



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



MILICA S. VELJKOVIĆ

**UTICAJ EKSTRAKATA LISTA ZELENOG
ČAJA I PLODA BOROVNICE NA TOK
AKUTNE BUBREŽNE INSUFICIJENCIJE
PACOVA IZAZVANE GENTAMICINOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2017.



UNIVERSITY OF NIŠ
MEDICAL FACULTY



MILICA S. VELJKOVIĆ

**EFFECTS OF GREEN TEA LEAF AND
BILBERRY FRUIT EXTRACTS ON
GENTAMICIN-INDUCED ACUTE RENAL
FAILURE**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2017.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Prof. dr Mirjana Radenković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Naslov: UTICAJ EKSTRAKATA LISTA ZELENOG ZELENOG ČAJA I PLODA BOROVNICE NA TOK AKUTNE BUBREŽNE INSUFICIJENCIJE PACOVA IZAZVANE GENTAMICINOM

Rezime: U cilju utvrđivanja uticaja ploda borovnice i lista zelenog čaja na gentamicinom izazvanu akutnu bubrežnu insuficijenciju kod pacova praćene su funkcionalne i morfološke promene bubrega. Studija je uključila šest grupa pacova: kontrolnu grupu (C), grupe koje su primale samo gentamicin (GM), samo zeleni čaj (GT), samo borovnicu (B), zeleni čaj i gentamicin (GT+GM) i i borovnicu i gentamicin (B+GM). Procenjivani su bubrežna funkcija, oksidativni i antioksidativni parametri i patohistološki nalaz bubrežnog tkiva. Morfometrijskom analizom su kvantifikovane patohistološke promene. Gentamicin je izazvao značajni porast nivoa ureje i kreatinina kao i parametara oksidativnog stresa (MDA i AOPP), dok je nivo antioksidativnog enzima katalaze bio značajno snižen. U GM grupi je uočena nekroza proksimalnih tubula, vakuolizacija citoplazme i masivni mononuklearni zapaljenjski infiltrat. Kada se daju zajedno sa gentamicinom zeleni čaj i borovnica ispoljavaju histološki renoprotektivni efekat. Morfometrijska analiza je potvrdila histološke rezultate. Takođe, u GT+GM i B+GM grupama je utvrđeno poboljšanje parametara bubrežne funkcije i antioksidativne odbrane organizma. Regenerativni potencijal zelenog čaja i borovnice nakon oštećenja bubrega izazvanim gentamicinom može se objasniti sniženjem nivoa oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije. I zeleni čaj i borovnica su prirodni antioksidansi koje ljudi masovno konzumiraju a na osnovu ovih rezultata mogli bi da budu korisni u smanjenju oksidativnog stresa i promena koje on daje na nivou bubrežnih tubula i intersticijuma.

Naučna oblast: Medicina

Naučna disciplina: Fiziologija

Ključne reči: gentamicin, zeleni čaj, borovnica, pacov, nefrotoksičnost, oksidativni stres, antioksidans

UDK: 612.466.08:615.322

CERIF klasifikacija: B 470 Physiology

Tip licence: CC BY-NC-SA

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Prof. dr Mirjana Radenković, full professor at Medical faculty University of Niš

Title: EFFECTS OF GREEN TEA LEAF AND BILBERRY FRUIT EXTRACTS ON GENTAMICIN-INDUCED ACUTE RENAL FAILURE

Abstract: We assessed effects of bilberry and green tea diet in rat model of gentamicin-induced nephrotoxicity by monitoring functional and morphological changes in kidneys. The study was conducted on six groups of rats: control group (C), treated with only gentamicin (GM), treated with only green tea (GT), treated with only bilberry (B), treated with both gentamicin and green tea (GT+GM) and treated with both gentamicin and bilberry (B+GM). Kidney function, oxidant and antioxidant parameters of renal tissue, as well as histopathological studies were assessed. Morphometric analysis was used to quantify these histopathological changes. Gentamicin caused significant elevations in serum creatinine and urea and oxidative stress parameters (MDA and AOPP), while antioxidative enzyme catalase was significantly decreased. Histological sections of kidneys in GM group revealed necrosis of proximal tubules, vacuolation of cytoplasm and massive mononuclear inflammatory infiltrates in interstitium. Coadministration of green tea and bilberry with gentamicin histologically showed renoprotective effect. Histological results were confirmed and quantified by morphometric analysis. Also in GT+GM and B+GM group we measured ameliorated parameters of renal functions and antioxidative defense. Regenerative potential of green tea and bilberry after renal injury induced by gentamicin could be explained through the decrease of oxidative stress and lipid peroxidation. Green tea and bilberry are both natural antioxidants, and could be beneficial in the reduction of oxidative stress and changes caused by it primarily in renal tubules and interstitium.

Scientific Field: Medicine

Scientific Discipline: Physiology

Key Words: gentamicin, green tea, bilberry, rat, nephrotoxicity, oxidative stress, antioxidant

UDC: 612.466.08:615.322

CERIF Classification: B 470 Physiology

License Type: CC BY-NC-SA

SADRŽAJ

PREGLED LITERATURE.....	9
Bubreg.....	9
Gentamicin.....	9
Poreklo i farmakologija gentamicina	9
Nefrotoksičnost gentamicina.....	12
Tubulski efekti	14
Glomerulski efekti	17
Vaskularni efekti.....	18
Oksidativni stres i zapaljenje	19
Zeleni čaj.....	22
Borovnica.....	26
CILJ ISTRAŽIVANJA	31
MATERIJAL I METODE	32
Estrakcija biljnog materijala	32
Zeleni čaj.....	32
Borovnica.....	32
Određivanje sastojaka ekstrakta.....	33
Određivanje ukupnih polifenola i tanina.....	33
Određivanje flavonoida.....	34
Određivanje fenilpropanoida.....	34
Određivanje antocijana	35
HPLC analiza	35
<i>In vitro</i> utvrđivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata	36
DPPH metoda.....	36
Test inhibicije lipidne peroksidacije u lipozomima	37
Eksperimentalne životinje.....	39
Eksperimentalna procedura.....	39
Biohemijske analize	40

<i>In vivo</i> procena lipidne peroksidacije (MDA).....	40
<i>In vivo</i> procena oksidacije proteina (AOPP).....	40
<i>In vivo</i> procena aktivnosti katalaze (CAT).....	40
Histopatološka ispitivanja	41
Morfometrijska analiza	41
Statistička analiza.....	42
REZULTATI	43
Određivanje sastojaka ekstrakta.....	43
Ekstrakt lista zelenog čaja.....	43
Ekstrakt ploda borovnice	43
Rezultati HPLC-DAD analize.....	43
Rezultati <i>in vitro</i> određivanja antioksidativnog kapaciteta	44
Rezultati biohemijskih analiza krvi.....	45
Rezultati analize markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u tkivu bubrega	45
Procena lipidne peroksidacije (MDA)	45
Rezultati histološke analize.....	49
Rezultati morfometrijskih ispitivanja tkiva bubrega.....	59
DISKUSIJA	62
Efekat zelenog čaja na akutnu bubrežnu insuficijenciju pacova izazvanu gentamicinom.....	68
Efekat borovnice na akutnu bubrežnu insuficijenciju pacova izazvanu gentamicinom.....	73
ZAKLJUČAK	78
LITERATURA	80

UVOD

Gentamicin je aminoglikozidni antibiotik niske cene i velike efikasnosti u lečenju teških, životno ugrožavajućih, Gram negativnih infekcija. Njegovu upotrebu ograničavaju neželjeni efekti kao što su nefrotoksičnost i ototoksičnost. Do 30% pacijenata lečenih gentamicinom pokazuje neke od znakova akutne bubrežne insuficijencije. Gentamicin se izlučuje prvenstveno preko bubrega. Delimično se reapsorbuje i akumulira unutar proksimalnih tubula gde ispoljava svoje najizraženije toksične efekte. Sam mehanizam nastanka gentamicinske nefrotoksičnosti nije u potpunosti razjašnjen ali se smatra da glavnu ulogu u njenom razvoju ima nastanak visokoreaktivnih kiseoničnih i azotnih slobodnih radikala. Pored direktnog štetnog efekta slobodnih radikala na tkivo (usled reakcije sa masnim kiselinama, proteinima, ugljenim hidratima i nukleinskim kiselinama), oni izazivaju nakupljanje i aktiviranje leukocita u oštećenom tkivu i posledično stvaranje enzima (mijeloperoksidaze, elastaze, proteaze) koji oštećuju tkivo i sami oslobađaju nove slobodne radikale. Gentamicinom nastao oksidativni stres takođe smanjuje aktivnost endogenih antioksidativnih enzima u bubregu. Time se stvara začarani krug između oksidativnog stresa i zapaljenja. Utvrđeno je da različiti antioksidansi ublažavaju akutnu bubrežnu isuficijenciju izazvanu gentamicinom. Antioksidansi su jedinjenja koja mogu inhibiranjem inicijacije ili propagacije lančane reakcije oksidacije da odlože ili inhibiraju oksidaciju lipida i drugih molekula. Organizam se protiv slobodnih radikala, osim sopstvenim odbrambenim mehanizmima, brani i prirodnim antioksidansima koji se unose hranom. Blagotvorno dejstvo biljaka na zdravlje pripisuje se visokom sadržaju raznih sekundarnih biljnih metabolita, od kojih su najzastupljenija fenolna jedinjenja. Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja se pripisuje njihovim redoks osobinama koje mogu da igraju važnu ulogu u neutralisanju slobodnih radikala, zaustavljanju lančanih reakcija (lipidne peroksidacije) ili raspadanju peroksida. Iako u poređenju sa sintetskim lekovitim supstancama, biljni aktivni metaboliti imaju niži bioaktivni potencijal, uočeno je da svakodnevni unos hranom u malim količinama, dugoročno mogu izazvati primetan fiziološki efekat.

Upotreba biljaka u svrhu lečenja je stara koliko i čovečanstvo. Do početka XX veka gotovo 90% lekova je bilo poreklom iz prirode. Biljke su se prvenstveno koristile u ishrani, ali su sa uočavanjem njihovih lekovitih svojstava dobijale sve veći značaj kao izvor i bioaktivnih

supstanci. Pre više od dve hiljade godina, Hipokrat, otac medicine, je preporučivao svojim pacijentima: “Neka vaš lek bude hrana vaša, a hrana vaša lek”.

List zelenog čaja i plod borovnice se koriste u ishrani širom sveta, a u literaturi postoji mnogo podataka o njihovoj snažnoj antioksidativnoj aktivnosti. Kako do sada nema objavljenih studija o mogućem efektu ploda borovnice kao ni dovoljno podataka o mehanizmu zaštitnog efekta zelenog čaja na bubrege, ovo istraživanje se bavi procenom uticaja etanolnog ekstrakta lista zelenog čaja i metanolnog ekstrakta ploda borovnice na gentamicinom izazvanu akutnu bubrežnu insuficijenciju.

PREGLED LITERATURE

Bubreg

Bubreg je vitalni organ koji igra ključnu ulogu u zdravlju, bolesti i sveukupnom rastu i razvoju. Glavna funkcija bubrega je održavanje normalne zapremine i sastava telesnih tečnosti i regulacija acido-bazne ravnoteže. Veliki broj faktora iz spoljašnje sredine, uključujući i neke lekove, utiču na ove funkcije (Priyamvada i sar., 2008).

Sa starenjem dolazi do funkcionalnih i strukturnih fizioloških promena u bubregu. Ukupan broj nefrona se smanjuje, kao i njihova efikasnost. Ove promene se pripisuju oksidativnom stresu, za koji se zna da se povećava sa godinama, što objašnjava efekte starenja na molekularnom nivou. Morfološke promene bubrega obuhvataju zadebljanje intime krvnih sudova unutar bubrega, infiltraciju zapaljenskim ćelijama, fibrozu strome i zadebljanje bazalne membrane glomerula. Najviše promena tokom starenja trpe tubulske ćelije. One gube svoj pravilan oblik (postaju nepravilnog oblika), gube četkasti pokrov, smanjuje se broj vakuola u njima, a povećava broj lizozoma i nakupljanje lipofuscina. Tubulska bazalna membrana zadebljava, isto kao glomerulska, a mitohondrije podležu degenerativnim promenama (Akyol i sar., 2014).

Kako sa starenjem endogeni antioksidantni sistem slabi, a oksidativni stres se povećava, to bi trebalo kompenzovati pojačanjem primene egzogenih antioksidanasa, odnosno njihovim povećanim unosom preko hrane.

Gentamicin

Poreklo i farmakologija gentamicina

Aminoglikozidni antibiotik gentamicin izolovali su Weinstein i saradnici 1963. godine iz gljive *Micromonospora purpura* (Actinomycete). Uveden je u SAD 1969. godine kao kompleks gentamicina C1, C1a i C2 i gentamicina A, koji se po strukturi razlikuje od ostalih članova kompleksa. Unutar grupe aminoglikozida, sufiks "micin" se koristi u imenu kada se antibiotik stvara iz kulture *Micromonospora*, dok se sufiks "mycin" koristi kada se stvara iz kulture *Streptomyces*.

Gentamicin se sastoji od 2 aminošećera vezana glikozidnom vezom za heksoznu osnovu. To je polarni katjon (Currier i sar., 1994), jako hidrosolubiln, sa optimalnom pH vrednošću od 6 do 8. Divalentni katjoni i kisela sredina mu inhibišu antibiotsko dejstvo.

Gentamicin sulfat je higroskopni prah bez mirisa, bele boje do boje mesa koji ne sadrži više od 15% vode. Tačka topljenja mu je između 200 i 250 °C, što ga čini veoma stabilnim na toploti. Osim u vodi, umereno se rastvara u etanolu, metanolu i acetonu. Dejstvo gentamicin sulfata se gubi čuvanjem u plastičnim špricovima pri čemu se formira braon precipitat. Čuvanje u staklenim špricovima ne bi trebalo da traje duže od 30 dana. Smatra se da je bioraspoloživost gentamicina nakon intramuskularne i intravenske injekcije potpuna.

To je najčešće korišćen i najbolje proučen lek od svih aminoglikozida (Balakumar i sar., 2010; Ali i sar., 2011). Koristi se za lečenje teških infekcija, uglavnom izazvanih Gram negativnim bakterijama kao što su *Pseudomonas*, *Proteus* i *Serratia* (Gonzalez i Spencer, 1998; Tam i sar., 2006), ali i nekih Gram pozitivnih poput *Enterococcus* i *Staphylococcus* (Gonzales i Spencer, 1998; Tam i sar., 2006). Anaerobi nisu osetljivi na njega, dok su *Streptococcus haemolyticus* i *Pneumococcus* slabo osetljivi. Najčešće indikacije za njegovu upotrebu su: septikemija, neonatalna sepsa, neonatalni meningitis, infekcije žučnih puteva, pijelonefritis, prostatitis i endokarditis. Uobičajena doza kod odraslih pacijenata sa normalnom bubrežnom funkcijom je 3-5 mg/kg dnevno, raspoređena na po 12 sati (Gilbert, 1997; Gonzalez i Spencer, 1998).

Kontraindikacije za upotrebu gentamicina su trudnoća i *myastenia gravis*, dok je opreznost pri upotrebi potrebna u slučaju prethodno postojećeg oštećenja bubrega, odmaklih godina kao i istovremene upotrebe diuretika Henleove petlje, cefalosporina ili neuromišićnih blokatora.

Gentamicin se ne vezuje značajno za proteine plazme. Najveću koncentraciju u plazmi dostiže nakon 30 do 90 minuta posle intramuskularnog davanja i odmah posle intravenskog davanja (Tam i sar., 2006).

Koncentracija gentamicina u sekretima i većini tkiva je niska. Visoka je u proksimalnim tubulima bubrega, endolimfi i perilimfi unutrašnjeg uva. Koncentracija u žuči iznosi 30% one u plazmi. Koncentracija u cerebrospinalnoj tečnosti je manja od 10%, dok u prisustvu meningitisa može da dostigne 20% koncentracije u plazmi (Lopez-Novoa i sar., 2011).

Poluvreme eliminacije kod pacijenata sa normalnom bubrežnom funkcijom iznosi 2 sata. Kada se klirens kreatinina prepolovi, poluvreme eliminacije u serumu se udvostručuje. Zato su neophodne korekcije doza ili produženje intervala davanja kod pacijenata sa slabošću bubrega.

