnih u membrani (Mitosek-Szewczyk i sar., 2010). Takođe, ovi produkti mogu oštetiti i membrane lizozoma što dovodi do oslobađanja hidrolitičkih enzima, kao i membrane mitohondrija što uzrokuje oslobađanje jona Ca i aktivaciju enzima zavisnih od ovog jona (Pandey i sar., 2010). Reagovanjem sa DNK, MDA može prouzrokovati mutagene lezije koje mogu biti uključene u patologiju različitih bolesti (Spiteller, 2001; Sodergren, 2000). Najzad, ova lančana reakcija se završava kada se formiraju nereaktivni radikali ili se u potpunosti iskoriste kiseonik i/ili masne kiseline (Halliwell i sar., 1993).

Katalaza je jedan od enzima u sistemu antioksidativne zaštite koji reaguje sa RVK, neutrališe ih i pretvara u manje aktivne metabolite. Široko je rasprostranjena u tkivima, najviše je ima u peroksizomima, mitohondrijama i citoplazmi ćelija jetre i eritrocitima. Jedan je od endogenih antioksidativnih enzima koji igraju ključnu ulogu u smanjenju oksidativne modifikacije lipida i razgradnji vodonik peroksida na vodu i molekularni kiseonik čime prekida propagiranje reakcije lipidne peroksidacije (Arjumand i sar., 2011).

Slobodni radikali osim lipida mogu oštetiti i proteine. Poznato je da su proteini osetljivi na dejstvo RVK in vitro i in vivo. Oksidativna modifikacija proteina može nastati dejstvom različitih agenasa kao što su: RVK, fagocita, lekova, metabolita, lipidnih peroksida, procesi stvaranja prostaglandina, osidoreduktazni mehanizmi i slično. Oksidativna modifikacija proteina dovodi do strukturnih alteracija u vidu izmene primarne, sekundarne i tercijarne strukture proteina usled promena na molekulima aminokiselinskih rezidua (Feligioni i sar., 2013; Sitar i sar. 2013), kao i prilikom funkcionalne inaktivacije mnogih enzima (Sitte i sar., 2000). Takođe se menjaju i fizičko-hemijske osobine proteina, menja se njihova rastvorljivost u tečnostima, termička stabilnost, viskoznost, fluorescencija (Sadowska-Bartosz i sar., 2013). Produkti oksidativne modifikacije proteina mogu biti hloro i ditirozil produkti, amino-kiselinski adukti, hloramini i nitrotirozin. Takođe, oksidativnom modifikacijom proteina nastaju kompleksi proteina sa krajnjim produktima lipidne peroksidacije ili glikacije proteina pa se stvaraju uznapredovali produkti oksidacije proteina (eng. advanced oxidation protein products – AOPP), i krajnji produkti glikacije proteina (eng. advanced glycation end product - AGE) (Perez Gutierrez i sar., 2012).

U našem istraživanju, u CIS grupi pacova vrednosti MDA i AOPP u homogenatu bubrega bile su statistički značajno veće, dok je aktivnost CAT bila značajno snižena, u odnosu na ostale

grupe pacova. Naši rezultati su u skladu sa pretpostavkama da je deo mehanizma cisplatinске нефротоскиčnosti povezan sa deplecijom antioksidativnog sistema. Takođe, naši rezultati potvrđuju da cisplatin povećava produkciju RVK koji oštećuju lipidne komponente ćelijske membrane peroksidacijom i denaturacijom proteina i tako doprinose oštećenjima DNK i nastanku apoptoze. Nekoliko istraživača je pokazalo da cisplatin izaziva produkciju RVK u bubrežnim epitelnim ćelijama prvenstveno smanjenjem aktivnosti antioksidantnih enzima i iscrpljivanjem intraćelijske koncentracije GSH (Sadzuka i sar., 1994; Kruidering i sar., 1997; Huang i sar., 2001).

Postoje pretpostavke da se pri primeni cisplatinа produkuju RVK putem tri mehanizma. Prvo, kada se nađe jednom u ćeliji, cisplatin metaboliše u veoma reaktivnu formu koja može brzo da reaguje sa molekulima koji sadrže tiol, uključujući glutation (Arany i sar., 2003; Siddik, 2003). Deplecija ili inaktivacija glutationa i sličnih antioksidanasa cisplatinom remeti ćelijski redoks status, što dovodi do akumulacije endogenih RVK i oksidativnog stresa unutar ćelija. Unutar ćelije, cisplatin indukuje aktivnost glukozo-6-fosfat dehidrogenaze i heksokinaze, što povećava proizvodnju slobodnih radikala, dovodi do lipidne peroksidacije i iscrpljivanja antioksidantne zaštite (Yilmaz i sar., 2004).

Drugo, cisplatin može izazvati disfunkciju mitohondrija i povećanje proizvodnje RVK zbog oštećenja respiratornog lanca. Na primer, kod ćelija proksimalnih tubula, izlaganje cisplatinu na 20 minuta smanjuje aktivnost mitohondrijalnog respiratornog kompleksa I-IV za 15-55%, što rezultuje produkcijom RVK (Kruidering i sar., 1997). Uloga mitohondrijalne proizvodnje RVK kod cisplatinom-indukovanog oštećenja bubrega je dodatno dokazana i citoprotektivnim efektima mangan-superoksid dismutaze koja je lokalizovana u mitohondrijama (Davis i sar., 2001).

Najzad, cisplatin može da izazovu stvaranje RVK u mikrozomima preko citohrom P450 (CYP) sistema. Korišćenjem in vitro i in vivo modela, Baliga i sar. (1998a; 1998b; 1999) su pokazali da je CYP važan izvor katalitičkog gvožđa za produkciju RVK tokom lečenja cisplatinom. Kod CYP2E1-null miševa, cisplatinom-indukovana akumulacija RVK je smanjena, a samim tim je i oštećenje bubrega znatno ublaženo (Liu i sar., 2003).

Osim RVK i nitrozivni stres ima važnu ulogu u nastanku нефротоскиčnosti izazvane cisplatinom. Ђелиjski efekti RVK se pojačavaju obimnom produkcijom NO, koja je posledica sinteze iNOS. Tako kontinuirano nastaje peroksinitrit koji doprinosi razvitku akutne bubrežne insuficijencije (Ozen i sar., 2004; Saleh i sar., 2005; Chirino i sar., 2008; Kuhad i sar., 2007).

Ovaj porast proizvodnje reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta nakon tretiranja cisplatinom rezultira značajnim oštećenjem strukture i funkcije ćelija, uključujući lipidnu peroksidaciju, nitraciju belančevina, enzimsku inaktivaciju i oštećenje DNK (Cetin i sar., 2006; Spencer i sar., 2000; Waris i sar., 2006; Sastre i sar., 2000). Kao posledica toga, nastaje ćelijska disfunkcija i stvaranje unutarćelijskih signala za aktiviranje i apoptotičnih kao i puteva za preživljavanje ćelija koji izazivaju oštećenje i smrt bubrežnih ćelija (Jiang i sar., 2007; Ramesh i sar., 2005; Tsuji i sar., 2009). Oksidativna oštećenja uzrokovana RVK i RVA će dovesti između ostalog do povećane propustljivosti ćelija (Yorimitsu i sar., 2004; Kim i sar., 2006a), poremećaja signalnih transdukcija u ćeliji (Yorimitsu i sar., 2004, Kim i sar., 2006a; Shen i sar., 2006) i nekrotične ćelijske smrti ili apoptoze (Kim i sar., 2006b; Shen i sar., 2006).

Baek i sar. (2003) su proučavali uloge RVK kod cisplatinom-indukovane ćelijske smrti u primarnoj kulturi ćelija proksimalnih tubula zeca. Izlaganjem primarne kulture ovih ćelija različitim koncentracijama cisplatina, otkrili su da pri niskim koncentracijama cisplatinom indukovanoj apoptozu delimično sprečavaju Tiron i DMTU, ali ne i CAT i  $H_2O_2$  akceptor, piruvat (Baek i sar., 2003). Izlaganje visokim dozama cisplatina indukuje nekrozu, ali je moguće sprečiti njen nastanak dodatkom Tirona, CAT, piruvata, deferoksamina (DFO), troloksa (vitamin E mimetik), dok OH sakupljači (DMTU i tioureja) nisu uticali na cisplatinom-indukovanu nekrozu (Baek i sar., 2003). Ovi rezultati pokazuju da apoptoza delimično nastaje zbog formiranja OH, dok je cisplatinom indukovana nekroza povezana sa produkcijom  $H_2O_2$ .

Osim toga, Yoshida i sar. (2003b) su zapazili da cisplatin može da izazove proizvodnju OH u koncentracijski-zavisnom stepenu. Stvaranje OH uzrokovano cisplatinom je potpuno inhibirano dodavanjem melatonina koji štiti DNK, lipide i proteine od oksidativnog oštećenja izazvanog različitim slobodnim radikalima (Yilmaz i sar., 2006). Na osnovu ovih literaturnih podataka, pretpostavljamo da produkcija OH može biti delimično odgovorna za mehanizam oštećenja bubrega izazvanog cisplatinom.

U ranijim studijama, Tsutsumishita i sar. (1998) su zapazili značajnu produkciju  $H_2O_2$  u S3 ćelijama proksimalnih tubula bubrega nakon izlaganja cisplatinu, što je bilo smanjeno dodatkom CAT. S3 segmenti proksimalnih tubula bubrega su bili osetljiviji na cisplatin nego drugi segmenti kao što su ćelije spoljašnjih medularnih sabirnih tubula, a i razlika u osetljivosti može biti povezana delimično i sa produkcijom RVK, kao što je  $H_2O_2$ , koji je prekursor OH.

Cisplatinom-indukovana mitohondrijalna disfunkcija sa posledičnom indukcijom puteva ćelijske smrti je verovatno u osnovi mehanizma cisplatinске nefrotoksičnosti. Dobro je poznato da mitohondrije stalno proizvode reaktivne vrste kiseonika kao što je superoksid (Richter i sar., 1995). Mitohondrije takođe kontinuirano uklanjaju RVK putem delovanja antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza i glutation S-transferaza (Richter i sar., 1995). Izgleda da je mitohondrijalni glutation (GSH) od suštinskog značaja u regulaciji unutrašnje mitohondrijalne propustljivosti i funkciji enzima održavanjem SH grupa u redukovanom stanju. Kada se SH-grupe enzima ne održavaju u redukovanom obliku, one postaju inaktivisane. Toksičnost izazvana cisplatinom, posebno nefrotoksičnost, se izgleda odnosi na smanjenje unutarćelijskih koncentracija GSH i SH-grupa vezanih za proteine. Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), koji pomaže da se održi SH grupa, opada kod tretmana cisplatinom. Shodno tome, deplecija GSH i NADH rezultira inhibicijom nekih dehidrogenaza, što dovodi do oksidativne fosforilacije i formiranja hidroksil radikala i oksidativnog stresa. Ovi slobodni radikali napadaju polinezasićene lipide i proteine i iniciraju lipidnu peroksidaciju. Ovaj proces postaje autolitički i izaziva ozbiljno oštećenje integriteta ćelijske membrane (Aggarwal, 1998). Dalje ovi događaji oštećuju ćelije izazivanjem mitohondrijalnih oštećenja, inhibicijom mitohondrijalnih funkcija, iscrpljivanjem adenozin trifosfata (ATP) i drugih kofaktora. To verovatno dovodi do apoptoze i nekroze tkiva. Dalje, cisplatin može izazvati smanjenje aktivnosti glutation reduktaze (GR) od oko 20%, što doprinosi smanjenju nivoa GSH od čak 70% (Kruidering i sar., 1997). Kruidering i sar. (1997) su istraživanja sprovodili inkubacijom LLC-PK1 ćelija sa N, N - bis (2-hloretil) -N-nitrozourejom, inhibitorom GR i sa inhibitorima različitih mitohondrijalnih kompleksa. Jedino je N, N-bis (2-hloroetil) -N-nitrozoureja s rotenonom, koji je inhibitor respiratornog kompleksa I, indukovao formiranje RVK (Kruidering i sar., 1997). Nasuprot tome, upotreba antioksidansa difenil-p-fenilen-diamina i DFO potpuno je sprečila stvaranje RVK, ali ne i ćelijsku smrt (Kruidering i sar., 1997). Ovi rezultati daju značajan doprinos u objašnjenju mehanizma ćelijskog oštećenja izazvanog cisplatinom. Inhibicija respiratornog kompleksa I i inhibicija GR je, bez sumnje, uzrok formiranja RVK posle izlaganja cisplatinu međutim, osim ovih, postoje i drugi uzroci oštećenja ćelija.