Gentamicin se ne metaboliše u telu već se eliminiše glomerulskom filtracijom u aktivnoj, nepromenjenoj formi i delimično ga reapsorbuju ćelije proksimalnih tubula. Iako se većina leka putem glomerulske filtracije izlučuje urinom (Gonzalez i Spencer, 1998), 5-10% doze se taloži u bubrežnom korteksu i zadržava se tu dugo po prestanku davanja leka. Intravenski dat gentamicin se skoro u potpunosti odstranjuje putem bubrega, ali i mala količina koja se selektivno apsorbuje i akumulira u proksimalnim tubulima je toksična. U proksimalnim tubulima gentamicin se prvo nakuplja u lizozomima. U slučaju predoziranja, gentamicin se može otpustiti iz lizozoma u citoplazmu, direktnim probijanjem membrane lizozoma ili retrogradnim transportom kroz Goldžijev aparat i endoplazmatski retikulum što rezultuje ćelijskom smrću (Sandoval 2004; Servais i sar., 2006).

Glavni štetni efekti su: vestibularno oštećenje, ototoksičnost i nefrotoksičnost (Lopez-Novoa i sar., 2011) i neuromišićna blokada (Gonzalez i Spencer, 1998). Oštećenje vestibularnog dela osmog kranijalnog živca je veće od oštećenja kohlearnog dela. Neke studije ukazuju na genetsku sklonost ka auditornoj ototoksičnosti usled mutacije mitohondrijalne DNK (Hutchin i Cortopassi, 1994; Cassano i sar., 1999), što se manifestuje kao tinitus, gluvoća, mučnina, poraćanje, vrtoglavica i nistagmus. Nedavno je otkriveno da davanje antibiotika geldanamicina štiti ćelije unutrašnjeg uva od toksičnosti uzrokovane gentamicinom (Yu i sar., 2009). Gentamicinska nefrotoksičnost je dozno zavisna (Gonzalez i Spencer, 1998; Lopez-Novoa, 2011) i manifestuje se akutnom tubularnom nekrozom i bubrežnom slabošću (Salem i sar., 2010). U pojedinim slučajevima štetni efekti gentamicina su toliko izraženi da se upotreba leka mora obustaviti (Gonzalez i Spencer, 1998).

Gentamicin se može ukloniti iz tela hemodijalizom i peritonealnom dijalizom. Oko 50% unete doze može se odstraniti hemodijalizom tokom 12 sati.

Nefrotoksičnost gentamicina

Katjonska struktura aminoglikozida, koja zavisi od broja amino kiselina i njihovog rasporeda unutar molekula, ima važnu ulogu u njihovoj toksičnosti koja uglavnom zahvata tkiva u kojima se akumuliraju: bubreg (nefrotoksičnost) i uvo (ototoksičnost).

Uprkos svojim neželjenim efektima, aminoglikozidi još uvek predstavljaju jedinu efikasnu terapijsku alternativu protiv infekcija neosetljivih na ostale antibiotike. (Nicolau i sar., 1995; Gilbert, 1997; Bertino i Rotschafer, 1997; Gonzalez i Spencer, 1998; Lopez-Novoa i sar., 2011). To je uglavnom zbog njihove hemijske stabilnosti, brzog baktericidnog efekta, sinergije sa beta laktamskim antibioticima, male rezistencije i niske cene (Gonzalez i Spencer, 1998). Iako spada u jedan od najnefrotoksičnijih aminoglikozida, gentamicin se još uvek često primenjuje kao lek prvog i drugog izbora, sam ili u kombinaciji sa antibioticima koji deluju na ćelijski zid, za lečenje teških i životno ugrožavajućih infekcija izazvanih Gram pozitivnim i Gram negativnim aerobima (Gilbert, 1997; Gonzalez i Spencer, 1998; Lopez-Novoa i sar., 2011). Koristi se u eksperimentalnom modelu nefrotoksičnosti ove grupe lekova, kako u studijama na životinjama (Tavafi, 2012; Tavafi i sar. 2012): kunićima, miševima i pacovima (Balakumar i sar., 2008; Ali i sar., 2011; Nabavi i sar., 2012, Moreira i sar., 2013), tako i u humanim studijama (Laurent i sar., 1982; Laurent i sar. 1990; Kacew i Bergeron, 1990; Lopez-Novoa i sar., 2011, Awodele i sar., 2015). Upravo zbog toga može da posluži kao jedan od najboljih eksperimentalnih modela za procenu efikasnosti prirodnih antioksidanasa protiv nefrotoksičnosti (Moreira i sar., 2013; Dhodi i sar., 2015).

Od pacijenata lečenih gentamicinom duže od 7 dana, 30% pokazuje neke znake nefrotoksičnosti. Ona je uvek ograničavajući faktor u terapijskoj primeni gentamicina. Neželjeni efekti terapijske primene gentamicina su često uslovljeni ograničenjem ukupne doze ili trajanjem lečenja. Kod bolesnika sa smanjenom bubrežnom funkcijom neophodno je dozu primenjenog gentamicina korigovati (Gonzalez i Spencer, 1998). Kliničke studije tvrde da učestalost gentamicinske nefrotoksičnosti zavisi od ciljne populacije, jer su neke osobe podložnije od ostalih.

Najveći faktori rizika su: poodmaklo životno doba, već smanjena bubrežna funkcija, trudnoća, dehidracija, lečenje koje dugo traje, visoke doze, podeljene doze, kao i istovremena primena nekih drugih lekova (nesteroidnih antiinflamatornih lekova, diuretika, amfotericina, cisplatine,

ciklosporina). Toksični efekti ovog antibiotika nastaju usled njegovog inhibitornog dejstva na stvaranje proteina u ćelijama bubrega (Salem i sar., 2010; Stojiljkovic i sar., 2012; Randelović, 2013; Akyol i sar., 2014). Mehanizam gentamicinske nefrotoksičnosti uključuje: stvaranje slobodnih radikala u bubregu, smanjenje sposobnosti endogenih antioksidantnih mehanizama, akutnu tubularnu nekrozu i kongestiju glomerula. Svi zajedno uzrokuju smanjenu glomerulsku filtraciju i funkciju bubrega (Lopez-Novoa i sar., 2011; Randjelovic i sar., 2012). Iako gentamicinska nefrotoksičnost nastaje zajedničkim dejstvom tubulskih, glomerulskih i vaskularnih efekata gentamicina (Lopez-Novoa i sar., 2011), najbolje su proučeni tubulski efekti (Randelović, 2013) koji nastaju usled značajne akumulacije i retencije gentamicina u proksimalnim izvijuganim tubulima bubrega (Lopez-Novoa i sar., 2011; Acharya i sar., 2013).

Eksperimentalno je potvrđeno da su, uprkos oporavku bubrežne funkcije, 30 dana po prestanku davanja gentamicina, pacovi i dalje imali povećanu infiltraciju makrofaga i miofibroblasta u tkivu bubrega (Geleilate i sar., 2002). Inflamatorni i fibrogeni odgovori na gentamicin se povezuju sa povećanjem nivoa transformišućeg faktora rasta beta, endotelina i angiotenzina II, što ukazuje na njihovu ulogu u progresiji tubulointersticijalnog nefritisa. Takođe je nađeno da davanje gentamicina kulturi proksimalnih tubulocita izaziva njihovu apoptozu (Servais i sar., 2005). Smatra se da povećan nivo oksidativnog stresa nastao usled primene ovog antibiotika dovodi do stimulacije stvaranja proapoptotičnih ili medijatora zapaljenja, u koje spadaju nuklearni faktor kapa-B (NF-KB), leukocitni adhezioni molekuli, mitogenima-aktivisane protein kinaze i transformišući faktor rasta B1 i da svi zajedno doprinose oštećenju bubrega (Lopez-Novoa i sar., 2011, Otunctemur i sar., 2013).

Najčešća klinička slika aminoglikozidne toksičnosti je neoligurični ili čak poliurični hiposmolarni poremećaj bubrežne ekskrecije praćen smanjenom sposobnošću bubrega da koncentriše mokraću, porastom ureje i kreatinina u plazmi, odnosno, pacijent sa azotemijom koji mokri 1-2 l urina dnevno (Kaloyanides i Pastoriza-Munoz, 1980). Takođe su prisutni: tubularna proteinurija, lizosomalna enzimurija, aminoacidurija, blaga glikozurija i poremećaji elektrolita (hiperkalciurija, hipermagneziurija, hipokalcemija i hipomagneziemija) (Kaloyanides i Pastoriza-Munoz, 1980; Lopez-Novoa i sar., 2011).

Faktori koji utiču na gentamicinsku nefrotoksičnost kod pacova:

Pol pacova

Na istu dozu gentamicina mužjaci imaju izraženiji nefrotoksični efekat nego ženke. Nađeno je da testosteron povećava aktivnost lizozoma u proksimalnim tubulima bubrega miševa. Takođe, mužjaci imaju veću aktivnost mitohondrijalnih citohrom oksidaza u bubregu (Parker i sar., 1980). Razlog zbog čega su mužjaci osetljiviji na gentamicin od ženki bi mogao da leži u tome što gentamicin oštećuje respiratornu aktivnost mitohondrija. U eksperimentalnim modelima gentamicinske nefrotoksičnosti nađeno je da su ženke imale manje povećanje ureje i kreatinina u plazmi. S druge strane, kod njih se najizraženije oštećenje bubrega dogodilo nešto ranije nego kod mužjaka. Tokom svih dana eksperimenta, akumulacija gentamicina u korteksu bubrega bila je manje izražena kod ženki uprkos podjednako zastupljenoj nekrozi tubula. Egzogeno dat testosteron ženkama pacova nije promenio nalaze kao ni kastracija mužjaka pre puberteta (Parker i sar., 1980). Zbog svega ovoga je pol pacova nije važna varijabla koju treba uzeti u obzir u eksperimentima.

Ostali faktori:

Kao i kod ostalih modela akutne bubrežne insuficijencije, prethodno postojeća deplecija volumena ekstraćelijske tečnosti pogoršava nefrotoksičnost. Ishrana siromašna natrijumom pre gentamicinskog tretmana je davala ozbiljniju nefrotoksičnost, sa pojedinim slučajevima rane smrti. Veliko unošenje natrijuma, iako smanjuje taloženje gentamicina u korteksu, nije imalo uticaj na akutnu nekrozu tubula. Diuretici Henleove petlje pogoršavaju gentamicinsku nefrotoksičnost, najverovatnije zbog smanjenja volumena ekstraćelijske tečnosti, a ne same interakcije lekova. Metabolička acidoza i hipokalijemija pogoršavaju gentamicinsku nefrotoksičnost (Porter, 2013).

Tubulski efekti

Toksičnost gentamicina u tubulima se ispoljava u vidu smrti mahom proksimalnih tubulocita (Upaganlawar i sar., 2006) sa okolnim zapaljenjem i poremećajem transporta vode i elektrolita. Ćelijska smrt usled davanja gentamicina u eksperimentima, kao i u kulturi ćelija može da se ispolji kao apoptoza (Li i sar., 2009) ili nekroza ćelija (Edwards i sar., 2007; Lopez-Novoa i sar., 2011; Randelović, 2013). Fenotip ćelijske smrti koji će se ispoljiti zavisi od koncentracije leka, kao i prisustva drugih predisponirajućih faktora (Saito i sar., 2006). Smisao ćelijske smrti bi

mogao da bude čišćenje bubrega od već oštećenih ćelija i kompenzatorni proliferativni odgovor. (Stojiljkovic i sar., 2012). Apoptoza je proces za koji je potreban ATP. Kada ćelijske zalihe ATP-a padnu, ćelijska smrt gubi karakteristike apoptoze i dobija karakteristike nekroze (Lopez-Novoa i sar., 2011).

Kako se gentamicin najviše akumulira u epitelnim ćelijama proksimalnih tubula, njihovo oštećenje je najzastupljenije. Njegovo dugo zadržavanje u proksimalnim tubulocitima dovodi do gubitka integriteta četkastog pokrova ćelije (Dhodi i sar., 2015). Supresija Na-K ATP-aze i sinteze DNK u proksimalnim tubulima i stvaranje slobodnih kiseoničkih radikala udruženo sa povećanom lipidnom peroksidacijom uzrokuje nefrotoksičnost (Dhodi i sar., 2015). U manjoj meri prisutno je oštećenje distalnih i sabirnih tubula (Randelović, 2013).

Veliki endocitozni kompleks, koga čine megalin i kubilin, ograničen je na proksimalne tubule. On prenosi gentamicin, i aminoglikozide uopšte, endocitozom (Schmitz i sar., 2002), nakon čega ih akumulira u lizozomima, Goldžijevom aparatu i endoplazminom retikulumu (Lopez-Novoa i sar., 2011). Gentamicin se vezuje za membranu fosfolipida, menjajući njihov metabolizam i obrt i izaziva fosfolipidozu. Lizozomalna fosfolipidoza nastaje usled smanjenja negativnog naelektrisanja potrebnog za ispravnu funkciju fosfolipida i inhibiciju A1, A2 i C1 fosfolipaza. Usled inhibicija lizozomalnih fosfolipaza dolazi do taloženja fosfolipida i stvaranja lizozomalnih mijeloidnih tela, za koje se smatra da predstavljaju direktan mehanizam nefrotoksičnosti (Laurent i sar., 1982; Lopez-Novoa i sar., 2011). Fosfolipidoza je direktno proporcionalna nivou toksičnosti aminoglikozida (Laurent i sar., 1990; Lopez-Novoa i sar., 2011). Nađeno je da agensi koji štite od fosfolipidoze, kao što je poliaspartična kiselina, takođe sprečavaju aminoglikozidnu nefrotoksičnost (Swan i sar., 1991).

Kada koncentracija aminoglikozida u endozomima pređe još uvek neodređeni prag, njihova membrana prska i njihov sadržaj, zajedno sa lekom se izliva u citosol. Gentamicin u citosolu deluje direktno i indirektno na mitohondrije, aktivira pri tom unutrašnji put apoptoze, prekida respiratorni lanac, oštećuje stvaranje ATP-a i stvara oksidativni stres za ćeliju, povećavajući nivo superoksidnih anjona i hidroksilnih radikala što dalje ubrzava ćelijsku smrt. Indirektan mitohondrijski efekat je povezan sa povećanjem nivoa Bax-a preko sprečavanja njegove razgradnje u proteazomima. Sami lizozomi takođe sadrže veoma jake proteaze i katepsine koji mogu da izazovu ćelijsku smrt po tipu apoptoze (Chwieralski i sar., 2006). U velikim

količinama, i naročito u nedostatku ATP-a, kaspaze izazivaju ćelijsku smrt po tipu nekroze (Goldstein i Kroemer, 2007; Lopez-Novoa i sar., 2011).

Gentamicin ometa sintezu proteina u endoplazminom retikulumu, remeti preciznost translacije i posttranslacione modifikacije proteina. To izaziva pogrešno stvaranje proteina, što ukoliko se stalno ponavlja dovodi do apoptoze (Peyrou i sar., 2007).

Izmena u polarnosti tubulocita i intraćelijskoj raspodeli proteina koji transportuju jone su glavne molekulske posledice akutnog oštećenja bubrega i intraćelijskog trošenja energije (Tavafi, 2013). Gentamicin oštećuje funkciju Na-K ATP-aze (Lopez-Novoa i sar., 2011) što dovodi do oticanja ćelije sa mogućim prskanjem, i opet, nastanka apoptoze ili nekroze. Već posle samo 30 minuta od prodiranja gentamicina u bubreg, ili 3 sata posle njegovog davanja pacovima, dolazi do nedovoljne reapsorpcije kalcijuma i magnezijuma sa posledičnom hiperkalciurijom, hipermagneziurijom i hipomagnezijemijom, čak i pre bilo kakvih izmena u bubrežnom preuzimanju Na i K i bilo kakvih vidljivih znakova bubrežnog oštećenja. Gentamicin se za svoj transport preko megalin-kubilin endocitnog kompleksa u proksimalnim tubulima takmiči sa proteinima, katjonima i ostalim molekulima što remeti njihovu reapsorpciju (Nagai i sar., 2002; Nagai i sar., 2006).

Prosipanje tkivnih i ćelijskih ostataka u lumen tubula dovodi do delimične ili potpune opstrukcije tubula (Neugarten i sar., 1983; Rivas-Cabanero i sar., 1993). Opstrukcija tubula smanjuje ili čak u potpunosti uništava ekskretornu funkciju zahvaćenih nefrona. Uz to, povećan hidrostatski pritisak unutar tubula i Boumanove kapsule smanjuje glomerulsku filtraciju i ekskreciju proizvoda filtracije.

Oštećenje tubula dovodi do poremećaja reapsorpcije što doprema ogromnu količinu vode i elektrolita u distalni deo nefrona i aktivira mehanizam tubuloglomerulske povratne sprege (TGP). TGP sprema se odvija da bi sprečio masivni gubitak vode i elektrolita, a nju aktivira smanjena glomerulska filtracija koja stimuliše renin-angiotenzin-aldostetron (RAA) sistem. Međutim, sam mehanizam TGP sprege se adaptira unutar perioda od 1 do 24 sata, iako glomerulska filtracija nastavlja da opada (Lopez-Novoa i sar., 2011).

Glomerulski efekti

Gentamicinom uzrokovana nekroza tubula može da smanji broj funkcionalnih nefrona sa posledičnim smanjenjem intenziteta glomerulske filtracije. Ovo može da dovede do višestrukih adaptivnih procesa praćenih povećanjem funkcije ostalih nefrona, od kojih je najupečatljivija izmena brojnih transportnih mehanizama unutar tubula, uključujući povećanu reapsorpciju natrijuma i sekreciju kalijuma (Martinez-Salgado i sar., 2007).

Supstance koje prolaze kroz bubrege prvo dolaze u kontakt sa glomerulom. Gentamicin remeti glomerulsku filtraciju (Dos Santos i sar., 1991) kontrakcijom mezangijalnih ćelija (Martinez-Salgado i sar., 2007) i smanjenjem koeficijenta filtracije (Kf). Takođe, u isto vreme stimuliše proliferaciju mezangijalnih ćelija i ubrzava njihovu apoptozu, na neki način poništavajući ta dva procesa (Martinez-Salgado i sar., 2005; Martinez-Salgado i sar., 2007). Iako se glavne morfološke promene usled dejstva gentamicina vide na tubulu, pri davanju velikih doza dolazi i do blagog uvećanja glomerula, izmene njihovog ovalnog oblika i gustine, difuznog oticanja filtracione barijere sa infiltracijom neutrofila (Stojiljkovic i sar., 2008) i gubitka njene selektivnosti usled oštećenja negativnog naelektrisanja (De-Barros-e-Silva i sar., 1992). Sve to dovodi do proteinurije.

Gentamicin smanjuje broj i veličinu pora na fenestrama endotelnih ćelija glomerula (Lopez-Novoa i sar., 2011). Ovaj efekat nastaje kao posledica kontrakcije mezangijalnih ćelija. Mezangijalne ćelije se kontrahuju: aktiviranjem trombocitnog faktora aktivacije (PAF), renin-angiotenzin-aldosteron (RAA) sistema i vazokonstriktora kao što su endotelin-1 i tromboksan A2 usled oštećenja endotela. Povećanje oksidativnog stresa u ćeliji takođe daje svoj doprinos (Martinez-Salgado i sar., 2007).

Gentamicin povećava koncentraciju kalcijuma u ćelijama stimulacijom Ca^{2+} senzitivnih receptora (CaSR), što se smatra jednim od uzroka proliferacije mezangijalnih ćelija. Proliferacija je posredovana kalcijum zavisnom AP-1 aktivacijom (Lopez-Novoa i sar., 2011).

Zbog istovremene apoptoze i proliferacije mezangijalnih ćelija, nema izmene u broju istih. Apoptoza je posredovana povećanim oksidativnim stresom i prekomernom produkcijom NO (Martinez-Salgado i sar., 2007). Gentamicin stimuliše ekspresiju inducibilne NO sintetaze i samim tim stvaranje NO u izolovanim glomerulima i mezangijalnim ćelijama (Leung i sar.,

2004). Azot monoksid stvoren u ogromnim količinama naročito u uslovima oksidativnog stresa reaguje sa superoksidnim anjonom i stvara peroksinitrit što uzrokuje nitrozativni stres i citotoksičnost (Pedraza-Chaverri i sar., 2004).

Smatra se da je između uvećane proliferacije i apoptoze mezangijalnih ćelija, apoptoza primarni proces koji je praćen kompenzatornom proliferacijom usled održavanja homeostaze (Lopez-Novoa i sar., 2011).

Vaskularni efekti

Gentamicinom izazvani oksidativni stres stimuliše stvaranje vazoaktivnih medijatora koji mogu da menjaju funkciju bubrega bilo direktno, uzrokujući vazokonstrikciju unutar bubrega, ili smanjujući koeficijent filtracije unutar glomerulskih kapilara i samim tim stopu filtracije. Isti oksidativni stres može još i da ošteti ekspresiju endotelne NO sintetaze, dok superoksidni anjon može da veže sam NO, smanjujući time količinu edogenog vazodilatatora unutar krvnih sudova (Martinez-Salgado i sar., 2007; Silan i sar., 2007).

Gentamicin povećava otpor u krvnim sudovima bubrega i smanjuje perfuzioni pritisak, što za posledicu ima smanjenje protoka krvi kroz bubrege (Papanikolaou i sar., 1992; Valdivieslo i sar., 1999). Smanjeni protok krvi čini da glomerulska filtracija pada, umanjuje se dopremanje kiseonika i ATP-a u područje tubulskih ćelija i time favorizuje njihovo oštećenje. Protok krvi kroz bubrege se u početku smanjuje aktivacijom TGP sprege da bi se sprečio prekomerni gubitak tečnosti. Kasnije se protok progresivno smanjuje usled adaptacije same TGP sprege, stvaranjem vazokonstriktora i direktnim dejstvom gentamicina na ćelije krvnih sudova (Lopez-Novoa i sar., 2011).

Vazokonstriktori koji se pojačano stvaraju iz endotelnih i mezangijalnih ćelija usled dejstva gentamicina su: endotelin-1 (Valdivieslo i sar., 1999), PAF, tromboksan A2 i prostaglandini (Martinez-Salgado i sar., 1997). Oni imaju parakrino dejstvo na glatke mišiće krvnih sudova i izazivaju vazokonstrikciju. Pored toga što povećava stvaranje vazokonstriktora, gentamicin takođe smanjuje stvaranje vazodilatatora (Papanikolaou i sar., 1992). Pri niskim nivoima endotelna NO sintetaza uzrokuje vazodilataciju, a pri prekomernim nivoima, zbog prejake ekspresije inducibilne NO sintetaze, citotoksičnost okolnih ćelija. NO reaguje sa superoksidnim anjonom i stvara peroksinitrit koji uzrokuje oštećenje proteina i ćelija i čini da endotelna NO

sintetaza postane nefunkcionalni enzim koji sam stvara superoksidni anjon i doprinosi oksidativnom stresu unutar krvnih sudova (Forstermann, 2010).

Gentamicin takođe oštećuje sposobnost relaksacije glatkih mišića krvnih sudova što još više doprinosi vazokonstrukciji i smanjenju protoka unutar bubrega (Wickman i sar., 2001; Seçilmişi i sar., 2005).

Međutim, za gentamicin je takođe otkriveno da uzrokuje relaksaciju prethodno kontrahovanih arterija (Wickman i sar., 2001) preko inhibicije fosfolipaze C, protein kinaze C i kalcijumom izazvanih kontrakcija (Wickman i sar., 2001). Ovaj efekat se zapaža direktno na glatko mišićne ćelije i odigrava se uprkos tome što gentamicin sprečava oslobađanje endotel-zavisnog faktora relaksacije.

Najzad, u krvnim sudovima retine davanje gentamicina dovodi do marginacije leukocita, kongestije, začepljenja krvnih sudova i infakta posle samo 48 do 72 sata od terapije (Hines i sar., 1993). Pretpostavlja se da se začepljenje krvnih sudova i ishemija dešavaju i u bubregu, naročito pod jakim proinflamatornim uslovima, ali je potrebno još podataka da bi ovaj zaključak sa sigurnošću mogao da se izvede (Lopez-Novoa i sar., 2011).

Conway i sar. su još 1989. ispitivali toksične efekte gentamicina na krvne sudove retine primata, dajući majmunima dozu od 1000 do 3000 µg u staklasto telo. Posle samo 3 dana ova doza leka izazvala je infarkt makule i izrazito oštećenje unutrašnjih slojeva retine sa slabijim zahvatanjem spoljašnjih slojeva. Ovi nalazi ukazuju da je davanje gentamicina u staklasto telo bilo dovoljno da izazove potpuni prestanak lokalnog protoka krvi, verovatno mehanizmom začepljenja kapilara nakupljenim granulocitima. Pošto su se ovi efekti desili pri dozi znatno većoj od preporučene terapijske doze kod ljudi, ostaje da se utvrdi bezbedna doza koja se sme dati intravitrealno (Conway i sar., 1989).

Oksidativni stres i zapaljenje

Kiseonik je od vitalne važnosti za sve žive organizme, osim za striktne anaerobe. Ipak, paradoks aerobnog načina života je oksidativno oštećenje ključnih bioloških molekula, koje ugrožava strukturu i funkcionisanje živog organizma (Lobo i sar. 2010).

Dokazano je da gentamicin pojačano stvara ROS (superoksid anjon, hidroksilni radikali, vodonik peroksid) (Feyissa i sar., 2013), ali i slobodne azotne radikale (RNS) u bubregu koji dovode do lipidne peroksidacije (Upaganlawar i sar., 2006; El-Ashmawy i sar., 2006; Tavafi i sar., 2012; Dhodi i sar., 2015), oksidacije proteina u bubregu i njegovog oštećenja (Tavafi i Ahmadvand, 2011). Lipidna peroksidacija membrane tokom oksidativnog stresa dovodi do fragmentacije višestruko nezasićenih masnih kiselina, oslobađanja različitih aldehida i alkena, i ukoliko je ozbiljna, oštećenja integriteta ćelijske membrane (Pedraza-Chaverri i sar., 2004).

Subtoksični nivoi ROS imaju važnu fiziološku ulogu u biološkoj signalizaciji (npr. superoksid radikal je antibiotik izuzetno širokog spektra, medijator zapaljenja, transmitter signala i regulator genske ekspresije) (Lobo i sar., 2010).

Smatra se da oksidativni stres ima glavnu ulogu u gentamicinskoj nefrotoksičnosti (Nabavi i sar., 2012). Na taj zaključak navodi veliki broj već izvedenih eksperimenata u kojima je istovremeno davanje različitih antioksidanasa ublažavalo oštećenje bubrega izazvano gentamicinom (Morales i sar., 2002; Ali, 2003; Randjelovic i sar., 2012), iako klinički podaci nisu sasvim usaglašeni (Koyner i sar., 2008).

Gentamicin povećava stvaranje slobodnih kiseoničkih radikala (ROS) u mitohondrijama (Morales i sar., 2010) koji mogu da oštete razne strukture unutar ćelija kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline i dovedu do ćelijske smrti (Lopez-Novoa i sar., 2011; Randjelovic i sar., 2012). Oksidativno oštećenje ovih molekula dovodi do inaktivacije enzima, mutacija, pucanja membrana, povećanja aterogenosti LDL-a, disfunkcije mitohondrija i ćelijske smrti. Ovi toksični efekti kiseonika su uključeni u proces starenja i razvoj hroničnih, inflamatornih, degenerativnih i bolesti vezanih za starenje (McCord, 2000; Turrens, 2003). Oksidativni stres je uključen i u razvoj gotovo polovine svih humanih karcinoma, a utvrđena je veoma dobra korelacija antioksidativne i antimutagene aktivnosti (Yen i Chen, 1995). Gentamicin aktivira poli ADP riboznu polimerazu (PARP) u proksimalnim tubulima. U isto vreme on smanjuje efikasnost antioksidativnih enzima u bubregu kao što su: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPX) i glutation reduktaza (GSH) (El-Ashmawy i sar., 2006; Tavafi i Ahmadvand, 2011; Tavafi i sar., 2012).

Ishrana bogata voćem i povrćem odlaže procese starenja i smanjuje rizik nastanka različitih bolesti uslovljenih stilom života, pre svega kardiovaskularnih oboljenja i tumora, ali i ostalih

poremećaja u koje spadaju reumatoidni artritis, plućne bolesti, katarakta, Parkinsonova ili Alchajmerova bolest (Yin i sar., 2008; Szajdek i Borowska, 2008). Veruje se da su za ovaj zaštitni efekat na zdravlje zaslužni antioksidansi.

Antioksidansi se mogu podeliti na "endogene" (sastavni deo organizma) i "egzogene" (uneti hranom) (Lobo i sar., 2010). Biljke su bogat izvor antioksidanasa (Nabavi i sar., 2012), naročito zeleni čaj i borovnica koji su korišćeni u ovom eksperimentu.

U njihove sastojke se ubrajaju vitamin C i polifenoli u koje spadaju: antocijanini, fenolne kiseline, flavanoli, flavonoli i tanini. Poznati su kao prirodni antioksidansi i zbog svoje velike koncentracije i kvalitativne raznovrsnosti, hrana bogata njima se naziva prirodnom, funkcionalnom hranom. Bioraspoloživost ovih prirodno dostupnih supstanci značajno nadmašuje zdravstvene koristi koje nastaju uzimanjem odgovarajućih suplemenata u doziranim farmaceutskim oblicima (Szajdek i Borowska, 2008).

Slobodni radikali, stvoreni gentamicinom, takođe doprinose kontrakciji mezangijskih ćelija, krvnih sudova i razvoju zapaljenja (Lopez-Novoa i sar., 2011; Bae i sar., 2013). Sam zapaljenski odgovor izazvan gentamicinom na početku nastaje kao odbrambeni mehanizam, ali na kraju i sam doprinosi napredovanju bubrežnog oštećenja. Ovo zapaljenje se karakteriše infiltracijom monocita/makrofaga i miofibroblasta. Makrofagi koji infiltrišu intersticijum tubula mogu da oslobađaju proinflamatorne hemoatraktante, dovodeći do nastanka začaranog kruga. Oni takođe stvaraju profibrotske citokine kao što je transformišući faktor rasta B1 (TGF B1), koji igra ključnu ulogu u progresivnoj fibrozi bubrega (Bae i sar., 2013). Pored toga, *in vitro* studije su pokazale da aktivacija puta ekstracelularne signalom-regulisane kinaze (ERK) takođe igra ključnu ulogu u proliferaciji tubulocita i miofibroblasta. Ipak tačna uloga ovog puta u progresivnom oštećenju bubrega ostaje da se utvrdi (Bae i sar., 2013). Nađeno je da mehanizmi koji štite od oštećenja bubrega izazvanog gentamicinom zapravo sprečavaju zapaljenski odgovor (Bledsoe i sar., 2006; Sue i sar., 2009).

To što ROS učestvuju u stvaranju zapaljenja objašnjava zašto su antioksidansi toliko efikasni u ublažavanju bubrežnog oštećenja izazvanog gentamicinom. Smatra se da oksidativni stres značajno doprinosi razvoju i pogoršanju svih inflamatornih oboljenja (Lobo i sar., 2010). ROS aktiviraju nuklearni faktor kB (NF kB) koji započinje proces zapaljenja, izazivajući ekspresiju medijatora zapaljenja (Bae i sar., 2013) i iNOS (Pedraza-Chaverri i sar., 2004). Stvoreni NO može da reaguje sa superoksidnim anjonom i stvori peroksinitrit, veoma reaktivan molekul koji

doprinosi ćelijskom oštećenju i otežanoj relaksaciji krvnih sudova. Zaista, nađeno je da inhibitori nuklearnog faktora kB štite bubrege od gentamicinom uzrokovanog oštećenja (Lopez-Novoa i sar., 2011). Nekrozom izazvano oštećenje ćelija dovodi do nastanka zapaljenja. Jako zapaljenje dalje oštećuje tkivo, što ponovo dovodi do zapaljenja.

Zeleni čaj

Theae folium, Chamellia sinensis L. Kuntze, syn. Thea sinensis L., Theaceae

Čaj predstavlja drugi najpopularniji napitak na svetu, odmah posle vode (Chen i sar., 2015; Vergote i sar., 2002). Na osnovu viševjekovnog iskustva se tradicionalno koristi i kao lek (Wang i sar., 2012). Poslednjih decenija su efekti čaja na zdravlje u žiži naučnog interesovanja (Vergote i sar., 2002). Po engleskim istraživanjima koja su uključila preko 7000 odraslih osoba, preko 77% ispitanika redovno pije čaj, odnosno prosečno se konzumira 540 ml ili 2.3 šolje čaja dnevno. Veruje se da ima mogući medicinski značaj u sprečavanju i lečenju mnogih bolesti i da je dugovečnost (posebno azijskih naroda) često povezana sa navikama ljudi da piju čaj (Wang i sar., 2012).