Jedna od meta cisplatina u mitohondrijama su enzimski kompleksi koji sadrže lanac transporta elektrona, što dovodi do smanjenja celularnih nivoa ATP-a (Kruidering i sar., 1997; Nowak, 2002). Ako je doza cisplatina visoka, ATP deplecija je teža i nastaje brz metabolički kolaps i nekrotična ćelijska smrt (Lieberthal i sar., 1996). Manji nivoi iscrpljivanja ATP-a povezani su sa nižim dozama cisplatina što može indukovati apoptozu

preko oslobađanja mitohondrijalnog citohroma C, koji je identifikovan u kultivisanim bubrežnim epitelnim ćelijama izloženim cisplatinu (Park i sar., 2002; Nowak 2002). Stoga, iako ATP-iscrpljivanje može izazvati primarno oštećenje ćelije i programiranu ćelijsku smrt, takođe to može da ubrza formiranje RVK od strane oštećenih ćelija, što dovodi do RVK-posredovane ćelijske smrti iste ćelije ili čak susedne ćelije. Inhibicija produkcije RVK može ograničiti ovaj proces, a takođe može ublažiti nefrotoksičnost smanjenjem pratećeg inflamatornog odgovora (Kruidering i sar., 1997). Sagledano zajedno, ova zapažanja ukazuju na mitohondrijalnu DNK kao važan cilj toksičnog delovanja cisplatina (Cullen i sar., 2007; Miller i sar., 2010).

Veliki broj studija dokumentuje protektivne efekte različitih antioksidanasa u cisplatinom-indukovanoj nefrotoksičnosti. Pokazano je da antioksidansi kao što su superoksid dismutaze, dimetiltioureja i GSH smanjuju stepen bubrežne insuficijencije i oštećenja tubularnih ćelija kada se primenjuju istovremeno sa cisplatinom kod pacova (McGuinness i sar., 1978; Sadzuka i sar., 1994; Matsushima i sar., 1998). Antioksidansi, kao što su deferoksamin, probukol i hem oksigenaza-1 pružaju delimičnu zaštitu od cisplatinom-indukovane apoptoze u kulturi bubrežnih epitelih ćelija (Lieberthal i sar., 1996; Shiraishi i sar., 2000). Nadalje, značajno ublažavanje apoptoze i bubrežne insuficijencije u in vivo modelima je i rezultat tretiranja sa sakupljačem hidroksil radikala DMTU (Zhou i sar., 1999) kao i ciljanim ubacivanjem superoksid dismutaze u proksimalne tubule (Nishikawa i sar., 2001), kao i predtretmanom L-karnitinom (Chang i sar., 2002).

### **6.1. Protektivno dejstvo kvercetina na akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvanu cisplatinom**

Flavonoidi su familija fenolnih jedinjenja koja imaju biohemijska i farmakološka dejstva kao što su antibakterijsko, antivirusno, antiinflamatorno, antialergijsko, antineoplastično, kao i neuroprotektivno (Uivarosi i sar., 2010). Zahvaljujući njihovoj sposobnosti da sakupljaju slobodne radikale flavonoidi utiču na osnovne ćelijske funkcije kao što su rast, diferencijacija i apoptoza (Arjumand i sar., 2011).

Kvercetin je moćan flavonoid koji se može naći u mnogim namirnicama, i ima brojne korisne efekte. Kvercetin je do sada pokazao nefroprotektivne efekte u više eksperimentalnih modela (Satyanarayana i sar., 2001; Singh i sar., 2004; Abdel-Raheem i sar., 2009). Pored toga, Sanchez-Gonzalez i sar. (2011b) su pokazali da kvercetin može umanjiti zapaljenski proces u bubregu bez uticaja na antitumorsko dejstvo cisplatina. U našem istraživanju administracija kvercetina u dozi od 50 mg/kg, 4 dana pre i 4 dana posle jednokratne primene cisplatina dala



je značajan protektivni efekat kod nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom. Ublažavanje nefrotoksičnosti je dokazano signifikantnim smanjenjem koncentracija kreatinina i ureje u grupi pacova koja je dobijala cisplatin u kombinaciji sa kvercetinom u odnosu na grupu tretiranu samo cisplatinom. Efekat je bio sličan kao i u modelu koji je ispitivao Behling i sar. (2006) gde je utvrđeno da primena kvercetina može vratiti koncentracije ureje i kreatinina na početne vrednosti. S druge strane, u našem eksperimentalnom modelu, primena kvercetina je dovela i do ublažavanja patohistoloških promena izazvanih cisplatinom. Na isečcima bubrega pacova CISQ grupe bila je prisutna samo fokalna apoptoza tubularnih ćelija, bez dilatacije tubula, prisustva hijalinih cilindra, glomerularne kongestije i periglomerularne infiltracije. U istoj grupi životinja, GBM je bila značajno manje zadebljana nego kod CIS grupe pacova.

Kvantifikacijom patohistološkog nalaza morfometrijskom analizom glomerula pacova CISQ grupe utvrđeno je da su glomeruli bili statistički značajno manji u odnosu na glomerule pacova CIS grupe, što su potvrdile smanjene vrednosti površine, perimetra i Feretovog dijametra glomerula. Takođe je i celularnost bila statistički značajno veća kod pacova u CISQ grupi u odnosu na CIS grupu, što ukazuje da kvercetin ima protektivni efekat i na apoptozu glomerularnih ćelija, tj. da ima antiapoptotično dejstvo.

Morfološka oštećenja tubula su takođe bila značajno ublažena, što je utvrđeno morfometrijskom analizom tubularnih parametara. Naime, površina epitela proksimalnih tubula je bila značajno manja kod pacova tretiranih cisplatinom i kvercetinom, dok je nukleocitoplazmatski odnos bio signifikantno veći u odnosu na iste parametre analizirane kod pacova kod kojih je bio primenjen samo cisplatin. Laboratorijski, patohistološki i morfometrijski rezultati dobijeni u našoj studiji, nesumnjivo ukazuju da kvercetin ima protektivno dejstvo kod akutne bubrežne insuficijencije izazvane cisplatinom.

Nefroprotektivni efekat kvercetina je najverovatnije povezan sa njegovim antioksidativnim dejstvom, ali i sa njegovom sposobnošću da inhibira inflamaciju bubrega i apoptozu tubularnih ćelija (Sanchez-Gonzales i sar., 2011b). U našem istraživanju, primena kvercetina pre i posle administracije cisplatina je značajno ublažila promene ispitivanih oksidativnih parametara. Nivoi MDA i AOPP u homogenatima bubrega pacova CISQ grupe bili su značajno sniženi u odnosu na iste kod CIS grupe pacova. Primena kvercetina je signifikantno povećala aktivnost katalaze u homogenatu bubrega u CISQ grupi u odnosu na aktivnost katalaze kod životinja koje su jednokratno dobijale samo cisplatin. Naši rezultati ukazuju na ključnu ulogu kvercetina u sakupljanju slobodnih radikala koji nastaju dejstvom cisplatina, kao i u zaštiti lipida i proteina od oksidativne modifikacije i značajnu ulogu u očuvanju aktivnosti antioksidativnih enzima. Ovi efekti kvercetina svakako u velikoj meri doprinose

zaštiti strukturnih oštećenja bubrega nastalih delovanjem cisplatina, što smo i potvrdili patohistološkom i morfometrijskom analizom u našoj studiji.

I u nekim ranijim studijama je potvrđeno da kvercetin štiti membranske lipide, nuklearnu DNK i proteine od oksidativnog oštećenja, pre svega snažnom inhibicijom oksidativnog stresa (Morales i sar., 2006a). Fenolne hidroksilne grupe flavonoida, koje deluju kao donori elektrona, odgovorne su za aktivnost sakupljača slobodnih radikala (Bors i sar., 1990). Konkretno, kateholna struktura (O-dihidroksil struktura), koja poseduje dve hidroksil grupe u susednim položajima, je izuzetno superiornija u odnosu na druge dispozicije u sposobnosti doniranja elektrona i zato kvercetin i drugi flavonoidi koji sadrže katehol strukture mogu da imaju snažnu aktivnost u sakupljanju slobodnih radikala (Bors i sar., 1990; Rice-Evans i sar., 1996). Kada se flavonoidi koriste kao antioksidansi, slobodni radikali se uklanjaju a to onemogućuje njihovu reakciju sa azot oksidom, što na kraju rezultuje manjim oštećenjima (Shutenko i sar., 1999).

Osim toga, polifenoli, kao što su kvercetin i rutin mogu direktno da sakupljaju superoksidni anjon i inhibiraju nekoliko enzima koji učestvuju u produkciji ovog radikala, kao što su npr. ksantin oksidaze (Muthukumaran i sar., 2008a). Blasiak i sar. (2002a) su pokazali da je efikasnije sakupljanje slobodnih radikala omogućeno zbog prisustva hidroksilnih grupa u B-prstenu flavonoida (Blasiak i sar., 2002a). Oštećenje DNK izazvano  $H_2O_2$  može biti popravljeno polifenolima, međutim, da li se njihovo dejstvo ogleda samo kroz stimulaciju reparacije DNK ili samo u sprečavanju oksidativnog oštećenja DNK još uvek nije poznato (Silva i sar., 2008). Blasiak i sar. (2002a, 2001) su ispitivali efekte kvercetina na oštećenja DNK izazvanih određenim kancerogenim prehrambenim supstancama kao što su N-metil-N-nitro-N-nitroso-gvanidin i kadmijum upotrebom Komet testa. Ovo istraživanje je pokazalo da kvercetin smanjuje  $H_2O_2$ -indukovano oštećenje DNK zbog čega se može zaključiti da kvercetin deluje kao sakupljač hidroksil radikala koji se proizvode u ćeliji interakcijom vodonik peroksida i prelaznih metala i kadmijuma (Blasiak i sar., 2001, 2002a, 2002b).

Muthukumaran i sar. (2008b) su uporedili zaštitni efekat kvercetina kod disbalansa prooksidanasa i antioksidanasa izazvanog nikotinom u cirkulaciji, plućima, jetri i bubregu eksperimentalnih pacova. Utvrđeno je da kvercetin ispoljava zaštitni efekat na DNK oštećenja putem modulacije nivoa lipidne peroksidacije i povećanjem snage antioksidanskog sistema kod eksperimentalnih životinja (Muthukumaran i sar., 2008b).

Nekoliko in vitro ispitivanja su pokazala da je kvercetin sposoban da inhibiše lipopolisaharidima (LPS) indukovanu produkciju citokina. Na primer, kvercetin inhibiše LPS indukovanu produkciju TNF $\alpha$  u makrofagima i LPS-indukovanu proizvodnju IL8 u ćelijama

pluća (Geraets i sar., 2007). Štaviše, kod glijalnih ćelija je čak pokazano da kvercetin može da inhibiše LPS-indukovane nivoe mRNA dva citokina, TNF $\alpha$  i IL-1 $\alpha$  (Bureau i sar., 2008.). U kulturi mikroglija, ovaj efekat kvercetina rezultirao je smanjenjem apoptoze neurona (Bureau i sar., 2008). Evaluacija zaštitnih efekata kvercetina kod oksidativnih oštećenja DNK neuronskih ćelija pokazala je da kvercetin ima direktan uticaj na reaktivne vrste kiseonika (Silva i sar., 2008).

Antioksidativna aktivnost flavonoida može biti objašnjenja i njihovim helatnim dejstvom, jer joni prelaznih metala, kao što je jon gvožđa igraju ključnu ulogu u generisanju RVK preko Fentonove reakcije. Pored toga, katehol grupa direktno doprinosi helatirajućem dejstvu flavonoida (Brown i sar., 1998). Takođe, brojne studije su pokazale da kvercetin inhibiše lipidnu peroksidaciju sakupljanjem slobodnih radikala i / ili helatiranjem jona prelaznih metala (Terao i sar., 1999). U drugoj studiji Liu i sar. (2010) su ispitali efekat kvercetina kod olovom izazvanih oksidativnih oštećenja DNK i apoptoze u bubrezima pacova i pokazali da kvercetin štiti DNK od oksidativnih oštećenja obnavljanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (Liu i sar., 2010).