Biljka čaj (biljna vrsta *Chamellia sinensis L. Kuntze, syn. Thea sinensis L.*, familije Theaceae) je visoki žbun koji raste u brdovitim, vlažnim oblastima Kine. Danas se gaji u tropskim i subtropskim predelima Azije, Evrope i Afrike. Listovi su kožasti, eliptični, naspramno raspoređeni; mladi listovi su dlakavi i testerasto nazubljenih ivica. U pazuhu listova se nalazi nekoliko mirisnih, belih cvetova. Plod je čaura sa tri semena. Drogu predstavljaju osušeni, još nerazvijeni listovi. U procesu proizvodnje vrši se njihovo odvajanje od razvijenih, grubljih listova čaja (Bruneton, 1999; Kovačević, 2002).

Na tržištu postoje 3 osnovne grupe čajeva koji se međusobno razlikuju po procesima obrade i posledično nastalim hemijskim sastojcima:

- zeleni (nefermentisani)
- ulong (polufermentisani) i
- crni (fermentisani) čaj (Kovačević, 2002).

Zeleni čaj se dobija stabilizacijom, brzim sušenjem i mašinskim zavijanjem listova čaja. Prirodne je, zelene boje, oporog ukusa i bez mirisa (Kovačević, 2002). Najviše se pije u Kini i

Japanu, ali postaje sve prihvaćeniji i u ostalim delovima sveta. Prva istraživanja o koristima zelenog čaja su izvedena u ovim zemljama zbog lokalnih običaja (Crespy i Williamson, 2004). Tu su do detalja opisane fiziološke aktivnosti sastojaka čaja. Ekstrakti zelenog čaja se koriste u terpijske svrhe i za izradu kozmetičkih preparata.

Za proizvodnju crnog čaja, posle branja i selekcije, listovi se ostave da svenu, uvijaju se, gnječe i fermentiraju tokom nekoliko sati. Zatim se suše u struji toplog vazduha. To izaziva oksidaciju polifenola što daje konačnu, crnu boju. Tokom fermentacije deluju različiti enzimi i dolazi do promene boje, mirisa, ukusa, arome i sastava čaja. Formira se mala količina smolastog, etarskog ulja koje daje lepu aromu čaju. Sastojci ulja nastaju transformacijom karotenoida i nezasićenih masnih kiselina (Kovačević, 2002; Wang i sar., 2012; Chen i sar., 2015).

List čaja sadrži 2-4% kofeina i malu količinu drugih purinskih derivata. Pored toga, u njemu ima i do 30% različitih polifenolnih sastojaka, u koje spadaju složena mešavina fenolkarbonskih kiselina (hlorogenska, kafena i galna kiselina) i galotanin. Nefermentisani list sadrži do 20% proteina, 5% šećera, vitamin C i vitamine B kompleksa (Bruneton, 1999; Kovačević, 2002).

Esencijalni polifenoli u hrani su flavonoidi i tanini. Nalaze se u velikim količinama u voću i povrću i imaju snažnu antioksidativnu sposobnost. Zeleni čaj predstavlja izuzetno bogat izvor prirodnih polifenola i zbog toga se smatra da ima koristan učinak na jetru, serum i centralni nervni sistem (CNS). Najznačajniji među njima su: katehin (C), epikatehin (EC), epikatehin-3-galat (ECG), epigalokatehin (EGC), epigalokatehin-3-galat (EGCG) i galokatehingalat (GCG). Najzastupljeniji katehin u zelenom čaju je EGCG i čini 30-50% ukupnog katehinskog sadržaja (Vergote i sar., 2002; Chen i sar., 2015). Polifenoli su poznati antioksidansi sposobni da vezuju slobodne radikale i heliraju metale, ali ispoljavaju i antikancersku i antimutagenu aktivnost (Vergote i sar., 2002; Elhalwagy i sar., 2008). Pokazuju zaštitno dejstvo protiv čitavog spektra slobodnih radikala kao što su: superoksidni anjon i peroksinitrit. Zeleni čaj povećava aktivnost antioksidativnih enzima u jetri (kao što je glutathion peroksidaza) ali i sadržaj redukovanog glutathiona i ukupni antioksidativni status (TAS) organizma. Polifenoli zelenog čaja imaju 20 puta jaču antioksidativnu aktivnost od vitamina C (Elhalwagy i sar., 2008).

Dokazano je da EGCG poseduje jaku antiinflamatornu i antiproliferativnu aktivnost kojom inhibiše ćelijski rast i uzrokuje apoptozu raznih humanih kancerskih ćelija sa malim ili nikakvim efektom na normalne ćelije (Syed i sar., 2007). Za apoptozu nastalu pod dejstvom EGCG je utvrđeno da je posredovana stvaranjem vodonik peroksida i inhibicijom transkripcionog faktora

NFkB. Za drugi polifenol zelenog čaja, EGC se dokazalo da inhibiše rast MCF-7 ćelija raka dojke. I ovaj katehin inhibiše isključivo rast ćelija kancera dojke, bez ikakvih efekata na normalne epitelne ćelije dojke. Do inhibicije rasta kancerskih ćelija dolazi usled indukcije apoptoze Fas-zavisnim mehanizmom, bez ikakve promene u napredovanju ćelijskog ciklusa (Vergote i sar., 2002). Epigalokatehin štiti od hemijskih karcinogena u različitim organima kao što su creva, pluća, jetra, prostata i dojka. Oralno davanje zelenog čaja smanjuje ukupnu tumorsku masu, kao i incidenciju displazije i karcinoma usne duplje (Crespy i Williamson, 2004).

Mnoge *in vitro* studije o katehinima su usaglašene u stavu da oni štite od nastanka degenerativnih bolesti. Međutim, većina ovih studija koristi toliko visoke doze katehina koje se ne podudaraju sa uobičajenim koncentracijama katehina u ljudskoj ili životinjskoj plazmi. Jako je teško ekstrapolirati ove rezultate u *in vivo* istraživanjima. Štaviše, negalonizovani katehini su prisutni u plazmi u konjugovanom obliku, osim EGC i EC koji su nekonjugovani. Zbog nepostojanja konjugovanih formi kao standarda ili komponenti testa, nije moguće *in vitro* testirati njihove biološke efekte. Zbog toga su studije na životinjama mnogo značajnije u proučavanju fizioloških efekata katehina (Crespy i Williamson, 2004).

Katehini zelenog čaja utiču različitim putevima na metabolizam masti i sprečavaju nastanak aterosklerotskog plaka. Unos zelenog čaja smanjuje apsorpciju triglicerida i holesterola i povećava ekskreciju masti. Sam mehanizam još uvek nije utvrđen. Neke studije tvrde da katehini zelenog čaja smanjuju ukupni holesterol i trigliceride u krvi, ali se efekti razlikuju između studija. Ta razlika bi mogla biti zbog različitih životinjskih modela koji su korišćeni (pacovi, miševi, kunići). Holesterol se smanjuje samo kada je unos zelenog čaja u opsegu visokih doza (veći od 0.5% ishrane). Ovo ukazuje da se efekat na holesterol odigrava samo pri visokim dozama. Sve u svemu, zeleni čaj smanjuje LDL, povećava HDL, odnosno ima antiaterosklerotsko dejstvo. Ovaj efekat je potvrđen i na miševima koji nemaju apolipoprotein. Sveukupni rezultati pokazuju da dugoročna upotreba katehina zelenog čaja u ishrani može da bude korisna u suzbijanju gojaznosti izazvane visokim sadržajem masti u ishrani, preko izmene metabolizma masti. Time zeleni čaj smanjuje rizik nastanka udruženih bolesti, kao što su dijabetes i koronarne bolesti (Crespy i Williamson, 2004).

U zdravom bubregu je ujednačeno stvaranje tromboksana A2 (TXA2) i prostaciklina I2 (PGI2), čime se održava homeostaza *in vivo*. Izmena tog odnosa ubrzava trombogenezu u bubrežnim

tubulima, povećavajući rizik za nastanak oštećenja funkcije i nastanka ateroskleroze. Stvaranje ovih supstanci zavisi od aktivnosti fosfolipaze A2 i sastava masnih kiselina (Crespy i Williamson, 2004). Kako gentamicin povećava stvaranje TXA2, unošenje zelenog čaja bi moglo da smanji njegovu sintezu i poveća sintezu PGI2. Funkcija bubrega narušena gentamicinom bi mogla da se poboljša katehinima zelenog čaja pošto oni ispoljavaju antitrombogenu aktivnost koja menja kaskadni sistem arahidonske kiseline, inhibiše fosfolipazu A2 i ciklooksigenazu. To bi sve zajedno moglo da poboljša narušene glomerulske i vaskularne efekte izazvane gentamicinom.

Katehini u čaju mogu da utiču na apsorpciju gvožđa, naročito kod osoba sa sideropenijskom anemijom. Uzimanje zelenog čaja tokom dužeg vremenskog perioda ne utiče na apsorpciju bakra, dok apsorpciju cinka smanjuje, a magnezijuma povećava. Ipak, unos katehina ne utiče na koncentraciju ovih jona u plazmi. Katehini zelenog čaja imaju sposobnost da utiču na apsorpciju i metabolizam jona zato što flavonoidi interaguju sa različitim jonima metala (Crespy i Williamson, 2004). Međutim, Wang i sar. (2012) su otkrili da davanje ogromnih doza ekstrakta zelenog čaja (5000 mg/kg/dnevno) tokom 91 dana smanjuje nivo kalcijuma u serumu pacova. To je objašnjeno činjenicom da prekomerni unos zelenog čaja dovodi do hepatotoksičnosti i depozicije kalcijuma (Wang i sar., 2012).

Dugotrajan unos zelenog čaja povećava aktivnost UDP-glukuronil transferase (UDP-GT) kod pacova i posle apsorpcije katehini se metabolišu enzimima za metabolizam lekova u različitim organima. Smatra se da povećana aktivnost UDP-GT doprinosi antikarcinogenom efektu zelenog čaja time što olakšava prelazak hemijskih karcinogena u neaktivne metabolite koji se lako izbacuju iz organizma (Crespy i Williamson, 2004).

U velikoj dozi (5% ishrane koja traje 13 nedelja) ekstrakt zelenog čaja izaziva uvećanje štitne žlezde (strumu) u normalnih pacova. Ova visoka doza je takođe izmenila nivo tireoidnih hormona u plazmi pacova. Međutim, korišćenje čak i velike količine zelenog čaja u ishrani ljudi teško da bi moglo da izazove takve efekte (Crespy i Williamson, 2004). Epigalokatehin-3-galat takođe pokazuje slabu embriotoksičnost kod ranog izlaganja embriona (Wang i sar., 2012).

Velike količine zelenog čaja se potroše u svakodnevnom životu za izradu napitaka. Jedna šolja napitka zelenog čaja sadrži od 30 do 400 mg polifenola (Bruneton, 1999). Stariji listovi čaja i grančice se koriste za ekstrakciju alkaloida (kofeina), ali i za dobijanje kompleksa tanina zelenog čaja. Danas je ekstrakt zelenog čaja veoma popularan. Pored potvrđenog antioksidativnog dejstva,

pokazano je da ima zaštitni efekat na krvne sudove, koristi se kod blagih dijareja, funkcionalne astenije, kao dopuna programima gubitka telesne mase i kao diuretik. U kozmetičkim preparatima deluje emolijentno i smanjuje perutanje i deskvamaciju površinskih slojeva kože (Kovačević, 2002).

Borovnica

Myrtilli fructus, Vaccinium myrtillus L., Vacciniaceae

Biljka borovnica (vrsta *Vaccinium myrtillus* L. Familije *Vacciniaceae*) je listopadni žbunić. Donji delovi su odrveneli, a vršni deo je zeljast. Listovi su eliptični, zašiljeni na vrhu, testerastog oboda i svetlo zelene boje. U pazuhu listova nalaze se pojedinačni cvetovi, bleдозелene do ružičaste boje. Plod je sočna, višesemena bobica, tamno ljubičaste boje, prekrivena voštanom prevlakom. Raste u visokoplaninskom regionu, po obodu šuma i proplancima (Kovačević, 2002). Botanička definicija bobičastog voća se razlikuje od definicije prosečnog potrošača na tržištu. U botaničkoj nomenklaturi termin bobičasto je sočno voće koje proizvodi jedan plodnik. U uobičajenom govoru “bobica” se koristi da se opiše bilo koja vrsta sitnog jestivog voća, obično sočnog i okruglog oblika, koje može da ima semenke unutar tkiva, slatkog do kiselkastog ukusa i različitog stepena prebojavanja (Joseph i sar., 2014).

Novije epidemiološke studije ukazuju da ishrana bogata voćem i povrćem poboljšava zdravlje, odlaže procese starenja i smanjuje rizik od različitih bolesti koje se povezuju sa stilom života, poput kardiovaskularnih bolesti i tumora (Szajdek i Borowska, 2008; Joseph i sar., 2014). Takva ishrana može takođe biti korisna u prevenciji zapaljenja i nekih hroničnih bolesti, kao što su dijabetes i degenerativne bolesti (Paredes-Lopez i sar., 2010; Joseph i sar., 2014).

Zapaljenje je glavni faktor koji doprinosi nastanku ovih bolesti. Višak telesnih masti, naročito centralna gojaznost udružena je sa perzistentnim niskim stepenom zapaljenja. Konzumiranje obroka koji su tipični za zapadni način ishrane, a to su obroci bogati energijom koji sadrže višak ugljenih hidrata i masti, uzrokuju akutni zapaljenski stres kod pojedinaca sa preporučenom, kao i kod onih sa povećanom telesnom masom. Nasuprot tome, populacione studije ukazuju da je ishrana bogata voćem i povrćem obrnuto povezana sa zapaljenskim stresom (Joseph i sar., 2014). Postoje podaci koji pokazuju da su zdravstvene koristi voća i povrća uzrokovane njihovim antioksidativnim sastojcima kao što su flavonoidi, vitamini i minerali. Veruje se da ovi sastojci

ispoljavaju svoje zaštitne efekte tako što sprečavaju slobodne radikale da izazovu oštećenje proteina, lipida i nukleinskih kiselina (Vardi i sar., 2013). Poslednjih godina, zdravstvene koristi polifenola su privukle pažnju istraživača, indistrije hrane i šire javnosti što dokazuje povećan broj publikacija i nagli porast tržišta funkcionalne hrane (Joseph i sar., 2014).

Plod borovnice se vekovima koristi kao hrana i zbog svoje visoke hranljive vrednosti danas predstavlja prirodni delikates (Valentova i sar., 2007). Predstavlja naročito bogat izvor antioksidanasa, kao što su antocijani, fenolne kiseline, flavanoli, flavonoli i tanini. Ova jedinjenja su poznata kao prirodni antioksidansi. Antocijani se nalaze uglavnom u spoljašnjim slojevima hipoderma ploda (kora), dok su unutrašnjem tkivu voća prisutni u maloj količini ili nisu prisutni uopšte. Oni se u ćelijama nalaze u vakuolama u formi granula (Szajdek i Borowska, 2008).

Antocijani su grupa hidrosolubilnih pigmenata koji borovnici daju tamno-ljubičastu boju (Joseph i sar., 2014). Njihovo ime potiče od grčkih reči *anthos* (cvet) i *kyanos* (plav). Pojam antocijan označava heterozide, a antocijanidini su aglikonske komponente. Lako dolazi do razlaganja njihove strukture, tako da je procedura ekstrakcije, izolacije i hemijske karakterizacije jako otežana. Određivanje ovih pigmenata se vrši spektrofotometrijski ili metodom tečne hromatografije (Kovačević, 2002).

Antocijani su u biljnom tkivu obojeni samo u kiseloj sredini. Mnogi antocijani u potpunosti razvijaju boju tek u okviru kompleksa sa flavonodima i odgovarajućim metalnim jonima (Kovačević, 2002). Tokom poslednjih 20 godina, su u fokusu istraživanja zbog svojih pozitivnih efekata po zdravlje. Količina antocijana koja se unosi umnogome se razlikuje u zavisnosti od regiona, godišnjeg doba, kao i kod pojedinaca sa različitim socijalnim, kulturološkim i obrazovnim statusom. Procenjeno je da je prosečan unos antocijana u Francuskoj 57 mg, a u Finskoj 47 mg/dan. Od ukupnih antocijana koji se unesu u toku dana, 70% potiče od voća. Jabuke su najčešće konzumirano voće, ali obezbeđuju samo 8% ukupnog unosa antocijana putem voća. Nasuprot njima, borovnice su znatno ređe konzumirano voće, ali obezbeđuju 56% voćem unetih antocijana (Joseph i sar., 2014). Visok unos antocijana može se obezbediti redovnom konzumacijom borovnica, kao voća koje je najbogatije njima, u odnosu na ostale bobice (Fang, 2015). Amerikanci trenutno konzumiraju oko polovine dnevne preporučene doze voća i po istim podacima, raznolikost voća koje unose, naročito onog prebojenog crvenom, plavom i ljubičastom bojom je ograničena (Joseph i sar., 2014).

Najzastupljeniji antocijanidini borovnice su cijanidin, delphinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin i malvidin, a njihovim povezivanjem sa šećerima nastaju antocijani (koji su najčešće O-heterozidi) (Kovačević, 2002). Antocijani se karakterišu po prisustvu oksonijum jona na C prstenu i intenzivnoj prebojenosti (Joseph i sar., 2014; Veberic i sar., 2015). Različiti spoljašnji i unutrašnji uslovi utiču na količinu i sastav antocijana u borovnici. Oni uključuju genetsku različitost, kao i mnoge faktore spoljašnje sredine u koje spadaju jačina svetlosti, vlažnost, temperatura, korišćenje đubriva i pesticida, postojanje rana i infekcija i ostali faktori stresa. Zbog klimatskih uslova sveža borovnica je dostupna samo u nekim mesecima ili nedeljama tokom sezone. U borovnici antocijani počinju da se pojavljuju na početku sazrevanja, kada aktivnost enzima fenilpropanoidnog puta počinje da raste i nastavlja da se povećava tokom sazrevanja voća, zajedno sa antocijanima. Zbog njihove velike količine i kvalitativne raznovrsnosti, za borovnicu postoje podaci da ispoljava mnogobrojne biološke efekte u koje spadaju antikarcinogeni, antiinflamatorni i antimikrobni efekat (Paredes-Lopez i sar., 2010). Kako ima brojne korisne efekte, borovnica se ubraja u funkcionalnu hranu (Szajdek i Borowska, 2008; Može i sar., 2011).

V. corymbosum je najčešća vrsta borovnice koja se gaji. Plod je krupniji, ali antocijana ima samo u spoljašnjem delu perikarpa. U svakom pogledu je plod ove vrste manje kvalitetan, i kao voće i kao terapijsko sredstvo. *V. vitis-idaea* i *V. uliginosum* su samonikle vrste, rasprostranjene kod nas. Plodovi su im manje ukusni, a po boji i obliku se lako razlikuju od prave borovnice (Kovačević, 2002).

Prethodna istraživanja otkrila su povezanost između antocijana i smanjene učestalosti kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i tumora. Takođe, studije hrane su pokazale poboljšane kliničke i biomedicinske indekse kod pacijenata sa različitim zdravstvenim poremećajima koji su unosili voće bogato antocijanima (Joseph i sar., 2014; Fang, 2015). Ima podataka da metaboliti fenolne kiseline doprinose efektima koje antocijani pokazuju na zdravlje, zato što neki od njih ispoljavaju antioksidativno, antiinflamatorno i ostala povoljna dejstva (Fang, 2015). Zato je jedan od ciljeva ovog istraživanja da naglasi važnost upotrebe borovnice u svakodnevnoj ishrani u cilju sprečavanja različitih bolesti.

Fenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti biljaka, nastaju u sekundarnom metabolizmu koji je direktan nastavak primarnog metabolizma i upotpunjuju funkcionisanje organizma koji ih

sintetiše (Kovačević, 2002). Oni štite biljku od raznih nepovoljnih faktora koji bi mogli da ugroze njen opstanak, kao što su suša, UV zračenje, infekcije ili fizičko oštećenje. Borovnice koje rastu u hladnoj klimi sa kratkim periodom vegetacije, bez đubriva i pesticida se odlikuju većim sadržajem polifenola od onih koje rastu u blažoj klimi (Szajdek i Borowska, 2008).

Veruje se da fenolna jedinjenja štite komponente borovnice koje lako oksidišu. Ona inhibišu oksidaciju vitamina C, karotenoida i nezasićenih masnih kiselina. Flavonoidi inhibišu lipidnu oksidaciju, heliraju metale i vezuju aktivne oblike kiseonika (Heim i sar., 2002, Szajdek i Borowska, 2008). Antocijani inhibišu oksidaciju humanih LDL i lipozoma i vezuju slobodne radikale. Oni štite vitamin C od oksidacije. U grupi fenolnih kiselina, derivati cimetine kiseline, kao što su kafena kiselina, hlorogena kiselina, ferulna kiselina i *p*-kumarinska kiselina su mnogo jači antioksidansi od derivata benzoeve kiseline, kao što su *p*-hidroksibenzoeva i vanilična kiselina (Zheng i Wang, 2003). Meyer i sar. (1998) su pokazali da su derivati hidroksicimetine kiseline sposobni da inhibišu LDL oksidaciju *in vitro*. U grupi fenolnih jedinjenja tanini se karakterišu naročito visokom antioksidantnom moći. Derivati elagične kiseline i kondenzovani tanini imaju mnogo veću sposobnost vezivanja slobodnih radikala nego vitamin C, E i polifenoli male molekulske mase (Szajdek i Borowska, 2008).

Sam vitamin C u borovnici ometa početak i dalje odvijanje oksidacionog procesa, odlaže proces oksidacije LDL frakcije holesterola izazvan bakrom i neutrališe veliki broj slobodnih radikala u vodenoj sredini. Uključen je u proces detoksifikacije zagađivača vazuha, kao što su ozon, NO₂ i slobodni radikali u dimu cigareta. Zbog velike koncentracije polifenola u borovnici, udeo samog vitamina C u njenoj antioksidantnoj aktivnosti je prilično mali i ne prelazi 15% (Wang i sar., 1996, Szajdek i Borowska, 2008). Pored svojih antioksidantnih osobina, vitamin C učestvuje u sintezi kolagena, neurotransmitera i hormona. Olakšava apsorpciju gvožđa koje nije u hem obliku, jača imunitet i neutrališe razne karcinogene i mutagene koje se nalaze u digestivnom traktu ili koje dospevaju u digestivni trakt putem hrane (Szajdek i Borowska, 2008).

Sastojci borovnice imaju povoljno dejstvo i na cirkulatorni sistem. Antocijani poboljšavaju elastičnost i permeabilnost kapilara očne jabučice, a samim tim i kretanje krvi i vid tokom sumraka i noći. Zahvaljujući ovoj osobini, antocijani borovnice se koriste u pripremi oftalmoloških preparata (Canter i Ernst, 2004). Zbog svojih bioloških aktivnosti, fenolna jedinjenja borovnice se takođe koriste i kao prirodni lekovi u terapiji brojnih bolesti kao što su

poremećaji cirkulatornog, respiratornog, digestivnog i urinarnog sistema (Szajdek i Borowska, 2008).

Uglavnom su istraživanja o borovnicama fokusirana na njihove antioksidativne sposobnosti. Borovnice i njihovi ekstrakti pokazuju jako *in vitro* antioksidativno dejstvo. Već je dokazano da polifenoli, uključujući i antocijane imaju antioksidativnu aktivnost. Međutim, neke studije ukazuju da su njihovi *in vivo* efekti izazvani ne antioksidativnim nego antiinflamatornim osobinama (Szajdek i Borowska, 2008).

CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

- utvrđivanje moguće uloge oksidativnog stresa u nastanku nefrotoksičnosti pod dejstvom gentamicina
- utvrđivanje sastava ekstrakata lista zelenog čaja i ploda borovnice spektrofotometrijskom metodom i/ili HPLC DAD metodom
- *in vitro* procena antioksidativne aktivnosti ekstrakata
- biohemijsko ispitivanje veličine promena markera oksidativnog stresa i antioksidativnih markera kod svih eksperimentalnih grupa pacova
- procena morfoloških promena u buregu životinja tretiranih samo gentamicinom, u odnosu na one koje su dobijale ekstrakte lista zelenog čaja ili ploda borovnice
- procena promena ureje i kreatinina u krvi životinja koje su tretirane gentamicinom, u odnosu na one koje su dobijale ekstrakt zelenog čaja ili borovnice
- upoređivanje morfoloških promena bubrega sa biohemijskim promenama u krvi i promenama markera oksidativnog stresa kod svih eksperimentalnih grupa pacova
- ispitivanje da li unos zelenog čaja i borovnice putem ishrane može da ima zaštitni efekat na gentamicinsku nefrotoksičnost

MATERIJAL I METODE

Ekstrakcija biljnog materijala

Zeleni čaj

Uzorak zelenog čaja ("Institut za proučavanje lekovitog bilja Dr Josif Pančić, Pančevo") kupljen je u lokalnoj apoteci. Osušen biljni materijal je usitnjavao do konzistencije grubog praška (*pulvis grossus*), sito 0.75 po farmakopeji Ph. 7.0 (Pharmacopoeia, 2011) (otvor ivice sita 0.75 mm), neposredno pred ekstrakciju.

Ekstrakcija je vršena postupkom perkolacije korišćenjem 70% (v/v) etanola. Usitnjen čaj je dobro izmešan sa delom rastvarača za ekstrakciju i ostavljen da stoji određeno vreme. Smeša je prenet u perkolator i omogućen je spor perkolacioni protok na sobnoj temperaturi, koji obezbeđuje da čaj bude ekstrahovan tako što je uvek prekriven slojem preostalog rastvarača za ekstrakciju. Ostatak iz perkolatora je ispresovan i dobijena tečnost je sjedinjena sa perkolatom. Etanolni ekstrakt je dobijen uparavanjem pod sniženim pritiskom (pomoću vakuum uparivača na temperaturi do 45° C), do suva i dobijen prinos je bio 33%. Suvi ekstrakt (nakon utvrđivanja prinosa) je prenet i do analize čuvan u dobro zatvorenim posudicama u frižideru.

Borovnica

Potpuno zrele divlje borovnice su ubrane jula 2011. u šumama Koroške i Škofje u Sloveniji. Čuvane su nedelju dana na -20° C i onda je pripremljen ekstrakt. Ekstrakcija je izvršena po modifikovanoj metodi koju su opisali Može i sar. (2011). 600 g smrznutih borovnica prvo je homogenizovano u 2 l ledeno hladnog deoksigenizovanog metanola, koji je prethodno nekoliko minuta ispiran azotom. Homogenat je ekstrahovan 1 h mešanjem magnetskom mešalicom IKA REO Basic C (Königswinter, Nemačka) na sobnoj temperature. Nakon toga ekstrakt je filtriran vakuumom kroz tehnički filter papir. Ostatak je ponovo ekstrahovan u jednom litru ledeno hladnog deoksigenizovanog metanola tokom pola sata i suspenzija je filtrirana kao i ranije. I treći put je ekstrakcija ponovljena po prethodno opisanom načinu. Najzad su sva 3 uzorka filtrata spojena, isprana azotom par minuta i čuvana na -20 °C pre analize. Za *in vivo* ispitivanje suvi ekstrakt je dobijen uparavanjem vakuumom na 40 °C i rastvoren u destilovanoj vodi pre nego što je oralno davan pacovima.

Određivanje sastojaka ekstrakta

Određivanje ukupnih polifenola i tanina

Folin-Ciocalteu (F-C) ispitivanje se decenijama koristi za određivanje ukupnih fenola u prirodnim proizvodima ali, pošto se bazira na činjenici da su fenoli redukujući agensi i u osnovi je oksido-redukciona reakcija, može se smatrati i antioksidativnom metodom. Originalna F-C metoda je razvijena još davne 1927. godine za analizu tirozina, pri čemu oksidacija fenola molibdotungstatom daje obojene proizvode sa maksimumom apsorpcije na 745-750 nm.

Metoda je jednostavna, osetljiva i precizna. Međutim, reakcija je spora na niskoj pH i nedostaje joj specifičnost. Modifikacijom metode i korišćenjem molibdotungstofosfornog heteropolianjonskog reagensa postiže se specifičnija redukcija fenola a λ_{max} proizvoda je 765 nm. Takođe su uvedeni obavezni koraci koji obezbeđuju dobijanje pouzdanih i reproduktivnih podataka: odgovarajući odnos zapremina baze i F-C reagensa, optimalno reakciono vreme i temperatura za razvoj boje, merenje na talasnoj dužini od 765 nm i korišćenje galne kiseline kao referentnog standardnog fenola (Prior i sar., 2005).

Svi tanini su fenoli ali nisu svi fenoli tanini. F-C određivanje (Makkar i sar., 2000) se može izvesti uz korišćenje nerastvornog matriksa (kao delimično hemijsko ali delimično i fizičko određivanje), polivinil polipirolidona (PVPP), da bi se odredio sadržaj tanina pošto PVPP vezuje tanine. Razlika ukupnih i ne-taninskih polifenola predstavlja sadržaj tanina (Makkar i sar., 2005).

Kao standard za izradu kalibracione krive se može koristiti katehin ili galna kiselina, pa se rezultati obično izražavaju kao ekvivalenti katehina ili galne kiseline (g ekvivalent na 100g suve materije) ili kao % polifenola (ili tanina) u suvom uzorku (Makkar i sar., 2000, Surveswaran i sar., 2007).

Postupak:

Sadržaj ukupnih fenola se izračunava pomoću kalibracione krive katehin standarda ili standarda galne kiseline i izražava u mg katehinskih ekvivalenata po gramu ekstrakta (CE)/g ili mg galne kiseline (GA)/ml uzorka (Makkar i sar., 2000).

Određivanje ukupnih tanina:

Tanini se vezuju na nerastvorni PVPP. Odmeri se 100 mg PVPP u epruvetu, doda 1 ml destilovane vode i 1 ml uzorka (100 mg PVPP je dovoljno da veže 2 mg tanina, ako je sadržaj tanina već i od 10 %, uzorak se mora razblažiti) i dobro promućka. Nakon 15 minuta na 4 °C smeša se ponovo promućka, a zatim centrifugira (10 minuta na 3000 obrtaja/min). U supernatantu se nalaze sva fenolna jedinjenja izuzev tanina (tanini su se vezali za PVPP – a još bolje vezivanje tanina za PVPP se postiže na pH 3) pa se on koristi za određivanje ne-taninskih polifenola po istom postupku za određivanje ukupnih polifenola. Međutim, pošto se početni uzorak razblažuje 1:1 vodom i kako u supernatantu nema više tanina, preporučuje se da se za ispitivanje koristi dva ili tri puta veća zapremina uzorka. Sadržaj ne-taninskih polifenola se izražava takođe u mg katehinskih ekvivalenata po gramu ekstrakta (CE)/g ili mg galne kiseline (GA)/ml uzorka a iz razlike koja se dobija u odnosu na sadržaj ukupnih polifenola izraženih u istim jedinicama (Makkar i sar., 2000).

Određivanje flavonoida

Spektrofotometrijskim određivanjem po metodi sa aluminijum hloridom koju su opisali Lamaison i Carnat (1990) se određuju ukupni flavonoidi, a rezultat se izražava kao mg ekvivalenata rutina po gramu uzorka (mg Ru/g; prosečna vrednost 5 proba ± standardna greška). Kvantifikacija se vrši korišćenjem standardne kalibracione krive sa rutinom (koncentracioni opseg 1-5 µg/ml) tretiranim na isti način.

Određivanje fenilpropanoida

Sadržaj ukupnih fenilpropanoida se može odrediti spektrofotometrijski, metodom po Arnou-u koja se zasniva na reakciji derivata o-dihidroksicimetne kiseline sa natrijum molibdatom. Sadržaj fenilpropanoida se izražava kao sadržaj odgovarajućeg derivata hidroksicimetne kiseline (Didry i sar., 1999). Postupak određivanja fenilpropanoida u nekim drogama daje Ph. Eur. 7.0. (2011) U monografiji droge *Fraxini folium* spektrofotometrijski određen sadržaj fenilpropanoida se izražava kao % hlorogenske kiseline.