Kvercetin je jedan od flavonoida koji inhibiše aktivnost ksantin oksidaze, što rezultira smanjenjem oksidativnih oštećenja u tkivu (Shoskes, 1998; Chang i sar., 1993; Iio i sar., 1986). I ksantin dehidrogenaza i ksantin oksidaza su uključene u metabolizam ksantina u mokraćnu kiselinu. Ksantin dehidrogenaza je oblik enzima prisutnog u fiziološkim uslovima, ali njegova konfiguracija se menja u ksantin oksidazu u uslovima ishemije. Ksantin oksidaza je izvor RVK. U fazi reperfuzije ksantin oksidaza reaguje sa molekulskim kiseonikom, oslobađajući superoksidne slobodne radikale.

Cisplatin dovodi do povećane produkcije RVK, koji direktno ili indirektno preko nekoliko redoks-osetljivih signalnih puteva dovode do apoptoze ili nekroze tubularnih epitelnih ćelija (Francescato i sar., 2009; Lopez-Novoa i sar., 2011; Jo i sar., 2005) što je praćeno povećanom ekspresijom proinflamatornih medijatora koji pojačavaju citotoksični efekat (Taguchi i sar., 2005). Svakako, jedno od protektivnih dejstava kvercetina je i antiinflamatorni efekat. Moguće objašnjenje za antiinflamatorne efekte kvercetina može se naći u povezanosti između oksidativnog stresa i zapaljenja. RVK nisu samo uključeni u pojavu oksidativnog stresa, već i u inflamatorne procese preko aktivacije transkripcionih faktora kao što su NF-kB i aktivator proteina (AP) -1 koji indukuje proizvodnju citokina kao što je TNF $\alpha$  (MacNee, 2001; Rahman, 2002). Shodno tome, uklanjanje RVK ne samo da sprečava pojavu oksidativnog stresa, već pomaže i u ublažavanju zapaljenja. Već je pokazano da kvercetin može da inhibiše generisanje, kao i gensku ekspresiju TNF $\alpha$  preko modulacije NF-kB u humanim

mononuklearnim ćelijama periferne krvi (Nair i sar., 2006). Moguće objašnjenje mehanizma ove modulacije moguće je inhibicija degradacije inhibitornog dela (I $\kappa$ B $\alpha$ ) ovog faktora transkripcije (Peet i sar., 1999). Morel i sar. (1993) su pokazali da kvercetin pokazuje antiinflamatorno dejstvo preko inhibicije sinteze leukotriena i otpuštanja histamina. U stvari, pokazano je da kvercetin može da smanji produkciju TNF- $\alpha$  i NO indukovanu lipopolisaharidom, preko smanjenja aktivnosti NF- $\kappa$ B u makrofagima, mikroglijji i mastocitima (Rahman, 2002). Tribolo i sar. (2008) su pokazali da kvercetin i njegovi metaboliti mogu inhibisati ekspresiju ICAM-1 i VCAM-1 u ranim stadijumima inflamacije u humanim ćelijama vaskularnog endotela. Osim toga, prethodne studije su pokazale da kvercetin može prevenirati nefrotoksičnost izazvanu kadmijumom preko smanjenja prekomerne ekspresije iNOS i ciklooksigenaze 2 (COX-2), enzima koji su ključni u inflamatornim procesima (Morales i sar., 2006b).

Sanchez-Gonzales i sar. (2011b) su pronašli značajno smanjenu ekskreciju N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminidaze (NAG), laktat dehidrogenaze (LDH), alkalne fosfataze (ALP), molekula oštećenja bubrega-1 (kidney injury molecule-1, KIM-1) i gama-glutamil transferaze (GGT) kod primene kvercetina na modelu nefrotoksičnog delovanja cisplatina ukazujući na smanjeno oštećenje tubula. Ovi biomarkeri su prisutni u četkastom pokrovu (brush border) epitela tubula tako da se njihova urinarna ekskrecija javlja kod nekroze ili gubitka brush bordera, pa se zbog toga koriste za dokazivanje tubularne toksičnosti. N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminidaza se nalazi u lizozomima proksimalnih tubula i oslobađa se u urin kada nastane oštećenje lizosomalne membrane. Molekul oštećenja bubrega-1 je povezan sa ranim patofiziološkim događajima akutne bubrežne insuficijencije (Quiros i sar., 2010), tako da njegova smanjena ekskrecija pri aplikaciji kvercetina kod modela cisplatinke nefrotoksičnosti, ukazuje da kvercetin može delovati protektivno na sam početak razvitka akutne bubrežne insuficijencije. Očuvanje integriteta tubula dejstvom kvercetina kroz direktne citoprotektivne efekte kao i indirektno preko ublažavanja inflamatornih procesa, može objasniti očuvanu tubularnu funkciju nakon istovremene primene kvercetina i cisplatina. Tako, očuvanje tubularnih funkcija sprečava i smanjenje glomerularne filtracije preko tubuloglomerularne sprege. Dalje, pošto je poznato da inflamacija indukuje renalnu vazokonstrikciju i smanjuje protok krvi kroz bubrege, prevencija inflamacije će rezultirati boljom filtracijom (Lopez-Novoa i sar., 2011).

Pored zaštite tubula i direktni hemodinamski efekti mogu objasniti dejstvo kvercetina na nivo GF preko očuvanja protoka krvi u bubrežima. U skladu sa tim u nekim in vitro studijama

pokazano je vazodilatatorno dejstvo kvercetina i njegovih metabolita (Duarte i sar., 2001; Perez-Vizcaino i sar., 2006b).

Još jedna prednost primene kvercetina kao renoprotektivnog agensa je njegova bezbednost. Farmakokinetiska studija kod ljudi je pokazala da je primena kvercetina jednom dnevno u dozi 700–1000 mg/24h ili 8–10 mg/kg/24h potpuno bezbedna i može se primenjivati kako kod zdravih ljudi tako i kod pacijenata čija je bolest povezana sa oksidativnim stresom (Edwards i sar., 2007). Kod studija na životinjama, pokazano je da su i veoma visoke doze kvercetina i posle dugotrajne primene potpuno bezbedne (Utesch i sar., 2008).

## **6.2. Protektivno dejstvo aminogvanidina na akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvanu cisplatinom**

Aminogvanidin je nukleofilni agens koji u svojoj hemijskoj strukturi ima dva ključna mesta: nukleofilnu hidrazinsku grupu  $\text{NHNH}_2$  i dikarbonilnu gvanidinsku grupu  $\text{NH-C(=NH)NH}_2$ . To su dva ključna reaktivna mesta iz kojih proističu svi važniji efekti ovog agensa. In vitro i in vivo AG inhibiše formiranje visoko reaktivnih naprednih krajnjih produkata glikacije (AGEs) povezanih sa patogenezom sekundarnih komplikacija u dijabetesu i kardiovaskularnim promenama kod starenja (Sugimoto i sar., 1997). Aminogvanidin ublažava različite komplikacije dijabetesa i sprečava arterijske promene i srčanu hipertrofiju povezanu sa starenjem. Drugo, AG inhibiše NO sintaze, naročito izoformu inducibilne NO sintaze.

U našoj studiji, aplikovanje AG je rezultiralo smanjenjem ureje i kreatinina u serumu i ublažavanjem morfoloških promena u bubregu, najverovatnije njegovim citoprotektivnim dejstvom, tj. inhibicijom RVK i peroksinitrita. Patohistološke promene izazvane cisplatinom bile su značajno smanjene aplikacijom AG, što je pokazano patohistološkom analizom tkiva bubrega CISAG grupe gde su znaci oštećenja tubula, glomerula, kao i infiltracija leukocita bili značajno manji u poređenju sa patohistološkim promenama nađenim kod CIS grupe pacova. U CISAG grupi bile su prisutne fokalne degenerativne promene tubula, bez prisustva vakuola i apoptoze, dok su glomeruli imali normalnu histološku građu koja se nije razlikovala od glomerula K grupe životinja.

Morfometrijska analiza tubula i glomerula pokazala je da su površina proksimalnih tubula, površina glomerula, perimetar i Feretov dijametar bili statistički značajno manji u poređenju sa grupom pacova koja je dobijala samo cisplatin, što ukazuje na nesumnjiv protektivni efekat AG. Takođe, naša analiza debljine GBM pokazala je da je primena AG u CISAG grupi pacova značajno smanjila promene, odnosno prevenirala zadebljanje GBM koje je bilo znatno izraženo u grupi pacova tretiranih samo cisplatinom. Prosečne vrednosti celularnosti

glomerula kod životinja tretiranih cisplatinom i aminogvanidinom bile su statistički značajno veće u odnosu na celularnost glomerula u grupi tretiranoj samo cisplatinom ( $p < 0.001$ ). Prosečne vrednosti nukleocitoplazmatskog odnosa epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrega kod životinja tretiranih cisplatinom i aminogvanidinom bile su statistički značajno veće u odnosu na CIS grupu pacova.

Pretpostavlja se da nefroprotektivno dejstvo AG proističe iz promene oksidantnih i antioksidantnih parametara u bubrežnom tkivu. Cisplatinom izazvano povećanje nivoa AOPP i MDA i smanjenje aktivnosti CAT u CIS grupi bilo je znatno ublaženo primenom aminogvanidina, tako da sa nivoi MDA i AOPP bili značajno manji, odnosno aktivnost katalaze značajno veća u CISAG u odnosu na CIS grupu pacova. Ovakvo antioksidativno dejstvo AG je značajno doprinelo zaštiti tubula i glomerula.

Chirino i sar. (2008) su potvrdili da produkcija NO dejstvom iNOS ima toksičnu ulogu u nefrotoksičnosti indukovanoj cisplatinom. Azot monoksid je mali lipofilni molekulski medijator koji igra važnu ulogu u homeostatskoj regulaciji i integraciji glomerularnih, vaskularnih i tubularnih funkcija, kao i osnovnih ćelijskih funkcija, uključujući proliferaciju ćelija i energetske metabolizam (Liang i sar., 2000). Azot monoksid lako difunduje kroz ćelijsku membranu i lako stupa u hemijsku interakciju sa molekulima iz okruženja (Abraham i sar., 2000; Elfering i sar., 2002). Na mestu interakcije sa drugim biomolekulima stvara različite metabolite posredstvom kojih ostvaruje svoje efekte (Gaston i sar., 2003). Direktno, ili posredstvom intermedijarnih jedinjenja, NO neselektivno oštećuje tkiva, uzrokuje mitohondrijalnu disfunkciju, učestvuje u nitrovanju tirozina, nitrozilaciji tiolnih grupa (-SH) i dovodi do elektrolitnog disbalansa (Knott i sar., 2009). Biološka reaktivnost NO uslovljena je stepenom njegovog uklanjanja u reakciji sa hemoglobinom, stepenom aktivacije guanil ciklaze, transformacijom u peroksinitrit i interakcijom sa tiol grupama (Martinez i sar., 2009). Svoj fiziološki i patofiziološki efekat NO ostvaruje posredstvom radikalskih i neradikalskih RKV. Najznačajnije su  $\text{NO}_2$ ,  $\text{ONOOH}$ ,  $\text{ONOO}^-$  i  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Najvećim delom NO reaguje sa  $\text{O}_2^-$  i na taj način stvara izuzetno potentni oksidant, peroksinitrit  $\text{ONOO}^-$ . Azot monoksid je takođe prekursor  $\text{NO}_3$  i  $\text{NO}_2$  što sugeriše da ćelije sisara imaju biohemijsku mašineriju neophodnu za sintezu oksidisanih metabolita azota (Tarpey i sar., 2004). Iz navedenih razloga,  $\text{NO}_3$  i  $\text{NO}_2$  se koriste kao indeks brzine produkcije NO i 3-NT koji su pokazatelji nitrozativnog stresa. Mitohondrije proizvode superoksid čija se količina u patološkim stanjima povećava; zato će u prisustvu azot oksida, mitohondrije biti glavno mesto formiranja peroksinitrita (Radi i sar., 2002). Peroksinitrit je snažan oksidans koji iscrpljuje antioksidantnu odbranu, uključujući glutation i antioksidativne enzime (Olas i sar., 2004; Varma i sar., 2007; Reinartz i sar.,

2008). Iscrpljivanje zaštitnih antioksidantnih sistema rezultuje pojačanom peroksidacijom lipida i oštećenjem tkiva

Protektivni efekat AG kod bubrežnog oštećenja izazvanog cisplatinom se može objasniti preko više mehanizama. Kao visoko reaktivni nukleofilni agens koji reaguje sa mnogim biološkim molekulima (piridoksal fosfat, piruvat, glukoza, malonil dialdehid i drugi), AG, prvenstveno inhibiše citokine i endotoksin inducibilnu izoformu NOS naspram konstitutivnih izoformi. Molekularni mehanizam inhibicije iNOS od strane AG nije u potpunosti razjašnjen (Parthasarathy i sar., 2014; Radi, 2004). Kada je proizvodnja azot oksida smanjena aplikovanjem AG, izvor peroksinitrita je smanjen. Manje količine peroksinitrita podrazumevaju i manje oksidativnih oštećenja lipida i proteina, dok je istovremeno antioksidativni sistem pošteđen (Radi, 2004; Reinartz i sar., 2008). Sličnosti u hemijskoj strukturi između AG i L-arginina, na koju su ukazali Corbett i sar. (1992) sugerišu da AG možda deluje kao analog supstrata. Međutim, prilično selektivna inhibicija inducibilne NO sintaze favorizuje direktnu interakciju između AG i enzima.