Apsorbancija uzoraka se meri uz slepu probu na 525 nm, uzimajući da je vrednost specifične apsorbcije hlorogenske kiseline 188, a sadržaj fenilpropanoida se izražava kao sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline, prema formuli:

$$\text{hlorogenska kiselina (\%)} = A \times 5,3 / m$$

A = apsorpcija na 525 nm

m = masa droge u gramima (European Pharmacopeia 7.0, 2011).

Određivanje antocijana

Sadržaj ukupnih antocijana u soku borovnice je određivan prema propisu iz monografije svežeg ploda borovnice *Myrtilli fructus recens* iz sedme evropske Farmakopeje (Ph Eur 7.0, 2011). Absorbanca test rastvora je merena na 528 nm uz 0.1% (v/v) rastvora HCl u metanolu kao slepu probu. Sadržaj antocijana u procentima je izražen kao cijanidin-3-glukozid hlorid i izračunat iz jednačine:

$$A \times 5000 / 718 \times M$$

gde je 718 specifična absorbanca cijanidin-3-glukozid hlorida na 528 nm, A je absorbanca na 528 nm, a M je masa supstance koja je ispitivana u gramima.

HPLC analiza

Najviše korišćena analitička separaciona tehnika danas je HPLC, a razlog za njenu popularnost je velika osetljivost, mogućnost kvantitativnog određivanja i izdvajanja neisparljivih i termolabilnih supstanci. Kvantifikacija se može vršiti na više načina: analizom koja se bazira na visini ili površini pika, kalibracijom uz standard, metodom internog standarda ili metodom normalizacije površine.

HPLC analiza je izvedena na instrumentu Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) opremljenom binarnom pumpom G1312A, Gemini C18 kolonom (150 × 2.00, 3 μm), zaštićenim Gemini C18 Security Guard ketridžom (4.0 × 2.0 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) i fotodiodnim detektorom G1315B.

Antocijani ekstrakta borovnice su kvantifikovani po metodi koju su opisali Može i sar. (2011).

Mobilna faza se sastojala od 3% mravlje kiseline (A) i smeše acetonitril:metanol (85:15; v:v) (B). Antocijani su izdvajani na 40 °C sledećim koracima: 0-2 min, 7-9% B; 2-4 min, 9-11% B; 4-12 min, 11-12% B; 12-13 min, 12% B; 13-25 min, 12-13% B; 25-40 min, 13-100% B. Protok mobilne faze je bio 0.250 ml/min od 0 do 4 min, 0.225 ml/min od 4 do 13 min i 0.200 ml/min od 13 do 40 min, što je obezbedilo bolje odvajanje po metodi koju su opisali Može i sar. (2011). Injekcioni volumen je bio 10 µL. Kvantifikovanje pojedinačnih antocijana je izračunato tako što je cijanidin 3-glukozid korišćen kao spoljašnji standard iz kalibracione krive u opsegu od 0.5 mg/l do 45 mg/l. Sadržaj je izražen u µg standarda ekvivalenta cijanidin 3-glukozida po 1 l ekstrakta. Svaki uzorak je analiziran u 3 ponavljanja. Standardna kalibraciona kriva bila je linearna sa korelacionim koeficijentom 0.9983. Granica detekcije, kvantifikacije i ponovljivosti je određena prema propisu koji su dali Može i sar. (2011).

***In vitro* utvrđivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata**

DPPH metoda

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikal je jedan od par stabilnih organskih azotnih radikala (široko se koristi u studijama antioksidativne aktivnosti pojedinačnih supstanci, biljnih ekstrakata, hrane i sl.), komercijalno je dostupan a odlikuje se tamno ljubičastom bojom. Metoda se bazira na redukciji alkoholnog rastvora DPPH[•] na 517 nm u prisustvu antioksidanta (AH), uz formiranje ne-radikalskog oblika DPPH-H i smanjenje apsorbance – obezbojavanje DPPH[•] koje se prati spektrofotometrijski (Koleva i sar., 2002). Preostali DPPH[•], izmeren nakon određenog vremena, je obrnuto srazmeran sposobnosti antioksidanta da uklanja radikale. Osetljivost metode se zasniva na snažnoj apsorpciji DPPH[•].

Koncentracija koja snižava početnu koncentraciju DPPH[•] za 50% se definiše kao IC₅₀.

Brza i jednostavna DPPH metoda ne zahteva skupe reagense i opremu i veoma je korisna u traženju novih antioksidanata u fitohemijskim ispitivanjima. Pozitivne strane su i to što hidrofилnost/lipofилnost uzorka ne utiče na aktivnost uklanjanja DPPH radikala i što se reakcija odvija na sobnoj temperaturi pa se eliminiše rizik od termalne degradacije testiranih molekula (Bondet i sar., 1997; Koleva i sar., 2002).

Nakon odvijanja reakcije (tokom 30 minuta u mraku) apsorbancija se očitava na 540 nm u odnosu na korišćeni rastvarač (metanol ili etanol) kao slepu probu. Paralelno se pipetira i očitava i kontrola koja sadrži samo rastvarač i reagens. Izračunavanje procenta neutralizacije slobodnog radikala se vrši na osnovu jednačine:

$$\% = (A_k - A_a) / A_k \times 100$$

A_k = apsorbanca kontrole

A_a = apsorbanca analize

Sposobnost neutralizacije slobodnog radikala se može odrediti na osnovu vrednosti IC_{50} , odnosno koncentracije ekstrakta koja uklanja (neutrališe) 50% stabilnog DPPH radikala iz rastvora (Cuendet i sar., 1997).

Test inhibicije lipidne peroksidacije u lipozomima

LP oksidacija se javlja kada kiseonik reaguje sa lipidima u seriji slobodnoradikalskih lančanih reakcija koje vode složenim hemijskim promenama. Oksidacija lipida hrane narušava njen kvalitet. *In vivo*, LP može učestvovati u razvoju koronarnih oboljenja, ateroskleroze, kancera i starenja (Fukumoto i Mazza, 2000).

Razlaganje lipidnih peroksida ubrzano jonima gvožđa ili bakra ili zagrevanjem (npr. korišćenje oksidisanih ulja za kuvanje) daje složenu smešu toksičnih proizvoda, uključujući epokside, zasićene aldehide, nezasićene aldehide, ketone i ugljovodonike kao što su etan i pentan. Posebno toksični aldehidi su malonildialdehid – MDA (nastaje peroksidacijom iz linolenske, arahidonske ili dokozaheksanoične kiseline) i 4-hidroksinonenal (nastaje iz peroksida linolenske i arahidonske kiseline). Oba se intenzivno vezuju za membranske proteine, inaktivirajući enzime i receptore, a mogu napasti i DNK i stvoriti mutagene lezije (Halliwell, 2006).

Postojanje LP se može utvrditi ukoliko se pri zagrevanju uzorka (hrana, biološko tkivo ili tečnost) sa 2-tiobarbiturnom kiselinom – TBA (thiobarbituric acid) u kiseloj sredini razvije jasna ružičasta boja. Supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom – TBARS (Thiobarbituric Acid Reacting Substances) su sekundarni proizvodi LP; to su uglavnom aldehidi, pri čemu je najzastupljeniji upravo toksični MDA (Gutteridge i Halliwell, 2000; Pinelo i sar., 2005).

Određivanje intenziteta LP u prisustvu kiseoničnih slobodnih radikala se često koristi u medicinskim i biološkim istraživanjima. Metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta na

osnovu sposobnosti inhibicije LP se zasnivana na merenju nivoa TBARS u Fentonovoj reakciji, pri čemu se detektuje neenzimska autooksidacija. Fe(II)-EDTA kompleks u vodenom rastvoru polako daje O₂- koji brzo prelazi u H₂O₂ na pH 7,4 a H₂O₂ interaguje sa Fe²⁺ i formira OH u prisustvu askorbinske kiseline kao katalizatora.

Slobodni radikal OH napada nezasićene lipide membrane i gradi MDA, koji se može detektovati na osnovu osobine da reaguje sa TBA i formira ružičasti hromogen.

Uloga askorbata je da redukuje Fe³⁺ u Fe²⁺ i na taj način favorizuje Fentonovu reakciju.

Količina MDA je srazmerna odigranoj LP. U reakciji MDA sa TBA nastaje kompleks koji se može određivati spektrofotometrijski, pa se LP u uzorku može proceniti na osnovu proizvodnje TBARS (Ranjbar i sar., 2006; Caillet i sar., 2007).

Postupak:

Apsorbancija se očitava na 533 nm.

Istovremeno se radi i kontrola u 3 ponavljanja (ona sadrži sve reagense sem ekstrakta), kao i slepa proba (sadrži pufer, liposome i rastvarač u kome je rastvaran ekstrakt). Rezultati se izražavaju kao IC₅₀ vrednosti, odnosno koncentracije ekstrakta koje inhibiraju za 50% lipidnu peroksidaciju u lipozomima. Izračunavanje:

$$\text{nmol (MDA)/g} = A \times 32.54 \times \text{razblaženje}$$

Inhibicija LP se određuje iz razlike apsorbance uzorka i kontrole prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - A \times 100 / K$$

A = apsorbance analize

K = apsorbance kontrole (Štajner, 1990).

Eksperimentalne životinje

Za ovaj eksperiment izabrani su Wistar albino pacovi, oba pola, telesne mase 200-350 g. Životinje su uzgajane na Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu. Čuvane su u dobro provetреноj prostoriji pod dobro kontrolisanim uslovima spoljašnje sredine. Bile su smeštene u čistim, polikarbonskim kavezima uz dvanaestočasovni dnevno-noćni ciklus, na temperaturi od 20 ± 2 °C. Voda za piće i hrana specijalno prilagođena glodarima bili su im dostupni *ad libitum*. Sve eksperimentalne procedure su izvedene u skladu sa Helsinškom deklaracijom i po uputstvima Evropske Unije za etičko postupanje sa laboratorijskim životinjama (86/609/EEC). Odobrenje je takođe dobijeno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu i zavedeno pod brojem 01-2625-8.

Eksperimentalna procedura

Nakon adaptacionog perioda od 7 dana, sve eksperimentalne životinje su nasumično podeljene u 6 grupa. Svaku grupu je činilo po 8 životinja.

1. Prvih 8 životinja služile su kao kontrola (C grupa) i primale 1 ml fiziološkog rastvora dnevno tokom 15 dana.
2. GT grupa oralno je primala 300 mg/kg TT etanolni ekstrakt lista zelenog čaja preko intragastrične sonde tokom 15 dana eksperimenta.
3. Treća grupa pacova (GT+GM grupa) je dobijala oralno etanolni ekstrakt lista zelenog čaja tokom 15 dana i tokom poslednjih 8 dana eksperimenta zajedno sa njim i gentamicin intraperitonealno u dozi od 100 mg/kg TT.
4. Četvrta grupa uzimala je oralno ekstrakt ploda borovnice (100 mg/kg TT) tokom 15 dana.
5. Peta grupa je uzimala ekstrakt borovnice tokom svih 15 dana eksperimenta i pored toga, poslednjih 8 dana eksperimenta zajedno sa borovnicom intraperitonealno i gentamicin.
6. Šesta grupa životinja je primala intraperitonealno gentamicin tokom poslednjih 8 dana eksperimenta.

Dan nakon primanja poslednje doze, sve životinje su bile anestetizirane ketaminom (Ketamidol 10%, Richter Pharma AG, Wels, Austria) i žrtvovane. Neposredno nakon žrtvovanja uzeto im je 2 ml krvi iz aorte za biohemijske analize. Tkivo bubrega svake eksperimentalne životinje je podeljeno na dva dela, za biohemijske analize i svetlosno mikroskopsko ispitivanje.

Biohemijske analize

Određivana je koncentracija biohemijskih parametara akutne bubrežne insuficijencije, ureje i kreatinina, iz krvi pacova. Analiza je vršena uz pomoć automatskog biohemijskog analizatora (A25 biosystems, Barselona, Španija) u laboratoriji Klinike za nefrologiju KC u Nišu.

Za određivanje parametara oksidativnog stresa tkivo bubrega isečeno je na male komade i homogenizovano u ledenoj vodi pomoću homogenizatora (IKA® Works do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, Brazil). 10% (w/v) homogenati su centrifugirani na 1500 x g na 4 °C kako bi se uklonio ćelijski debri. Supernatant je čuvan na -20 °C pre nego što su urađene biohemijske analize.

Proteini su određivani metodom po Lowry-ju (Lowry, 1951) uz upotrebu govedeg serumskog albumina kao standarda.

***In vivo* procena lipidne peroksidacije (MDA)**

Intenzitet lipidne peroksidacije u tkivu bubrega određen je spektrofotometrijski, na osnovu reakcije sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA) (Ohkhawa, 1979). Nivo malondialdehida (MDA) u serumu procenjen je kao krajnji proizvod i *in vivo* marker lipidne peroksidacije. Apsorpcija homogenata je merena na 532 nm. Koncentracija MDA je izražena kao $\mu\text{mol/mg}$ proteina po homogenatu.

***In vivo* procena oksidacije proteina (AOPP)**

Određivana je koncentracija AOPP, kao marker oksidativno izmenjenih proteina i pratećeg zapaljenja. Spektrofotometrijski metod je baziran na reakciji AOPP sa kalijum jodidom u kiselom medijumu. Intenzitet boje snimljen je na 340 nm. Vrednosti su izražene kao $\mu\text{mol/mg}$ proteina (Witko-Sarsat i sar., 1996).

***In vivo* procena aktivnosti katalaze (CAT)**

Tkivna katalaza (CAT), kao *in vivo* antioksidativni marker merena je po metodi koju je opisao Goth (1991). Ova metoda je zasnovana na sposobnosti katalaze da rastvori substrat (H_2O_2), pri čemu se enzimska reakcija zaustavlja dodavanjem amonijum molibdata. Žuti kompleks molibdata i H_2O_2 meren je na 405 nm i enzimska aktivnost je izražena u katalitičkim jedinicama po gramu proteina (kU/g).

Histopatološka ispitivanja

Za strukturna ispitivanja tkiva bubrega, komadići bubrega svih životinja su neposredno nakon žrtvovanja fiksirani u 10% puferisanom formaldehidu. Nakon fiksacije, tkiva su kalupljena u parafinu i sečena uz pomoć rotacionog mikrotoma pri čemu je debljina isečka iznosila 5 μm . Dobijeni isecci su bojeni sledećim histološkim metodama bojenja:

1. Hematoksilin-eozin metoda za proučavanje morfoloških promena bubrega
 2. Perjodna kiselina - Šifovo bojenje (PAS) histochemijska metoda za utvrđivanje sadržaja glikogena
 3. JONES bojenje (srebro metenamin) za bojenje bazalnih membrana tubula i kapilara glomerula
- Za pregled svih preparata korišćen je svetlosni mikroskop Leica DMR (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Nemačka).

Morfometrijska analiza

Nakon što su bubrezi pacova histološki obrađeni, zabeležene su njihove digitalne slike primenom kamere povezane sa prethodno navedenim svetlosnim mikroskopom. Za kvantifikaciju promena utvrđenih histološkom analizom izvršena je morfometrijska analiza glomerula, proksimalnih i distalnih tubula i jedara intersticijskih ćelija bubrega. Ova analiza je izvršena primenom kompjuterskih programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Pre svake analize izvršena je prostorna kalibracija korišćenjem objektnog mikrometra. Iz svake eksperimentalne grupe analizirane su 4 nasumično izabrane životinje i njihovi tkivni preparati bili su bojeni PAS metodom. Mereni morfometrijski parametri uključuju: površinu glomerula (μm^2), površinu proksimalnih i distalnih tubula (μm^2), površinu jedara intersticijskih ćelija (μm^2) i cirkularnost jedara intersticijskih ćelija. Kod svake životinje analizirano je 50 glomerula, proksimalnih i distalnih tubula i 100 jedara intersticijskih ćelija.

Za analizu glomerula korišćeni su preparati bojeni PAS metodom i slikani pod uvećanjem objektiva 20 puta. Analizom su bili obuhvaćeni svi uočeni glomeruli na 10 ili više, po principu slučajnog izbora odabranih vidnih polja po jednom slučaju, sve dok ukupan broj analiziranih glomerula ne dostigne 50.

Za analizu proksimalnih i distalnih tubula korišćeno je uvećanje 40 puta. Analiza je uključivala 10 ili više, po principu slučajnog izbora odabranih vidnih polja, sve dok ukupan broj analiziranih

i proksimalnih i distalnih tubula ne dostigne 50. Merena je površina tubulskog epitela. Analizom su bili obuhvaćeni samo tubuli čije se granice jasno vide.