Zaštitni efekat AG može poticati i od direktnih antioksidantskih efekata AG. Postoje brojna istraživanja koja ukazuju da AG ima i direktni antioksidativni potencijal kao snažan sakupljač RVK i RVA, a takođe sprečava i njihovo formiranje. Takođe, AG sprečava nastanak lipidne peroksidacije i deplecije ćelijske antioksidativne aktivnosti (Ara i sar., 2006; Di Paola i sar., 2004; Abd El-Gawad i sar., 2004). Aminogvanidin je delotvoran sakupljač hidroksilnih radikala (Courderot-Masuyer i sar., 1999). Polat i sar. (2006) su na modelu gentamicinske nefrotoksičnosti pokazali da AG deluje protektivno zahvaljujući njegovom dejstvu u vidu snažnog sakupljača slobodnih radikala i sprečavanja deplecije ćelijskih antioksidanata. U našem istraživanju dobijeni rezultati ukazuju da AG smanjuje cisplatinom-izazvan oksidativni stres, inhibiše lipidnu peroksidaciju i obnavlja antioksidativnu aktivnost u bubregu. Kedziora-Kornatowska i sar. (1998) su pokazali da AG može da spreči oksidativni stres u perifernim granulocitima krvi pacova sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom. Osim toga, AG sprečava oštećenje antioksidativnih sistema krvi kod insulin zavisnih dijabetičnih pacova (Stoppa i sar., 2006). Nedavna studija pokazuje da AG poboljšava antioksidativni status i slabi peroksidaciju lipida u mozgu pacova izloženih hroničnom stresu (Akpınar i sar., 2007). Druga studija pokazuje da AG može da smanji oksidativna oštećenja proteina (Brodiak i sar., 1999).

Abraham i sar. (2009a) su ispitivali efekat AG kod pacova kojima je cisplatinom izazvan hemoragijski cistitis i dobili su rezultate koji su pokazali da preventivna aplikacija AG sprečava cisplatinom indukovani nitrozativni stres, oksidativni stres i hemoragijski cistitis kod

pacova. Još dve studije su ukazale na slične rezultate (Abraham i sar., 2009b; Korkmaz i sar., 2005).

Kliničke studije su pokazale da AG ima vrlo nizak nivo toksičnosti i bezbedan je za upotrebu u dozama od 150-300 mg/24h. U studijama obavljenim na ljudima, primena AG pokazala je i neke nuspojave u smislu pojave mučnina i glavobolja (Bolton i sar., 2004). Rezultati našeg istraživanja ukazuju da AG štiti od cisplatinom-indukovanog oksidativnog stresa i samim tim smanjuje oštećenje bubrega. Prema tome, naši rezultati ukazuju na mogućnost primene AG u kliničkoj praksi kao adjuvantne terapije kod primene lekova kao što je cisplatin, što bi znatno poboljšalo terapijski indeks cisplatina. Konkretno, kosuplementacija AG i cisplatina se može primenjivati u kliničkoj praksi sa ciljem povećanja doze cisplatina kod pacijenata kojima je to neophodno i kako bi se sprečio nastanak nefrotoksičnosti.



## 7. ZAKLJUČCI

Analizom dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Primena cisplatina kod pacova u CIS grupi u jednokratnoj dozi od 8 mg/kg indukovala je nastanak akutne bubrežne insuficijencije. Povećani nivoi ureje i kreatinina, kao i smanjeni nivoi natrijuma i kalijuma u krvi pacova CIS grupe ukazali su na oštećenu funkciju tubula, naročito poremećenu reapsorpciju i sekreciju na nivou proksimalnih tubula. Rezultati biohemijske analize krvi bili su u korelaciji sa morfološkim promenama.

- Patohistološka analiza isečaka tkiva bubrega pacova koji su tretirani cisplatinom pokazala je najveća oštećenja na nivou proksimalnih tubula, glomerula i glomerularne bazalne membrane. Na proksimalnim tubulima nađena je izmenjena organizacija epitela sa različitim stepenom degeneracije, cistična dilatacija lumena, kao i veliki broj vakuola u citoplazmi tubulocita. Nađeno je prisustvo apoptoze određenih tubulocita i peritubularna infiltracija leukocita. Distalni tubuli su bili uglavnom očuvani. Glomeruli su bili uvećani, a glomerularna bazalna membrana zadebljana.

- Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da je oksidativni stres uključen u mehanizam nefrotoksičnosti izazvane cisplatinom što se ogleda kroz porast nivoa lipidne peroksidacije i oksidativne modifikacije proteina, kao i smanjenje aktivnosti antioksidativnog enzima katalaze kod pacova koji su tretirani samo cisplatinom.

- Morfometrijska analiza tubula pokazala je da je površina epitela proksimalnih tubula značajno veća, a nukleocitplazmatski odnos manji kod pacova koji su dobijali samo cisplatin u odnosu na ostale eksperimentalne grupe pacova.

- Morfometrijska analiza glomerula je pokazala da su površina, perimetar i Feretov dijametar glomerula značajno veći kod pacova koji su dobijali cisplatin što potvrđuje i patohistološki nalaz. Celularnost glomerula u istoj grupi pacova bila je značajno smanjena što je ukazalo na nastanak apoptoze.

- Debljina glomerularne bazalne membrane bila je značajno veća kod pacova tretiranih samo cisplatinom. Ovakvo zadebljanje glomerularne bazalne membrane objašnjava smanjenje glomerularne filtracije i koeficijenta ultrafiltracije kod akutne bubrežne insuficijencije izazvane cisplatinom.

- Primena kvercetina i aminogvanidina je značajno ublažila funkcionalne i morfološke promene izazvane cisplatinom. Nivoi kreatinina i ureje u serumu su bili značajno smanjeni,

dok su koncentracije natrijuma i kalijuma bile značajno veće kod grupa životinja koje su istovremeno tretirane kvercetinom i cisplatinom, kao i kod životinja tretiranih aminogvanidinom i cisplatinom u odnosu na pacove koji su tretirani samo cisplatinom.

- Strukturne promene i oštećenja nastala u tkivu bubrega primenom cisplatina, značajno su ublažena i gotovo potpuno redukovana kod pacova koji su istovremeno tretirani cisplatinom i kvercetinom (CISQ), kao i kod grupe pacova istovremeno tretiranih cisplatinom i AG (CISAG), što je potvrdila i naša patohistološka analiza isečaka tkiva bubrega kod navedenih grupa životinja.

- Takođe, možemo zaključiti da kvercetin i aminogvanidin imaju antioksidativno dejstvo i na taj način deluju protektivno, na šta ukazuju smanjene vrednosti AOPP-a i MDA, kao i povećane vrednosti katalaze u CISQ i CISAG grupama pacova u odnosu na vrednosti ovih parametara nađene kod CIS grupe pacova.

- Morfometrijska analiza tubula i glomerula je takođe ukazala na protektivno dejstvo kvercetina i aminogvanidina. Površina epitela proksimalnih tubula bila je značajno manja, a nukleocitoplazmatski odnos veći kod pacova iz CISQ i CISAG grupe u odnosu na CIS grupu pacova. Površina, perimetar i Feretov dijametar glomerula bili su značajno smanjeni kod pacova koji su istovremeno dobijali kvercetin i cisplatin, tj. aminogvanidin i cisplatin u poređenju sa istim parametrima izmerenim kod životinja koje su primale samo cisplatin. Celularnost glomerula u CISQ i CISAG grupi pacova bila je značajno veća u odnosu na CIS grupu životinja.

- Debljina glomerularne bazalne membrane bila je značajno manja kod pacova koji su pored cisplatina dobijali i kvercetin, kao i kod pacova koji su istovremeno tretirani cisplatinom i aminogvanidinom u odnosu na pacove koji su dobijali samo cisplatin.

- Iz svega napred navedenog, na kraju možemo zaključiti da primena kvercetina i aminogvanidina kod pacova sa akutnom bubrežnom slabošću izazvanom cisplatinom deluje protektivno i umanjuje stepen morfoloških i funkcionalnih promena u bubregu nastalih delovanjem cisplatina.

## 8. LITERATURA

Abd El-Gawad HM, El-Sawalhi MM. Nitric oxide and oxidative stress in brain and heart of normal rats treated with doxorubicin: role of aminoguanidine. *J Biochem Mol Toxicol.* 2004;18(2):69-77.

Abdel-Raheem IT, Abdel-Ghany AA, Mohamed GA. Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(1):61-67.

Abraham M, Gola J, Cometto-Muniz E, Cain W. The solvation properties of nitric oxide. *J Chem Soc Perkin Trans.* 2000;2:2067-2070.

Abraham P, Rabi S, Kulothungan P. Aminoguanidine, selective nitric oxide synthase inhibitor, ameliorates cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis by inhibiting protein nitration and PARS activation. *Urology.* 2009a;73(6):1402-1406.

Abraham P, Rabi S, Selvakumar D. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress and bladder injury in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rat. *Cell Biochem Funct.* 2009b;27(1):56-62.

Aggarwal SK. Calcium modulation of toxicities due to cisplatin. *Met Based Drugs.* 1998;5(2):77-81.

Ahmed N. Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Practice.* 2005; 67(1):3-21.

Aiala GF, Oliveira AM, Costa FO, Fialho DL, Cunha AS Jr, Oliveira PA. Effect of local application of aminoguanidine on the biomechanical retention of implants in rats with induced diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013; 28(5):1272-1277.

Akpınar D, Yargıoğlu P, Derin N, Aslan M, Agar A. Effect of aminoguanidine on visual evoked potentials (VEPs), antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. *Brain Res.* 2007;1186:87-94.

Ali BH, Al-Moundhri M, Tageldin M, Al Hussein IS, Mansour MA, Nemmar A, Tanira MO. Ontogenic aspects of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(11):3355-3359.

Ara C, Karabulut AB, Kirimlioglu H, Yilmaz M, Kirimliglu V, Yilmaz S. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress in an experimental peritoneal adhesion model in rats. *Cell Biochem Funct.* 2006;24 (5):443-448.

Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003;23(5):460-464.

Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Price PM, Safirstein RL. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287(3):F543-549.

Arany I, Kaushal GP, Portilla D, Megyesi J, Price PM, Safirstein RL. Cellular mechanisms of nephrotoxicity. In: *Clinical Nephrotoxins*; Broe MED, Porter GA, Bennett WM, Deray G. Eds. Springer: New York, NY, USA, 2008; pp.155-170.

Arjumand W, Seth A, Sultana S. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NF $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  and caspase-3 expression in Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(9):2013-2021.

Arts MJTJ, Dallinga JS, Voss HP, Haenen GRMM, Bast A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* 2004;88(4):567-570.

Ashrafi F, Nematbakhsh M, Safari T, Talebi A, Nasri H, Khazaei M, Baradaran-Mahdavi MM, Jafarishah A, Olia B, Pirhaji O, Hashemi-Nia SJ, Eshraghi F, Pezeshki Z, Mortazavi M. A combination of vitamin C and losartan for cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Iran J Kidney Dis.* 2012;6(5):361-365.

Avila MA, Velasco JA, Cansado J, and Notario V. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res.* 1994;54(9):2424-2428.

Babu E, Gopalakrishnan VK, Sriganth IN, Gopalakrishnan R, Sakthisekaran D. Cisplatin induced nephrotoxicity and the modulating effect of glutathione ester. *Mol Cell Biochem.* 1995;144(1):7-11.