Morfometrijska analiza jedara intersticijskih ćelija vršena je na PAS preparatima pod uvećanjem objektiva 40 puta, na ukupno odabranih 10 vidnih polja. Na svakom vidnom polju analizirano je 10 nasumično odabranih jedara (ukupno 100 jedara po životinji). Merena je njihova površina i celularnost.

Statistička analiza

Za statističku analizu podataka korišćen je kompjuterski program Graph Pad Prism 5.03 San Diego, Kalifornija, SAD. Statistička obrada svih podataka izvršena je izračunavanjem srednjih vredosti i standardne devijacije. Statistička značajnost je utvrđena jednosmernom analizom varijanse (ANOVA) i post hoc Tukey testom. Kao statistički značajne uzimane su statističke vrednosti verovatnoće $p < 0.05$.

Sva eksperimentalna istraživanja obavljena su na Institutu za fiziologiju, histologiju, biohemiju i Institutu za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Nišu.

REZULTATI

Određivanje sastojaka ekstrakta

Značajne količine fenolnih jedinjenja nađene su u ekstraktima lista zelenog čaja i ploda borovnice.

Ekstrakt lista zelenog čaja

U ekstraktu zelenog čaja izmeren je ukupni sadržaj polifenola od 313.26 ± 4.42 mg katehinskih ekvivalenata po gramu ekstrakta (CE)/g. Ukupan sadržaj flavonoida bio je 35.46 ± 0.46 mg ekvivalenata rutina po gramu ekstrakta (Ru)/g, a tanina 274.96 ± 4.01 mg katehinskih ekvivalenata po gramu ekstrakta (CE)/g. Frakcija tanina predstavljala je skoro 88% ukupnih polifenolnih jedinjenja. Znatne količine fenilpropanoide nađene su u ekstraktu lista zelenog čaja. Njihova vrednost iznosila je $1.08 \pm 0.02\%$ hlorogenske kiseline (g CA/100g ekstrakta).

Ekstrakt ploda borovnice

Velike količine polifenolnih jedinjenja nađene su u ekstraktu ploda borovnice. Njihov izmeren sadržaj je iznosio 10677.08 ± 482.57 mg ekvivalenata galne kiseline na 100 grama tečne mase ekstrakta (mg GA/100 ml). Ukupan sadržaj tanina bio je 7294.63 ± 123.12 mg GA/100 ml ekstrakta. Znatne količine fenilpropanoide nađene su i u ekstraktu borovnice. Njihove vrednosti izražene su kao procenti hlorogenske kiseline i iznosile su $2.77 \pm 0.01 \%$ (g/100g). Ukupan izmeren sadržaj antocijana u ekstraktu borovnice je iznosio $1.1239 \pm 0.0071\%$ (g/100g).

Rezultati HPLC-DAD analize

Pojedinačni sadržaj antocijana određen je HPLC-DAD metodom uz pomoć linearne kalibracione krive (koeficijent korelacije = 0.9983) izraženih kao mg ekvivalenata cijanidin 3-glukozida na 100 g svežih borovnica (mg/100 g) i mg/l ekstrakta borovnice. Sveže borovnice koje su korišćene za pripremu ekstrakta su sadržale 980.3 ± 13.5 mg antocijana izraženih u ekvivalentima cijanidin 3-glukozida na 100 g tečne mase ekstrakta. Identifikovano je 15 antocijana – glikozida 5 antocijnidina: delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina. Detaljna analiza pojedinačnih antocijana u svežim borovnicama potvrdila je da su delfinidin i cijanidin najzastupljeniji (430.5 i 288.2 mg ekvivalenata cijanidin 3-glukozida/100 g tečnog ekstrakta. Sadržaj petunidina (121.2 mg/100 g), malvidina (93.4 mg /100 g) i peonidina (47.0

mg /100 gtečnog ekstrakta) je niži ali i dalje značajan. Sadržaj pojedinačnih antocijana prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Antocijani identifikovani u ekstraktu borovnice.

Antocijani	Koncentracija u ekstraktu mg/l	Masena koncentracija mg/100 g	Procenat %
1 delfinidin 3-galaktozid	692.0 ± 1.1	153.4 ± 0.3	15.6
2 delfinidin 3-glukozid	654.8 ± 1.5	145.1 ± 0.3	14.8
3 cijanidin 3-galaktozid	506.7 ± 1.6	112.3 ± 0.4	11.5
4 delfinidin 3-arabinozid	595.6 ± 1.7	132.0 ± 0.4	13.5
5 cijanidin 3-glukozid	495.5 ± 0.8	109.8 ± 0.2	11.2
6 petunidin 3-galaktozid	153.0 ± 1.0	33.9 ± 0.2	3.5
7 cijanidin 3-arabinozid	298.3 ± 0.4	66.1 ± 0.1	6.7
8 petunidin 3-glucozid	298.4 ± 7.7	66.1 ± 1.7	6.7
9 peonidin 3-galaktozid	38.6 ± 0.3	8.6 ± 0.1	0.9
10 petunidin 3-arabinozid	95.5 ± 0.4	21.2 ± 0.1	2.2
11 peonidin 3-glukozid	158.2 ± 0.3	35.1 ± 0.1	3.6
12 malvidin 3-galaktozid	88.2 ± 0.2	19.5 ± 0.0	2.0
13 peonidin 3-arabinozid	14.7 ± 0.1	3.3 ± 0.0	0.3
14 malvidin 3-glukozid	269.9 ± 0.8	59.8 ± 0.2	6.1
15 malvidin 3-arabinozid	63.5 ± 1.5	14.1 ± 0.3	1.4
<i>ukupno:</i>	<i>4422.8 ± 61.0</i>	<i>980.3 ± 13.5</i>	<i>100.0</i>

Rezultati *in vitro* određivanja antioksidativnog kapaciteta

Korišćene su 2 komplementarne test metode za preliminarni *in vitro* antioksidativni skrining ekstrakata zelenog čaja i borovnice: uklanjanje slobodnih radikala u DPPH testu i inhibicija lipidne peroksidacije u lipozomima. Izmerena antioksidativna aktivnost ekstrakta zelenog čaja bila je značajna: IC₅₀ vrednosti iznosile su 0.0103 ± 0.0049 µg/ml za DPPH test i 0.0870 ± 0.0015 µg/ml za test inhibicije lipidne peroksidacije u lipozomima. Vrednosti izmerene kod ekstrakta ploda borovnice su iznosile: 0.2019 ± 0.0076 mg/ml za DPPH test i 0.3320 ± 0.0149

mg/ml za test inhibicije lipidne peroksidacije. Kako niža IC_{50} vrednost predstavlja jači antioksidativni efekat, ovi *in vitro* rezultati ukazuju da je ekstrakt zelenog čaja snažniji antioksidans a oba ekstrakta su nešto aktivnija u uklanjanju slobodnih radikala, iako je i inhibicija lipidne peroksidacije u lizozomima znatna.

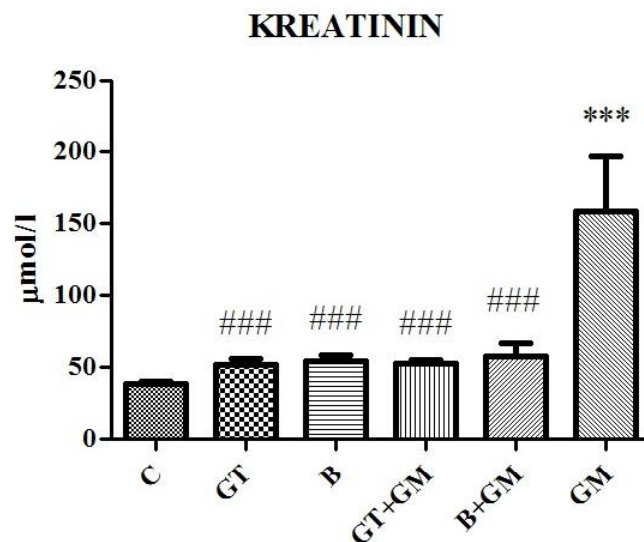
Rezultati biohemijskih analiza krvi

Primenom jednofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da se prosečne vrednosti koncentracija kreatinina i ureje statistički značajno razlikuju. Primenom Tukey-Kramer post hoc testa utvrđeno je da je prosečna vrednost kreatinina i ureje, markera akutne bubrežne insuficijencije, GM grupe statistički značajno viša ($p < 0.001$) od prosečne vrednosti kreatinina kontrolne grupe, što ukazuje na gentamicinom uzrokovanu nefrotoksičnost kod ovih pacova. Istovremena primena bilo ekstrakta zelenog čaja (GT+GM grupa) bilo borovnice (B+GM grupa) značajno je smanjila vrednosti ovih markera u poređenju sa grupom koja je primala samo gentamicin ($p < 0.001$). Nasuprot tome, kod životinja koje su uzimale samo ekstrakte (GT i B grupa), nije došlo do značajnih promena ovih parametara u odnosu na kontrolu (Slika 1 i Slika 2).

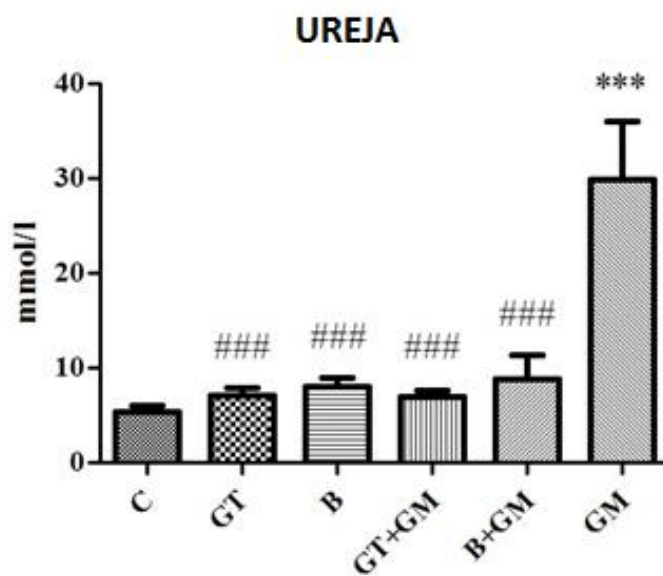
Rezultati analize markera oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u tkivu bubrega

Procena lipidne peroksidacije (MDA)

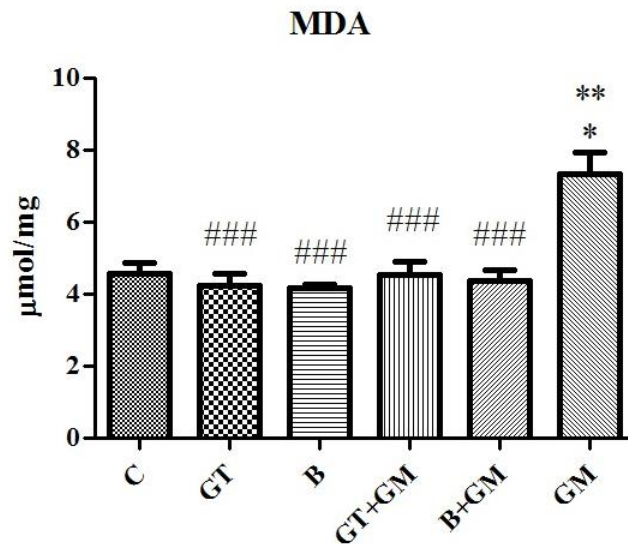
Kao parametar lipidne peroksidacije, analizirali smo nivo MDA, kao glavni i najviše proučavani proizvod peroksidacije nezasićenih masnih kiselina. Naši rezultati pokazuju značajno povećan nivo MDA u GM grupi u odnosu na kontrolnu grupu pacova ($p < 0.001$). Simultano davanje zelenog čaja i borovnice sa gentamicinom (GT+GM i B+GM grupa) smanjilo je lipidnu peroksidaciju, što je dokazano značajno nižim nivoom MDA u bubregu u odnosu na gentamicinsku grupu ($p < 0.001$). Rezultati su prikazani na Slici 3.



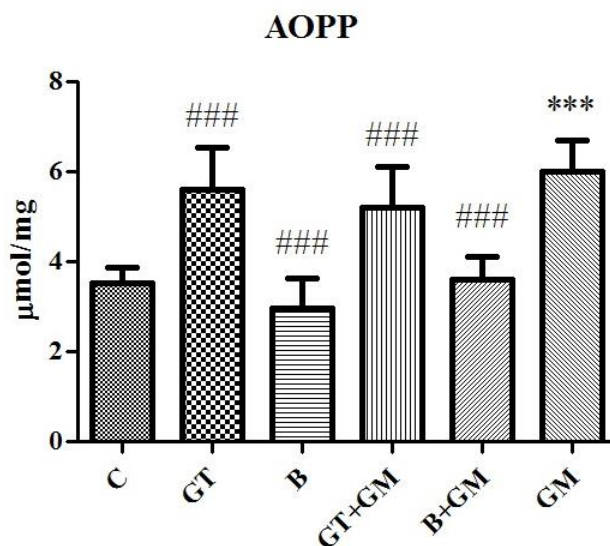
Slika 1. Rezultati serumskih koncentracija kreatinina ($\mu\text{mol/l}$) kontrolnih i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; *** — $p < 0.001$ vs. C, ### — $p < 0.001$ vs. GM.



Slika 2. Rezultati serumskih koncentracija ureje (mmol/l) kontrolnih i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; *** — $p < 0.001$ vs. C, ### — $p < 0.001$ vs. GM.



Slika 3. Rezultati serumskih koncentracija MDA ($\mu\text{mol/mg}$) kontrolnih i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; *** — $p < 0.001$ vs. C, ### — $p < 0.001$ vs. GM.

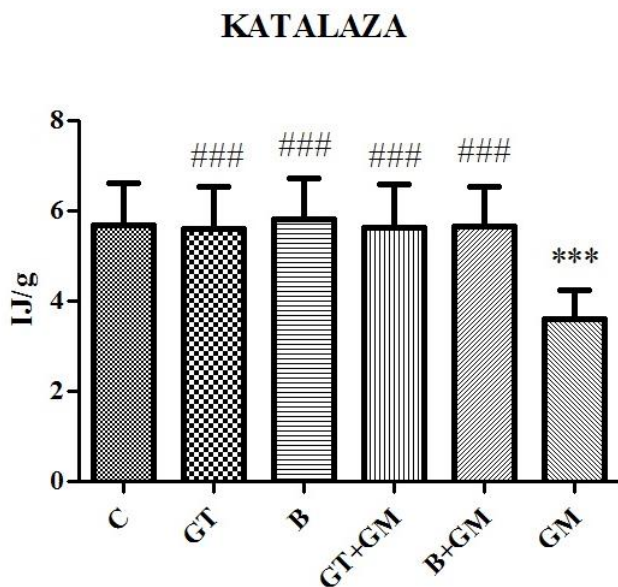


Slika 4. Rezultati serumskih koncentracija AOPP ($\mu\text{mol/mg}$) kontrolnih i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; *** — $p < 0.001$ vs. C, ### — $p < 0.001$ vs. GM.

Procena oksidacije proteina (AOPP)

Kako slobodni kiseonični radikali mogu da reaguju ne samo sa nezasićenim masnim kiselinama u ćelijskim mebranama, već i sa ćelijskim proteinima, kao marker oksidacije proteina koristili

smo AOPP. Slično MDA, vrednosti AOPP su bile značajno više kod pacova koji su primali samo gentamicin u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.001$). Istovremeno davanje ekstrakata zelenog čaja ili borovnice (GT+GM ili B+GM grupa) značajno je smanjilo AOPP nivo u poređenju sa grupom koja je tretirana isključivo gentamicinom ($p < 0.001$) i učinilo ga približnijim nivou u kontrolnoj grupi (Slika 4).



Slika 5. Rezultati serumskih koncentracija katalaze (IJ/g) kontrolnih i eksperimentalnih grupa pacova. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; *** — $p < 0.001$ vs. C, ### — $p < 0.001$ vs. GM.