Bae EH, Lee J, Ma SK, Kim IJ, Frøkiaer J, Nielsen S, Kim SY, Kim SW. alpha-Lipoic acid prevents cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(9):2692-2700.

- Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med.* 2003;142(3):178-186.
- Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 1998a;54(5):1562-1569.
- Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 1998b;53(2):394-401.
- Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev.* 1999;31(4):971-997.
- Bassett EA, Wang W, Rastinejad F, El-Deiry WS. Structural and functional basis for therapeutic modulation of p53 signaling. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6376-6386.
- Behling EB, Sendao MC, Francescato HD, Antunes LM, Costa RS, Bianchi Mde L. Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacol Rep.* 2006;58(4):526-532.
- Blasiak J. DNA-damaging effect of cadmium and protective action of quercetin. *Pol J Environ Stud.* 2001;10(6):437-442.
- Blasiak J, Trzeciak A, Gasiorowska A, Drzewoski J, Malecka-Panas E. Vitamin C and quercetin modulate DNA-damaging effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *Plant Foods Hum Nutr.* 2002a;57(1):53-61.
- Blasiak J, Arabski M, Pertynski T, Malecka-Panas E, Wozniak K, Drzewoski J. DNA damage in human colonic mucosa cells evoked by nickel and protective action of quercetin - involvement of free radicals? *Cell Biol Toxicol.* 2002b;18(4):279-288.
- Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, Adler SG, Appel GB, Cartwright K, Foiles PG, Freedman BI, Raskin P, Ratner RE, Spinowitz BS, Whittier FC, Wuerth JP; ACTION I Investigator Group. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2004;24(1):32-40.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990;186:343-355.

Brian JE Jr, Heistad DD, Faraci FM. Mechanisms of endotoxin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Am J Physiol.* 1995;269(3 Pt 2):H783-H788.

Brodiak IV, Sybirna NO. Effect of aminoguanidine on oxidative modification of proteins in experimental diabetes mellitus in rats. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2006;78(5):114-119.

Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* 1998;330(Pt 3):1173-1178.

Bucki R, Pastore JJ, Giraud F, Sulpice JC, Janmey PA. Flavonoid inhibition of platelet proagulant activity and phosphoinositide synthesis. *J Thromb Haemost.* 2003;1(8):1820-1828.

Burcham PC, Kaminskas LM, Fontaine FR, Petersen DR, Pyke SM. Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. *Toxicology.* 2002;181-182:229-236.

Bureau G, Longpré F, Martinoli MG. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res.* 2008;86(2):403-410.

Burger H, Nooter K, Boersma AW, Kortland CJ, Stoter G. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int J Cancer.* 1997;73(4):592-599.

Caltagirone S, Ranelletti FO, Rinelli A, Maggiano N, Colasante A, Musiani P, Aiello FB, Piantelli M. Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(1):51-59.

Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007;7(1):3-18.

Cetin R, Devrim E, Kiliçoglu B, Avcı A, Candir O, Durak I. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. *J Appl Toxicol.* 2006;26(1):42-46.

Cevik O, Cadirci S, Sener TE, Tinay I, Akbal C, Tavukcu HH, Cetinel S, Kiran D, Sener G. Quercetin treatment against ischemia/reperfusion injury in rat corpus cavernosum tissue: a role on apoptosis and oxidative stress. *Free Radic Res.* 2013;47(9):683-691.

Chang B, Nishikawa M, Sato E, Utsumi K, Inoue M. L-Carnitine inhibits cisplatin-induced injury of the kidney and small intestine. *Arch Biochem Biophys.* 2002;405(1):55-64.

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 1993;13(6A):2165-2170.

Chirino YI, Trujillo J, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Cruz C, Bobadilla NA, Pedraza-Chaverri J. Selective iNOS inhibition reduces renal damage induced by cisplatin. *Toxicol Lett.* 2008;176(1):48-57.

Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol.* 2009;61(3):223-242.

Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol.* 2005;167(6):1477-1484.

Ciarimboli G, Deuster D, Knief A, Sperling M, Holtkamp M, Edemir B, Pavenstadt H, Lanvers-Kaminsky C, am Zehnhoff-Dinnesen A, Schinkel AH, Koepsell H, Jurgens H, Schlatter E. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. *Am J Pathol.* 2010;176(3):1169-1180.

Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr.* 1998;128(3):593-597.

Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR Jr, Williamson JR, McDaniel ML. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes.* 1992;41(4):552-556.

Cornelison TL, Reed E. Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin. *Gynecol Oncol.* 1993;50(2):147-158.

Courderot-Masuyer C, Dalloz F, Maupoil V, Rochette L. Antioxidant properties of aminoguanidine. *Fundam Clin Pharmacol*. 1999;13(5):535-540.

Cross AH, Misko TP, Lin RF, Hickey WF, Trotter JL, Tilton RG. Aminoguanidine an inhibitor of inducible nitric oxide synthase ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2684-2690.

Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr*. 2007;39(1):43-50.

Cummings BS, Schnellmann RG. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302(1):8-17.

Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. Role of an endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(3):921-928.

Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;26(5):343-356.

Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(12):2683-2690.

Daugaard G, Abildgaard U. Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;25(1):1-9.

Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett*. 2000;468(2-3):166-170.

de Jongh FE, Verweij J, Loos WJ, de Wit R, de Jonge MJ, Planting AS, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Body-surface area-based dosing does not increase accuracy of predicting cisplatin exposure. *J Clin Oncol*. 2001;19(17):3733-3739.

de Jongh FE, van Veen RN, Veltman SJ, de Wit R, van der Burg ME, van den Bent MJ, Planting AS, Graveland WJ, Stoter G, Verweij J. Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: Analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Br J Cancer*.



2003;88(8):1199-1206.

Delbancut A, Lagroye I, Cambar J. Renal cytotoxicity of cisplatin in cultured glomerular mesangial and proximal and distal tubular cells. *Toxicol In Vitro*.1994;8(4):517-519.

Deng J, Kohda Y, Chiao H, Wang Y, Hu X, Hewitt SM, Miyaji T, McLeroy P, Nibhanupudy B, Li S, Star RA. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int*. 2001;60(6):2118-2128.

de Waal Malefyt R. IL-10. In: *Cytokine Reference*. Oppenheim JJ, Feldmann M, Eds. Academic Press: San Diego, CA, USA, 2001;Volume 1,pp.165-185.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signaling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279-3290.

Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, Dattola F, Rotondo F, Britti D, De Majo M, Genovese T, Cuzzocrea S. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. *J Dent Res*. 2004;83(4):343-348.

Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr*. 1998;80(Suppl 1):S77-S112.

dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol*. 2012;86(8):1233-1250.

dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, Schor N. Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int*. 1991;40(4):742-747.

Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2001;133(1):117-124.

Dursun B, He Z, Somerset H, Oh DJ, Faubel S, Edelstein CL. Caspases and calpain are independent mediators of cisplatin-induced endothelial cell necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291(3):F578-F587.

- Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr.* 2007;137(11): 2405-2411.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2002;277(41):38079-38086.
- Endo T, Kimura O, Sakata M. Carrier-mediated uptake of cisplatin by the OK renal epithelial cell line. *Toxicology.* 2000;146(2-3):187-195.
- E Nico ET, de Oliveira PR, de Souza LP, Pereira FD, Delbin MA, Zanesco A, Camargo-Mathias MI. The action of aminoguanidine on the liver of trained diabetic rats. *J Diabetes Metab Disord.* 2013;12:40.
- Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;56(8):545-553.
- Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann NY Acad Sci.* 1999;884:19-40.
- Fan TP, Jaggar R, Bicknell R. Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16(2):57-66.
- Faubel S, Ljubanovic D, Reznikov L, Somerset H, Dinarello CA, Edelstein CL. Caspase-1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney Int.* 2004;66(6):2202-2213.
- Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, Ljubanovic D, Hoke TS, Somerset H, Oh DJ, Lu L, Klein CL, Dinarello CA, Edelstein CL. Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;322(1):8-15.
- Feligioni M, Nisticò R. SUMO: a (oxidative) stressed protein. *Neuromolecular Med.* 2013;15(4):707-719.
- Fent K, Mayer E, Zbinden G. Nephrotoxicity screening in rats: a validation study. *Arch Toxicol.* 1988;61(5):349-358.

Ferrandiz ML, Nair AG, Alcaraz MJ. Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs. *Pharmazie*. 1990;45(3):206-208.

Filipski KK, Loos WJ, Verweij J, Sparreboom A. Interaction of Cisplatin with the human organic cation transporter 2. *Clin Cancer Res*. 2008;14(12):3875-3880.

Filipski KK, Mathijssen RH, Mikkelsen TS, Schinkel AH, Sparreboom A. Contribution of organic cation transporter 2 (OCT2) to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;86(4):396-402.

Firouzjaei MA, Jafari MR, Eskandari M, Anarkoli IJ, Alipour M. Aminoguanidine changes hippocampal expression of apoptosis-related genes, improves passive avoidance learning and memory in streptozotocin- induced diabetic rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2014;34(3):343-350.

Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. 1995;33(12):1061-1080.

Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wähälä K, Montesano R, Schweigerer L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res*. 1997;57(14):2916-2921.

Francescato HD, Costa RS, Junior FB, Coimbra TM. Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(8):2138-2148.

Francescato HD, Costa RS, Silva CG, Coimbra TM. Treatment with a p38 MAPK inhibitor attenuates cisplatin nephrotoxicity starting after the beginning of renal damage. *Life Sci*. 2009;84(17-18):590-597.

Fukuoka K, Takeda M, Kobayashi M, Osaki T, Shirato I, Soejima A, Nagasawa T, Endou H. Distinct interleukin-1beta-converting enzyme family proteases mediate cisplatin- and staurosporine-induced apoptosis of mouse proximal tubule cells. *Life Sci*. 1998;62(12):1125-1138.

Gaston BM, Carver J, Doctor A, Palmer LA. S-Nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv*. 2003;3(5):253-263.

Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr.*2000;130(11):2765-2771.

Geraets L, Moonen HJ, Brauers K, Wouters EF, Bast A, Hageman GJ. Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *J Nutr.* 2007;137(10):2190-2195.

Ghosh A, Sarkar S, Mandal AK, Das N. Neuroprotective role of nanoencapsulated quercetin in combating ischemia-reperfusion induced neuronal damage in young and aged rats. *PLoS One.* 2013;8(4):e57735.

Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes.* 1998;47(7):1114-1120.

Goldstein RS, Mayor GH. Minireview. The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci.* 1983;32(7):685-690.

Goren MP. Cisplatin nephrotoxicity affects magnesium and calcium metabolism. *Med Pediatr Oncol.* 2003;41(3):186-189.

Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision reference range. *Clin Chim Acta.* 1991;196:143-152.

Griffiths LA. Mammalian metabolism of flavonoids. In: Harborne JB, Mabry T. (Eds.). *The Flavonoids: Advances in Research.* Chapman & Hall, London, 1982; pp. 681-718.

Gulati N, Laudet B, Zohrabian VM, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway. *Anticancer Res.* 2006;26(2A):1177-1181.

Gullans SR, Mandel LJ. Coupling of energy transport in proximal and distal nephron. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 3rd ed.; Seldin DW, Giebisch G. (Eds.). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2000; Volume 1, pp. 445-482.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41(12 Pt 2):1819-1828.

Hadjzadeh MA, Keshavarzi Z, Tabatabaee Yazdi SA, Ghasem Shirazi M, Rajaei Z, Khajavi Rad A. Effect of alcoholic extract of *Nigella sativa* on cisplatin-induced toxicity in rat. *Iran J Kidney Dis.* 2012;6(2):99-104.

Haenen, GR, Bast A. Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. *Methods Enzymol.* 1999;301:490-503.

Halliwell B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis.* 1993;23(Suppl 1):118-126.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312-322.

Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(24):11555-11558.

Hanigan MH, Gallagher BC, Taylor PT Jr, Large MK. Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase activity by acivicin in vivo protects the kidney from cisplatin-induced toxicity. *Cancer Res.* 1994;54:5925-5929.

Hanigan MH, Lykissa ED, Townsend DM, Ou C, Barrios R, Lieberman MW. Gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice are resistant to the nephrotoxicity of cisplatin. *Am J Pathol.* 2001;159:1889-1894.

Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther.* 2003;1:47-61.

Hartmann JT, Kollmannsberger C, Kanz L, Bokemeyer C. Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int J Cancer.* 1999;83(6):866-869.

Hartmann JT, Fels LM, Knop S, Stolt H, Kanz L, Bokemeyer C. A randomized trial comparing the nephrotoxicity of cisplatin/ifosfamide-based combination chemotherapy with or without amifostine in patients with solid tumors. *Invest New Drugs.* 2000;18(3):281-289.

Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother.* 2003;4(6):889-901.

Hasan K, Heesen BJ, Corbett JA, McDaniel ML, Chang K, Allison W, Wolffenbuttel BH, Williamson JR, Tilton RG. Inhibition of nitric oxide formation by guanidines. *Eur J Pharmacol.* 1993;249(1):101-106.

Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro.* 2001;15(1):3-6.

Hirama M, Isonishi S, Yasuda M, Ishikawa H. Characterization of mitochondria in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2006;16(5):997-1002.

Hollman PC, vd Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH, Katan MB. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(5):703-707.

Hollman PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother.* 1997a;51(8):305-310.

Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* 1997b;418(1-2):152-156.

Hollman PC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol.* 1999;37(9-10):937-942.

Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R, Howell SB. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 2004;66(4):817-823.

Hosokawa N, Hosokawa Y, Sakai T, Yoshida M, Marui N, Nishino H, Kawai K, Aoike A. Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cyclereleted 17-kDa protein, in human colon cancer cells. *Int J Cancer.* 1990;45(6):1119-1124.

Huang Q, Dunn RT 2nd, Jayadev S, DiSorbo O, Pack FD, Farr SB, Stoll RE, Blanchard KT. Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci.* 2001;63(2):196-207.

Ihm SH, Yoo HJ, Park SW, Ihm J. Effect of aminoguanidine on lipid peroxidation in streptozotocininduced diabetic rats. *Metabolism.* 1999;48(9):1141-1145.

- Iio M, Ono Y, Kai S, Fukumoto M. Effects of flavonoids on xanthine oxidation as well as on cytochrome *c* reduction by milk xanthine oxidase. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1986;32(6):635-642.
- Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter *Ctr1* in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(22):14298-14302.
- Isnard-Bagnis CDG. Anticancer drugs. In: De Broe ME PGA, Bennett WM, Verpooten GA, (EDS.). *Clinical Nephrotoxins* (ed 2nd). Kluwer Academic; 2003; pp. 353-372.
- Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol*. 2001;3(2):193-197.
- Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts. *Chem Rev*. 1999;99(9):2467-2498.
- Jiang M, Yi X, Hsu S, Wang CY, Dong Z. Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: Dependence on p53 transcriptional activity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(6):F1140-F1147.
- Jiang M, Wei Q, Wang J, Du Q, Yu J, Zhang L, Dong Z. Regulation of PUMA- $\alpha$  by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *Oncogene*. 2006;25(29):4056-4066.
- Jiang M, Wei Q, Pabla N, Dong G, Wang CY, Yang T, Smith SB, Dong Z. Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(9):1499-1510.
- Jiang M, Dong Z. Regulation and pathological role of p53 in cisplatin nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;327(2):300-307.
- Jiang M, Wang CY, Huang S, Yang T, Dong Z. Cisplatin-induced apoptosis in p53-deficient renal cells via the intrinsic mitochondrial pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(5):F983-F993.

Jianmongkol S, Vuletich JL, Bender AT, Demady DR, Osawa Y. Aminoguanidine-mediated inactivation and alteration of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2000;275(18):13370-13376.

Jo SK, Cho WY, Sung SA, Kim HK, Won NH. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int.* 2005;67:458-466.

Ju SM, Pae HO, Kim WS, Kang DG, Lee HS, Jeon BH. Role of reactive oxygen species in p53 activation during cisplatin-induced apoptosis of rat mesangial cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(8):1135-11341.

Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H, Turkeli M. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxid Med Cell Longev.* 2011;2011:981793.

Kaushal G, Kaushal V, Hong X, Shah S. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 2001;60(5):1726-1736.

Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci.* 2006;100(1):65-72.

Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Błaszczyk J, Pawlak W. Effect of aminoguanidine on the generation of superoxide anion and nitric oxide by peripheral blood granulocytes of rats with streptozotocin induced diabetes. *Clin Chim Acta.* 1998;278(1):45-53.

Kelly KJ, Meehan SM, Colvin RB, Williams WW, Bonventre JV. Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. *Kidney Int.* 1999;56(39):922-931.

Kelly TC, Whitworth CA, Husain K, Rybak LP. Aminoguanidine reduces cisplatin ototoxicity. *Hear Res.* 2003;186(1-2):10-16.

Khan AH, Sattar MA, Abdullah NA, Johns EJ. Effect of calcium channel blockade on adrenergically induced renal vasoconstriction in rat models of renal impairment. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(5-6):501-508.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol.* 2006a;208(3):319-326.



Kim YH, Kim YW, Oh YJ, Back NI, Chung SA, Chung HG, Jeong TS, Choi MS, Lee KT. Protective effect of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK 1 cells and rats. *Biol Pharm Bull.* 2006b;29(12):2436-2441.

Kim YK, Kim HJ, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim JM. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *J Appl Toxicol.* 2005;25(5):374-382.

Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. Effects of naturally-occurring flavonoids and bioflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998;58(1):17-24.

Kintzel PE. Anticancer drug-induced kidney disorders. *Drug Saf.* 2001;24(1):19-38.

Kishore BK, Krane CM, Di Iulio D, Menon AG, Cacini W. Expression of renal aquaporins 1, 2, and 3 in a rat model of cisplatin-induced polyuria. *Kidney Int.* 2000;58(2):701-711.

Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Hellövaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol.* 1997;146(3):223-230.

Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(3):541-553.

Kociba RJ, Sleight SD. Acute toxicologic and pathologic effects of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) in the male rat. *Cancer Chemother Rep.* 1971;55(1):1-8.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30(6):620-650.

Kohn S, Fradis M, Ben-David J, Zidan J, Robinson E. Nephrotoxicity of combined treatment with cisplatin and gentamicin in the guinea pig: glomerular injury findings. *Ultrastruct Pathol.* 2002;26(6):371-382.

Kolb R, Ghazi M, Barfuss D. Inhibition of basolateral transport and cellular accumulation of cDDP and N-acetyl-L-cysteine-cDDP by TEA and PAH in the renal proximal tubule. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;51(2):132-138.

Kone BC. Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health. *Semin Nephrol.* 2004;24(4):299-315.

Korkmaz A, Oter S, Sadir S, Coskun O, Topal T, Ozler M, Bilgic H. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *J Urol.* 2005;173(5):1793-1796.

Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I–IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280(2):638-649.

Kuhad A, Pilkhwal S, Sharma S, Tirkey N, Chopra K. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J Agric Food Chem.* 2007;55(25):10150-10155.

Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12(12):2478-2480.

Lajer H, Kristensen M, Hansen HH, Christensen S, Jonassen T, Daugaard G. Magnesium and potassium homeostasis during cisplatin treatment. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55(3):231-236.

Lapolla A, Traldi P, Fedele D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem.* 2005; 38(2):103-115.

Larocca LM, Piantelli M, Leone G, Sica S, Teofili L, Panici PB, Scambia G, Mancuso S, Capelli A, Ranelletti FO. Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukaemias: growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids. *Br J Haematol.* 1990;75(4):489-495.

Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Houlst JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol.* 1991;42(9):1673-1681.

- Lebedeva MA, Eaton JS, Shadel GS. Loss of p53 causes mitochondrial DNA depletion and altered mitochondrial reactive oxygen species homeostasis. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2009;1787(5):328-334.
- Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer.* 1998;34(10):1522-1534.
- Lee ES, Lee HE, Shin JY, Yoon S, Moon JO. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2003;55(8):1169-1174.
- Lee RH, Song JM, Park MY, Kang SK, Kim YK, Jung JS. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(8):1013-1023.
- Li S, Wu P, Yarlagadda P, Vadjunec NM, Proia AD, Harris RA, Portilla D. PPAR alpha ligand protects during cisplatin-induced acute renal failure by preventing inhibition of renal FAO and PDC activity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004a;286(3):F572-F580.
- Li S, Basnakian A, Bhatt R, Megyesi J, Gokden N, Shah SV, Portilla D. PPAR-alpha ligand ameliorates acute renal failure by reducing cisplatin-induced increased expression of renal endonuclease G. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004b;287(5):F990-F998.
- Liang M, Knox FG. Production and functional roles of nitric oxide in the proximal tubule. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;278(5):R1117-R1124.
- Lieber E, Smith GB. The chemistry of aminoguanidine and related substances. *Chem Rev.* 1939;25(2):213-271.
- 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(4 Pt 2):F700-F708.
- Liu CM, Ma JQ, Sun YZ. Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environ Toxicol Phar.* 2010;30(3):264-271.
- Liu H, Baliga R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. *Kidney Int.* 2003;63(5):1687-1696.

- Liu H, Baliga R. Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(7):1985-1992.
- Locksley R, Killeen N, Lenardo M. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
- Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity. An integrative point of view. *Kidney Int*. 2011;79(1):33-45.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 1994;120(3):227-237.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.
- Lu LH, Oh DJ, Dursun B, He Z, Hoke TS, Faubel S, Edelstein CL. Increased macrophage infiltration and fractalkine expression in cisplatin-induced acute renal failure in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324(1):111-117.
- Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, Schwerdt G, Oberleithner H. Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int*. 2004;66(1):196-202.
- McCauley J. The nephrotoxicity of FK 506 as compared to cyclosporine. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993;2(4):662-669.
- McGuinness JE, Proctor PH, Demopoulos HB, Hokanson JA, Kirkpatrick DS. Amelioration of cis-platinum nephrotoxicity by orgotein (superoxide dismutase). *Physiol Chem Phys*. 1978;10(3):267-277.
- MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airway diseases. *Eur J Pharmacol*. 2001;429(1-3):195-207.
- Madias NE, Harrington JT. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med*. 1978;65(2):307-314.
- Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*. 2006;10(1):208.

Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9100-9106.

Martinez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(3):669-702.

Martinez-Salgado C, López-Hernández FJ, López-Novoa JM. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;223(1):86-98.

Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med*. 1998;131(6):518-526.

McDuffie JE, Sablad M, Ma J, Snook S. Urinary parameters predictive of cisplatin-induced acute renal injury in dogs. *Cytokine*. 2010;52(3):156-162.

Megyesi J, Safirstein RL, Price PM. Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest*. 1998;101(4):777-782.

Meijer F, Ruijter JM, Van Delft JL, Van Haeringen NJ. Nitric oxide induces vascular permeability changes in the guinea pig conjunctiva. *Eur J Pharmacol*. 1995;284(1-2):61-67.

Mene P, Simonson MS, Dunn MJ. Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev*. 1989;69(4):1347-1424.

Meyer KB, Madias NE. Cisplatin nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab*. 1994;20(4):201-213.

Middleton EJ, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB. (Ed.). *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London, 1993, pp. 619-652.

Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*. 1998;439:175-182.

Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. 2010;2(11):2490-2518.

Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol.* 1993;233(1):119-125.

Mitosek-Szewczyk K, Gordon-Krajcer W, Walendzik P, Stelmasiak Z. Free radical peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis after glucocorticoid therapy. *Folia Neuropathol.* 2010; 48 (2):116-122.

Molitoris BA, Dagher PC, Sandoval RM, Campos SB, Ashush H, Fridman E, Brafman A, Faerman A, Atkinson SJ, Thompson JD, Kalinski H, Skaliter R, Erlich S, Feinstein E. siRNA targeted to p53 attenuates ischemic and cisplatin-induced acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(8):1754-1764.

Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(6):2166-2170.

Morales AI, Vicente-Sanchez C, Sandoval JM, Egido J, Mayoral P, Arévalo MA, Fernández-Tagarro M, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol.* 2006a;44(12):2092-2100.

Morales AI, Vicente-Sanchez C, Jerkic M, Santiago JM, Sánchez-González PD, Pérez-Barriocanal F, López-Novoa JM. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006b;210(1-2):128-135.

Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids, catechin, quercetin and disomitin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(1):13-19.

Mukhopadhyay P, Horváth B, Zsengellér Z, Zielonka J, Tanchian G, Holovac E, Kechrid M, Patel V, Stillman IE, Parikh SM, Joseph J, Kalyanaraman B, Pacher P. Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(2):497-506.

- Mustafa A, Gado AM, Al-Shabanah OA, Al-Bekairi AM. Protective effect of aminoguanidine against paraquat-induced oxidative stress in the lung of mice. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2002;132(3):391-397.
- Muthukumaran S, Sudheer AR, Menon VP, Nalini N. Protective effect of quercetin on nicotine-induced prooxidant and antioxidant imbalance and DNA damage in Wistar rats. *Toxicology*. 2008a;243(1-2):207-215.
- Muthukumaran S, Sudheer AR, Nalini N, Menon VP. Effect of quercetin on nicotine-induced biochemical changes and DNA damage in rat peripheral blood lymphocytes. *Redox Rep*. 2008b;13(5):217-224.
- Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL, Aalinkeel R, Nair H, Schwartz SA, Kandaswami C. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(3):319-328.
- Naughton CA. Drug-induced nephrotoxicity. *Am Fam Physician*. 2008;78(6):743-750.
- Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*. 2003;42(1):29-42.
- Nishikawa M, Nagatomi H, Chang BJ, Sato E, Inoue M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin. *Arch Biochem Biophys*. 2001;387(1):78-84.
- Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol Med*. 2001;31(11):1287-1312.
- Nowak G. Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na<sup>+</sup> transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem*. 2002;277(45):43377-43388.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-358.

Olas B, Nowak P, Wachowicz B. Resveratrol protects against peroxynitrite-induced thiol oxidation in blood platelets. *Cell Mol Biol Lett.* 2004;9(4A):577-587.

Olivero OA, Chang PK, Lopez-Larrazza DM, Semino-Mora MC, Poirier MC. Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutat Res.* 1997;391(1-2):79-86.

Orsolich N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol.* 2004;94(2-3):307-315.

Ozen S, Akyol O, Iraz M, Söğüt S, Ozuğurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol.* 2004;24(1):27-35.

Ozturk A, Fırat C, Parlakpınar H, Bay-Karabulut A, Kirimlioglu H, Gurlek A. Beneficial effects of aminoguanidine on skin flap survival in diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:721256.

Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene.* 2007;26(22):3203-3213.

Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 2008a;73(9):994-1007.

Pabla N, Huang S, Mi QS, Daniel R, Dong Z. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2008b;283(10):6572-6583.

Pabla N, Murphy RF, Liu K, Dong Z. The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(3):F505-F511.

Pacifici GM. Inhibition of human liver and duodenum sulfotransferases by drugs and dietary chemicals: a review of the literature. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2004;42(9):488-495.

Palipoch S, Punsawad C. Biochemical and histological study of rat liver and kidney injury induced by Cisplatin. *J Toxicol Pathol.* 2013;26(3):293-299.



Pandey KB, Rizvi SI. Protective effect of resveratrol on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to in vitro oxidative insult. *Phytother Res.* 2010;24(Suppl 1):S11-S14.

Paper DH. Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta Med.* 1998;64(8):686-695.

Park MS, De Leon M, Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(4):858-865.

Parlakpınar H, Koc M, Polat A, Vardi N, Ozer MK, Turkoz Y, Acet A. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by amikacin in rats. *Urol Res.* 2004;32(4):278-282.

Parthasarathy A, Gopi V, Devi KMS, Balaji N, Vellaichamy E. Aminoguanidine inhibits ventricular fibrosis and remodeling process in isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts by suppressing ROS and MMPs. *Life Sci.* 2014;118(1):15-26.

Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010;23(2):75-93.

Pavlovic D. Biološka oksidacija. U: Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G, urednici. *Biohemija.* Beograd: Savremena administracija; 2006. pp:678-705.

Peet GW, Li J, Ikappa B kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *J Biol Chem.* 1999;274(46):32655-32661.

Peres LA, da Cunha AD Jr. Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. *J Bras Nefrol.* 2013;35(4):332-340.

Perez Gutierrez RM, Flores Cotera LB, Gonzalez AM. Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves in vitro and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. *Molecules.* 2012;17(10):11897-11919.

Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res.* 2006a;40(10):1054-1065.

Perez-Vizcaino F, Bishop-Bailley D, Lodi F, Duarte J, Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Mitchell JA, Warner TD. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK

activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006b;346(3):919-925.

Peyrou M, Hanna PE, Cribb AE. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. *Toxicol Sci.* 2007;99(1):346-353.

Pfeilschifter J. Cross talk between transmembrane signaling system: a prerequisite for a delicate regulation of glomerular haemodynamics by mesangial cells. *Eur J Clin Invest.* 1989;19(4):347-361.

Plato CF, Shesely EG, Garvin JL. Enos mediates L-arginine-induced inhibition of thick ascending limb chloride flux. *Hypertension.* 2000;35(1 Pt 2):319-323.

Polat A, Parlakpınar H, Tasdemir S. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta Histochem.* 2006;108(5):365-371.

Portilla D, Dai G, McClure T, Bates L, Kurten R, Megyesi J, Price P, Li S. Alterations of PPARalpha and its coactivator PGC-1 in cisplatin-induced acute renal failure. *Kidney Int.* 2002;62(4):1208-1218.

Qian W, Nishikawa M, Haque AM, Hirose M, Mashimo M, Sato E, Inoue M. Mitochondrial density determines the cellular sensitivity to cisplatin-induced cell death. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(6):C1466-C1475.

Quiros Y, Ferreira L, Sancho-Martinez SM, González-Buitrago JM, López-Novoa JM, Lopez-Hernandez FJ. Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein. *Kidney Int.* 2010;78(10):1006-1015.

Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(11):1451-1464.

Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(12):4003-4008.

Rahman I. Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(5-6):935-942.

Ramesh G, Reeves WB. TNF- $\alpha$  mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest.* 2002;110(6):835-842.

Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(4):F610-F618.

Ramesh G, Reeves WB. Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Kidney Int.* 2004;65(2):490-498.

Ramesh G, Reeves WB. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(1):F166-F174.

Reece PA, Stafford I, Russell J, Khan M, Gill PG. Creatinine clearance as a predictor of ultrafilterable platinum disposition in cancer patients treated with cisplatin: Relationship between peak ultrafilterable platinum plasma levels and nephrotoxicity. *J Clin Oncol.* 1987;5(2):304-309.

Reinartz M, Ding Z, Flögel U, Gödecke A, Schrader J. Nitrosative stress leads to protein glutathiolation, increased s-nitrosation, and up-regulation of peroxiredoxins in the heart. *J Biol Chem.* 2008;283(25):17440-17449.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(7):933-956.

Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to disease. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1271(1):67-74.

Rimbach G, Hohler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr.* 1999;52(3):203-222.

Rjiba-Touati K, Ayed-Boussema I, Bouaziz C, Belarbia A, Azzabi A, Achour A, Hassen W, Bacha H. Protective effect of erythropoietin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antigenotoxic and antiapoptotic effect. *Drug Chem Toxicol.* 2012;35(1):89-95.

Robak J, Gryglewski RJ. Bioactivity of flavonoids. *Pol J Pharmacol.* 1996;48(6):555-564.

Roczniak A, Levine DZ, Burns KD. Localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278(5):F702-F707.

Rodriguez-Barbero A, L'Azou B, Cambar J, López-Novoa JM. Potential use of isolated glomeruli and cultured mesangial cells as in vitro models to assess nephrotoxicity. *Cell Biol Toxicol.* 2000;16(3):145-153.

Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 1965;205:698-699.

Saad AA, Youssef MI, El-Shennawy LK. Cisplatin induced damage in kidney genomic DNA and nephrotoxicity in male rats: the protective effect of grape seed proanthocyanidin extract. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(7):1499-1506.

Saad SY, Najjar TA, Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(12):862-867.

Saad SY, Arafah MM, Najjar TA. Effects of mycophenolate mofetil on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;59(4):455-460.

Sadowska-Bartosz I, Adamczyk-Sowa M, Galiniak S, Mucha S, Pierzchala K, Bartosz G. Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. *Neurochem Int.* 2013;63(5):507-516.

Sadzuka Y, Shimizu Y, Takino Y, Hirota S. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat by inducers and an inhibitor of glutathione S-transferase. *Biochem Pharmacol.* 1994;48(3):453-459.

Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB. Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int.* 1984;25(5):753-758.

Safirstein R, Winston J, Goldstein M, Moel D, Dikman S, Guttenplan J. Cisplatin nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis.* 1986;8(5):356-367.

Saleh S, El-Demerdash E. Protective effects of L-arginine against cisplatin-induced renal oxidative stress and toxicity: role of nitric oxide. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;97(2):91-97.

Salvesen GS, Abrams JM. Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene.* 2004 ;23(16):2774-2784.

Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Perez-Barriocanal F, Morales AI, Lopez-Novoa JM. Quercetin reduces cisplatin nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumour activity. *Nephrol Dial Transplant*. 2011a;26(11):3484-3495.

Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM, Morales AI. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Crit Rev Toxicol*. 2011b;41(10):803-821.

Sancho-Martinez SM, Prieto-García L, Prieto M, López-Novoa JM, López-Hernández FJ. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacol Ther*. 2012;136(1):35-55.

Sanha E, Parlakpınar H, Cihan OF, Turkoz Y, Acet A. Effects of aminoguanidine against renal ischemia reperfusion injury in rats. *Cell Biochem Funct*. 2004;24(2):137-141.

Sanhueza J, Valdes J, Campos R, Garrido A, Valenzuela A. Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia-reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1992;78(2):211-218.

Santos NA, Catão CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol*. 2007;81(7):495-504.

Santos NA, Bezerra CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61(1):145-155.

Sastre J, Pallardo FV, Vina J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*. 2000;49(5):427-435.

Sastry J, Kellie SJ. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. *Pediatr Hematol Oncol*. 2005;22(5):441-445.

Santoso JT, Lucci JA 3rd, Coleman RL, Schafer I, Hannigan EV. Saline, mannitol, and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity: a randomized trial. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;52(1):13-18.

Satyanarayana PS, Singh D, Chopra K. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cyclosporine in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2001;23(4):175-181.

Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000;130(8S Suppl):2073S-2085S.

Scambia G, Ranelletti FO, Benedetti-Panici P, Piantelli M, Bonanno G, De Vincenzo R, Ferrandina G, Pierelli L, Capelli A, Mancuso S. Quercetin inhibits the growth of a multidrug-resistant estrogen-receptor-negative MCF-7 human breast-cancer cell line expressing type II estrogen-binding sites. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991;28(4):255-258.

Schmitt A, Hauser C, Jaunin F, Dayer JM, Saurat JH. Normal epidermis contains high amounts of natural tissue IL-1 biochemical analysis by HPLC identifies a MW approximately 17 Kd form with a P1 5.7 and a MW approximately 30 Kd form. *Lymph Res.* 1986;5(2):105-118.

Schrader M, Fahimi HD. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(4):383-393.

Schrier RW, Chen YC, Cadnapaphornchai MA. From finch to fish to man: role of aquaporins in body fluid and brain water regulation. *Neuroscience.* 2004;129(4):897-904.

Sculer W. The inhibition of histaminases. *Experientia.* 1952;8(6):230-232.

Schwarz D, Kisselev P, Roots I. CYP1A1 genotype-selective inhibition of benzo [a]pyrene activation by quercetin. *Eur J Cancer.* 2005;41(1):151-158.

Sesink AL, Arts IC, Faassen-Peters M, Hollman PC. Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase. *J Nutr.* 2003;133(3):773-776.

Seth R, Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP. p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *J Biol Chem*. 2005;280(35):31230-31239.

Shen HM, Liu ZG. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(6):928-939.

Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K, Visner GA, Madsen K, Nick HS, Agarwal A. Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278(5):F726-F736.

Shoskes DA. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation*. 1998;66(2):147-152.

Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol*. 1999;57(2):199-208.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7265-7279.

Silici S, Ekmekcioglu O, Kanbur M, Deniz K. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *World J Urol*. 2011;29(1):127-132.

Silva JP, Gomes AC, Coutinho OP. Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *Eur J Pharmacol*. 2008;601(1-3):50-60.

Sims-Robinson C, Hur J, Hayes JM, Dauch JR, Keller PJ, Brooks SV, Feldman EL. The role of oxidative stress in nervous system aging. *PLoS One*. 2013;8(7):e68011.

Singh D, Chander V, Chopra K. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal injury in rats. *Drug Chem Toxicol*. 2004;27(2):145-156.

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44(2):129-146.

Sirota JC, Klawitter J, Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *J Toxicol*. 2011;2011:328120.

Sitar ME, Aydin S, Cakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clin Lab*. 2013;59(9-10):945-952.

Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Davies KJ, Grune T. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells. *FASEB J*. 2000;14(15):2503-2510.

Skalova S. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2005;48(2):75-80.

Sodergren E. Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement. (Dissertation). *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 949. Uppsala 2000.

Sorata Y, Takahama U, Kimura M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochim Biophys Acta*. 1984;799(3):313-317.

Spencer JP, Whiteman M, Jenner A, Halliwell B. Nitrite-induced deamination and hypochlorite-induced oxidation of DNA in intact human respiratory tract epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(7):1039-1050.

Spiteller G. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp Gerontol*. 2001;36(9):1425-1457.

De Stefani E, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Carzoglio JC, Ronco A, Olivera L. Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer*. 1999;34(1):100-110.

Stojiljkovic N, Stoilkovic M, Randjelovic P, Veljkovic S, Mihailovic D. Cytoprotective effect of vitamin C against gentamicin-induced acute kidney injury in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2012;64(1-2):69-74.

Stoppa GR, Cesquini M, Roman EA, Ogo SH, Torsoni MA. Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin dependent diabetic rats. *Life Sci*. 2006;78(12):1352-1361.



- Suarez AI, Lyaskovskyy V, Reek JN, van der Vlugt JI, de Bruin B. Complexes with nitrogen-centered radical ligands: classification, spectroscopic features, reactivity, and catalytic applications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013;52(48):12510-12529.
- Sugimoto K, Yagihashi S. Effects of aminoguanidine on structural alterations of microvessels in peripheral nerve of streptozotocin diabetic rats. *Microvasc Res.* 1997;53(2):105-112.
- Suzuki N, Sakamoto A, Ogawa R. Effect of L-canavanine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase on myocardial dysfunction during septic shock. *J Nippon Med Sch.* 2002;69(1):13-18.
- Szabo C, Ferrer-Sueta G, Zingarelli B, Southan GJ, Salzman AL, Radi R. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem.* 1997;272(14):9030-9036.
- Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol.* 2005;148:107-121.
- Tadagavadi RK, Reeves WB. Renal dendritic cells ameliorate nephrotoxic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2010a;21(1):53-63.
- Tadagavadi RK, Reeves WB. Endogenous IL-10 attenuates cisplatin nephrotoxicity: Role of dendritic cells. *J Immunol.* 2010b;185(8):4904-4911.
- Takeda M, Kobayashi M, Shirato I, Osaki T, Endou H. Cisplatin-induced apoptosis of immortalized mouse proximal tubule cells is mediated by interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) family of proteases but inhibited by overexpression of Bcl-2. *Arch Toxicol.* 1997;71(10):612-621.
- Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M. Hypoxia-inducible factor modulates tubular cell survival in cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(5):F1123-F1133.
- Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(3):R431-R444.

Terao J, Piskula MK. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. *Nutrition*. 1999;15(10):790-791.

Tian M, Qing C, Niu Y, Dong J, Cao X, Song F, Ji X, Lu S. Effect of aminoguanidine intervention on neutrophils in diabetes inflammatory cells wound healing. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2013;121(10):635-642.

Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Smith SR, Petrash JM, Misko TP, Moore WM, Currie MG, Corbett JA, McDaniel ML, Williamson JR. Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines: inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation endproduct formation. *Diabetes*. 1993;42(2):221-231.

Townsend DM, Hanigan MH. Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300(1):142-148.

Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lopus MG, Hanigan MH. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(1):1-10.

Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH. Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2009;63(2):79-85.

Tribolo S, Lodi F, Connor C, Suri S, Wilson VG, Taylor MA, Needs PW, Kroon PA, Hughes DA. Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):50-56.

Tsuji T, Kato A, Yasuda H, Miyaji T, Luo J, Sakao Y, Ito H, Fujigaki Y, Hishida A. The dimethylthiourea-induced attenuation of cisplatin nephrotoxicity is associated with the augmented induction of heat shock proteins. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;234(2):202-208.

Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Hirakata H, Iida M. Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003a;285(2):F208-F218.

Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Matsutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int.* 2003b;63(1):72-82.

Tsutsumishita Y, Onda T, Okada K, Takeda M, Endou H, Futaki S, Niwa M. Involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242(2):310-312.

Uehara T, Watanabe H, Itoh F, Inoue S, Koshida H, Nakamura M, Yamate J, Maruyama T. Nephrotoxicity of a novel antineoplastic platinum complex, nedaplatin: a comparative study with cisplatin in rats. *Arch Toxicol.* 2005;79(8):451-460.

Uivarosi V, Barbuceanu SF, Aldea V, Arama CC, Badea M, Olar R, Marinescu D. Synthesis, spectral and thermal studies of new rutin vanadyl complexes. *Molecules.* 2010;15(3):1578-1589.

Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, Broschard TH, Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Lines TC. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. *Mutat Res.* 2008;654(1):38-44.

Varma SD, Hegde KR. Lens thiol depletion by peroxynitrite. Protective effect of pyruvate. *Mol Cell Biochem.* 2007;298(1-2):199-204.

Wainford RD, Weaver RJ, Stewart KN, Brown P, Hawksworth GM. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology.* 2008;249(2):184-193.

Walgren RA, Karnaky KJ Jr, Lindenmayer GE, Walle T. Efflux of dietary flavonoid quercetin 4-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000a;294(3):830-836.

Walgren RA, Lin JT, Kinne RK, Walle T. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4-beta-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000b;294(3):837-843.

Wang T. Role of iNOS and eNOS in modulating proximal tubule transport and acid-base balance. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283(4):F658-F662.

Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-320.

Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog.* 2006;5:14.

Wei Q, Dong G, Yang T, Megyesi J, Price PM, Dong Z. Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007a;293(4):F1282-F1291.

Wei Q, Dong G, Franklin J, Dong Z. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2007b;72(1):53-62.

Weiner MW, Jacobs C. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Fed Proc.* 1983;42(13):2974-8.

Winston JA, Safirstein R. Reduced renal blood flow in early cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Am J Physiol.* 1985;249(4 Pt 2):F490-F496.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kid Int.* 1996;49:1304-1305

Worrall NK, Chang K, Suau GM, Allison WS, Misko TP, Sullivan PM, Tilton RG, Williamson JR, Ferguson TB Jr. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents myocardial and systemic vascular barrier dysfunction during early cardiac allograft rejection. *Circ Res.* 1996;78(5):769-779.

Yamate J, Sato K, Machida Y, Ide M, Sato S, Nakatsuji S, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S. Cisplatin-induced rat renal interstitial fibrosis: a possible pathogenesis based on the data. *J Toxicol Pathol.* 2000;13(4):237-247.

Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci.* 2007;334(29):115-124.

Yang C, Kaushal V, Haun RS, Seth R, Shah SV, Kaushal GP. Transcriptional activation of caspase-6 and -7 genes by cisplatin-induced p53 and its functional significance in cisplatin nephrotoxicity. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):530-544.

- Yatsu T, Aoki M, Inagaki O. Preventive effect of zelandopam, a dopamine D1 receptor agonist, on cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Eur J Pharmacol.* 2003;461(2-3):191-195.
- Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, Iraz M, Ozyurt H, Kotuk M, Akyol O. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res.* 2003;47(2):149-156.
- Yildirim Z, Turkoz Y, Kotuk M, Armutcu F, Gurel A, Iraz M, Ozen S, Aydogdu I, Akyol O. Effects of aminoguanidine and antioxidant erdosteine on bleomycin- induced lung fibrosis in rats. *Nitric Oxide.* 2004;11(2):156-165.
- Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, Gergerlioglu S. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2004;50(3):287-290.
- Yilmaz S, Yilmaz E. Effects of melatonin and vitamin E on oxidative-antioxidative status in rats exposed to irradiation. *Toxicology.* 2006;222(1-2):1-7.
- Yildiz G, Demiryurek AT, Sahin-Erdemli I, Kanzik I. Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methyl- guanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. *Br J Pharmacol.* 1998;124(5):905-910.
- Yin X, Apostolov EO, Shah SV, Wang X, Bogdanov KV, Buzder T, Stewart AG, Basnakian AG. Induction of renal endonuclease G by cisplatin is reduced in DNase I-deficient mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(9):2544-2553.
- Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(2):879-886.
- Yorimitsu M, Muranaka S, Sato EF, Fujita H, Abe K, Yasuda T, Inoue M, Utsumi K. Role of alpha-tocopherol in the regulation of mitochondrial permeability transition. *Physiol Chem Phys Med NMR.* 2004;36(2):95-107.
- Yoshida M, Yamamoto M, Nikaido T. Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res.* 1992;52(23):6676-6681.

Yoshida M, Fukuda A, Hara M, Terada A, Kitanaka Y, Owada S. Melatonin prevents the increase in hydroxyl radical-spin trap adduct formation caused by the addition of cisplatin in vitro. *Life Sci.* 2003a;72(15):1773-1780.

Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Itoh H, Kang D, Kohno K. p53 physically interacts with mitochondrial transcription factor a and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res.* 2003b, 63(13):3729-3734.

Yoshiki N, Kubota T, Aso T. Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in human non-pregnant and early pregnant endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(3):283-287.

Yoshimoto T, Furukawa M, Yamamoto S, Horie T, Watanabe-Kohno S. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;116(2):612-618.

Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001;54(3):176-186.

Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int.* 2007;72(1):37-44.

Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, Akira S, Reeves WB. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(5):923-932.

Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola C. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1996;27(2):317-323.

Zhang L, Hanigan MH. Role of cysteine S-conjugate beta-lyase in the metabolism of cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(3):988-994.

Zhou H, Miyaji T, Kato A, Fujigaki Y, Sano K, Hishida A. Attenuation of cisplatin-induced acute renal failure is associated with less apoptotic cell death. *J Lab Clin Med.* 1999;134(6):649-658.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Dr Sonja Ilić je rođena 11.04.1980. godine u Nišu. Osnovnu i srednju školu završila je u Nišu sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet u Nišu upisala je 1999/2000., a završila 2006. godine sa prosečnom ocenom 9.03 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Aktivno se služi engleskim jezikom. Obavezni lekarski staž obavila je u Nišu, nakon čega je položila stručni ispit 2007. god. Iste godine, završila je kurs Urgentne medicine u Zavodu za hitnu medicinsku pomoć u Nišu.

Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu u Nišu, smer molekularna medicina, upisala je 2008. godine. Od oktobra 2009. godine angažovana je kao volonter saradnik na Institutu za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu. Na mesto saradnika u nastavi na UNO Fiziologija izabrana je 01.10.2012.godine. U zvanje asistenta na UNO Fiziologija izabrana je 01.10.2014. godine.

Na Medicinskom fakultetu u Nišu, 2011. godine završila je kurs "Matične ćelije i savremena medicina".

Do sada je objavila 18 naučnih i stručnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima i skupovima. Bila je komentor u jednom studentskom radu: „Kosuplementacija vitaminom C i E u gentamicinom indukovanoj nefrotoksičnosti“ na 55. Kongresu studenata Biomedicinskih nauka Srbije sa međunarodnim učešćem, Vrnjačka banja, 2015.

Oktobra 2015. godine dobila je saglasnost Naučno-stručnog veća za medicinske nauke Univerziteta u Nišu na Odluku o usvajanju teme doktorske disertacije pod nazivom „Protektivni efekti kvercetina i aminogvanidina kod pacova sa akutnom bubrežnom insuficijencijom izazvanom cisplatinom“ na Medicinskom fakultetu u Nišu.

## **Изјава 1.**

### **ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

#### **ПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКТИ КВЕРЦЕТИНА И АМИНОГВАНИДИНА КОД ПАЦОВА СА АКУТНОМ БУБРЕЖНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ ИЗАЗВАНОМ ЦИСПЛАТИНОМ**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

---

Соња М. Илић



**Изјава 2.**

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: **ПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКТИ КВЕРЦЕТИНА И  
АМИНОГВАНИДИНА КОД ПАЦОВА СА АКУТНОМ БУБРЕЖНОМ  
ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ ИЗАЗВАНОМ ЦИСПЛАТИНОМ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_  
Соња М. Илић

### Изјава 3:

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

#### **ПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКТИ КВЕРЦЕТИНА И АМИНОГВАНИДИНА КОД ПАЦОВА СА АКУТНОМ БУБРЕЖНОМ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈОМ ИЗАЗВАНОМ ЦИСПЛАТИНОМ**

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)<sup>1</sup>

У Нишу, \_\_\_\_\_

Потпис аутора дисертације:

\_\_\_\_\_  
Соња М. Илић