Procena aktivnosti katalaze (CAT)

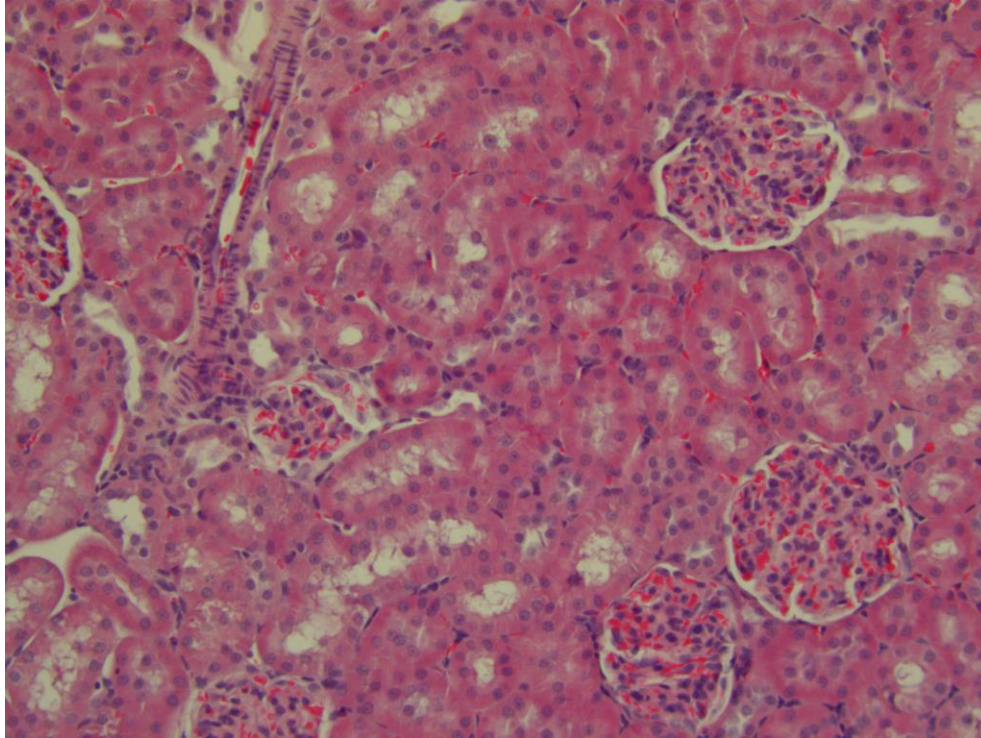
Katalaza, dobro poznat enzimski marker antioksidativne odbrane organizma, je takođe deo ovog istraživanja. Njeni nivoi su bili značajno sniženi u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0.001$). I grupe koje su primale isključivo ekstrakte (GT i B) i one koje su ih primale u kombinaciji sa gentamicinom (GT+GM i B+GM grupa) imale su značajno viši nivo katalaze u poređenju sa grupom koja je primala samo gentamicin ($p < 0.001$). Rezultati su prikazani na Slici 5.

Rezultati histološke analize

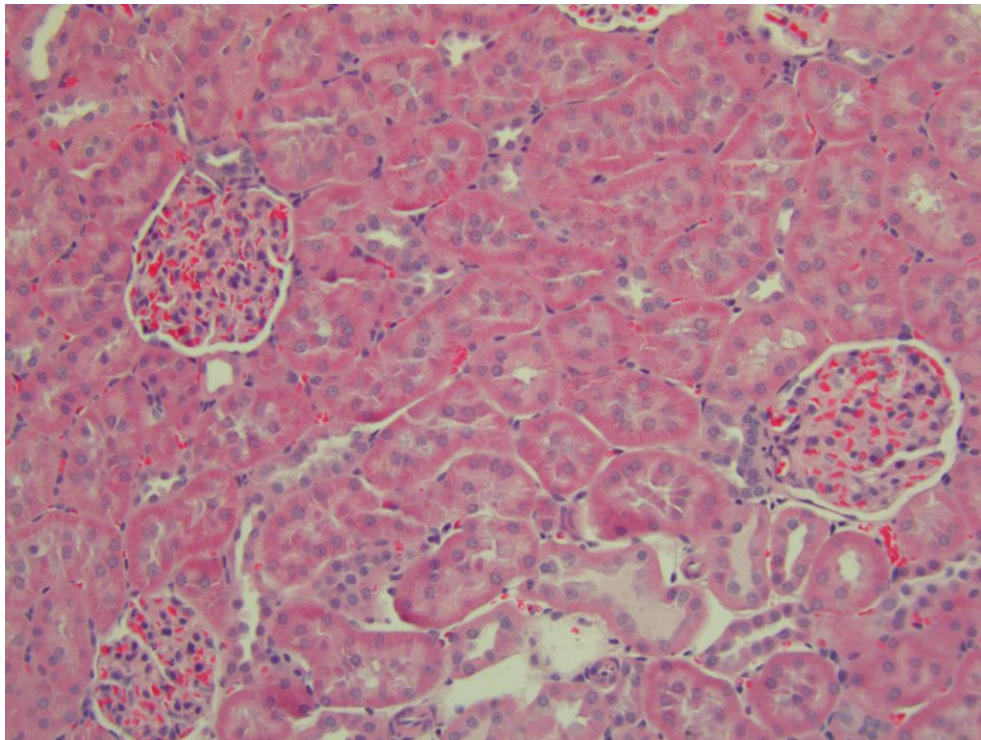
Mikroskopskim ispitivanjem tkiva bubrega kontrolne grupe (Slika 6), kao i grupa koje su primale ekstrakte (GT i B grupa) uočeni su normalni glomeruli okruženi kapsulom, kao i normalni proksimalni, distalni i sabirni kanali, bez ikakvih patoloških promena (Slike 7 i 8).

Primena gentamicina uzrokovala je znatno oštećenje bubrežne strukture i pokazala kongestiju glomerula, suženje Boumanog prostora i periglomerulsko zapaljenje u korteksu (Slike 11 i 17). Zabeležena je nekroza proksimalnih tubula zajedno sa vakuolarnom degeneracijom citoplazme. Štaviše, prisutno je povećano prisustvo PAS pozitivnih hijalinih cilindara i masivni mononuklearni zapaljenski infiltrat u intersticijumu. Na preparatima bojenim Jones metodom jasno se uočava da je bazalna membrana tubula u ovoj grupi često bila oštećena i prekinuta (Slika 23).

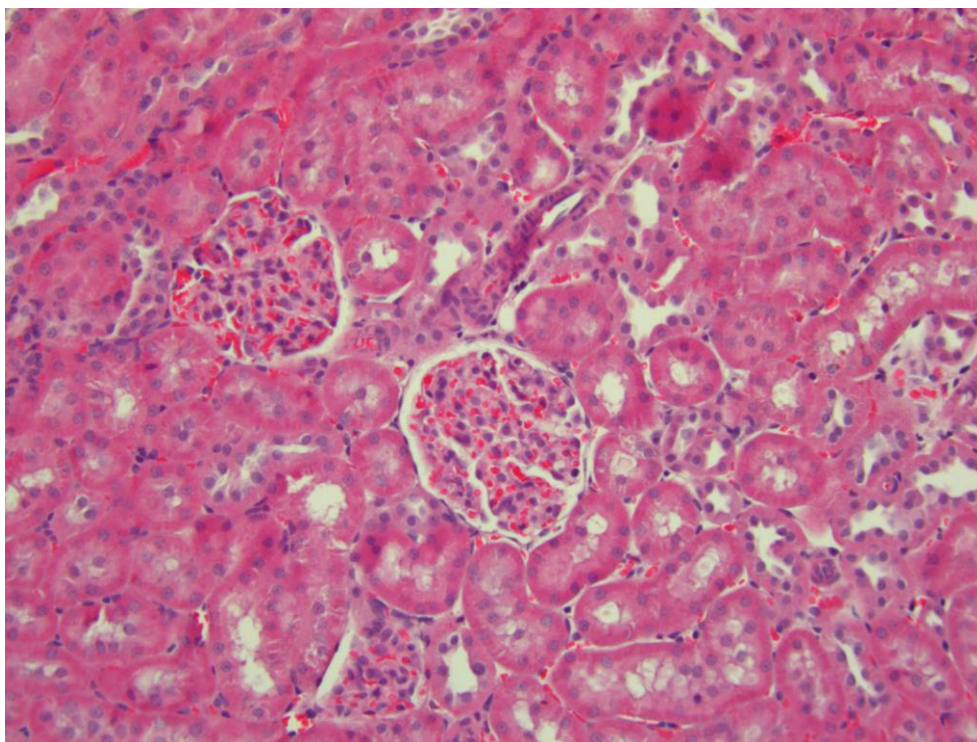
Kada se ekstrakti zelenog čaja i borovnice daju zajedno sa gentamicinom, većina patohistoloških promena se smanjila (Slike 9, 10, 15 i 16). Spoljašnji delovi bubrežnog korteksa bili su bez zapaljenja. Glomeruli su pokazali normalne konture, uz prisustvo blage kongestije. Ekstrakti zelenog čaja i borovnice sprečili su nekrozu proksimalnih tubula i pojavu hijalinih cilindara. Samo je zaostala tubulska degeneracija. Ekstrakt zelenog čaja uspeo je da svede gentamicinom izazvani masivni zapaljenski mononuklearni infiltrat na umeren nivo, dok je ekstrakt borovnice pokazao jači zaštitni efekat i isti sveo samo na blag nivo. Na preparatima bojenim Jones metodom jasno se uočava da je bazalna membrana tubula očuvana i bez oštećenja (Slike 21 i 22).



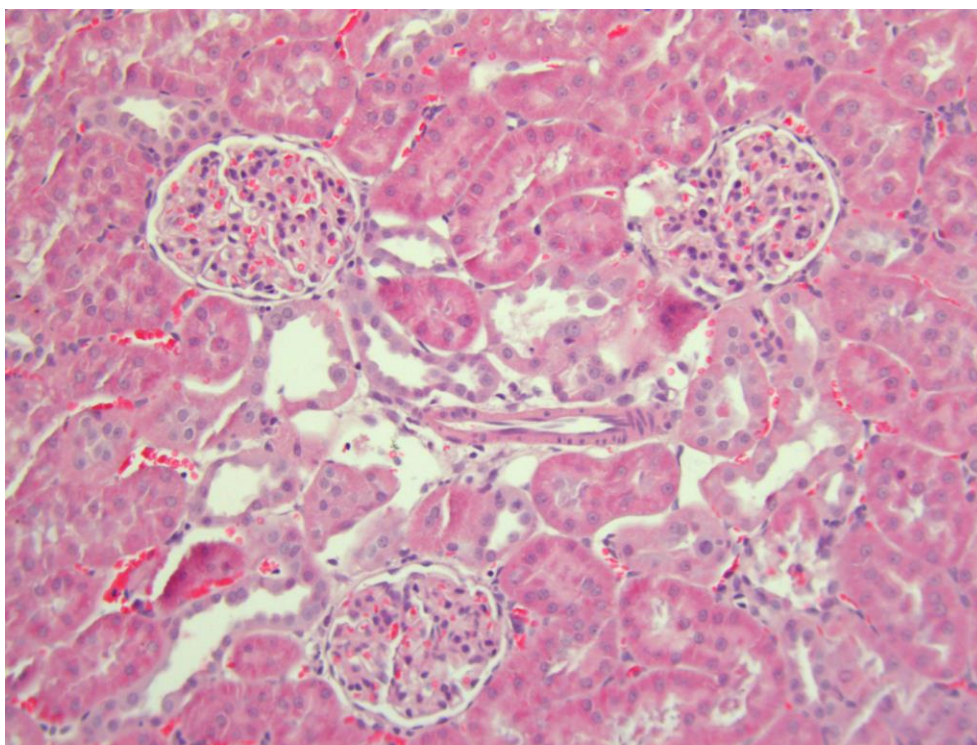
Slika 6. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova kontrole grupe (*HE x200*)



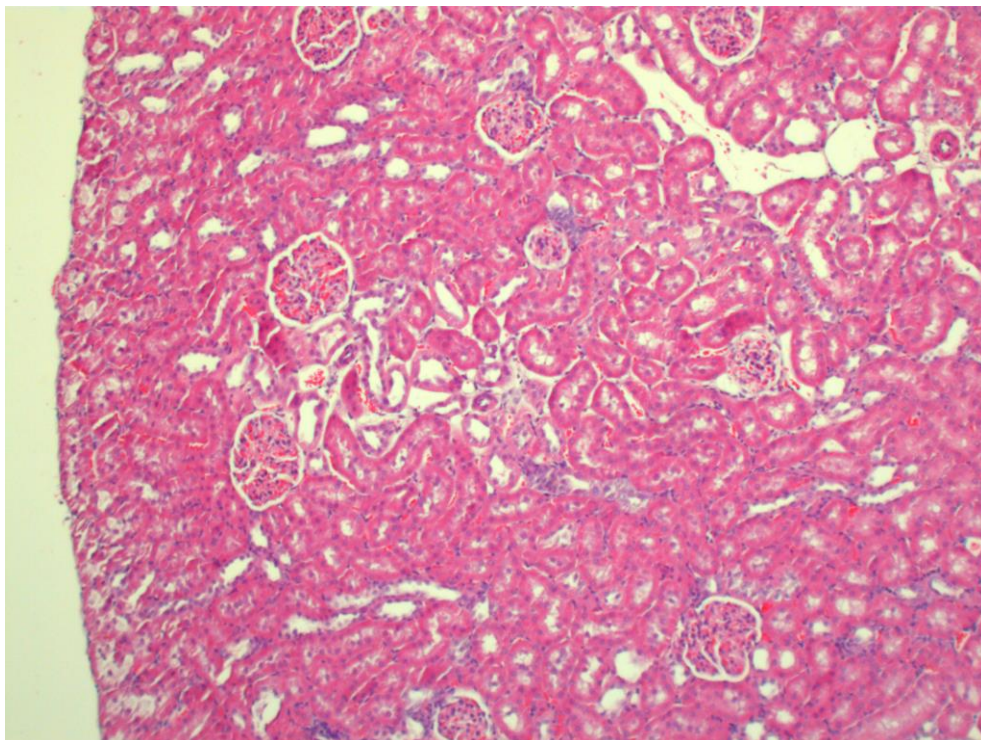
Slika 7. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova GT grupe (*HE x 200*)



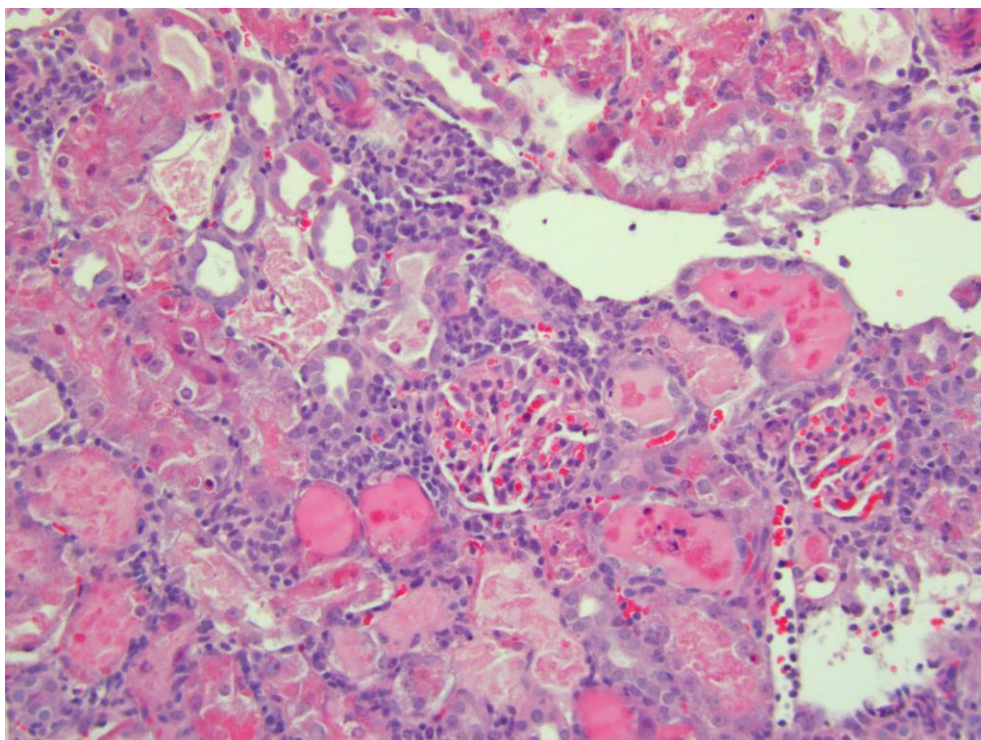
Slika 8. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova B grupe (*HE x 200*)



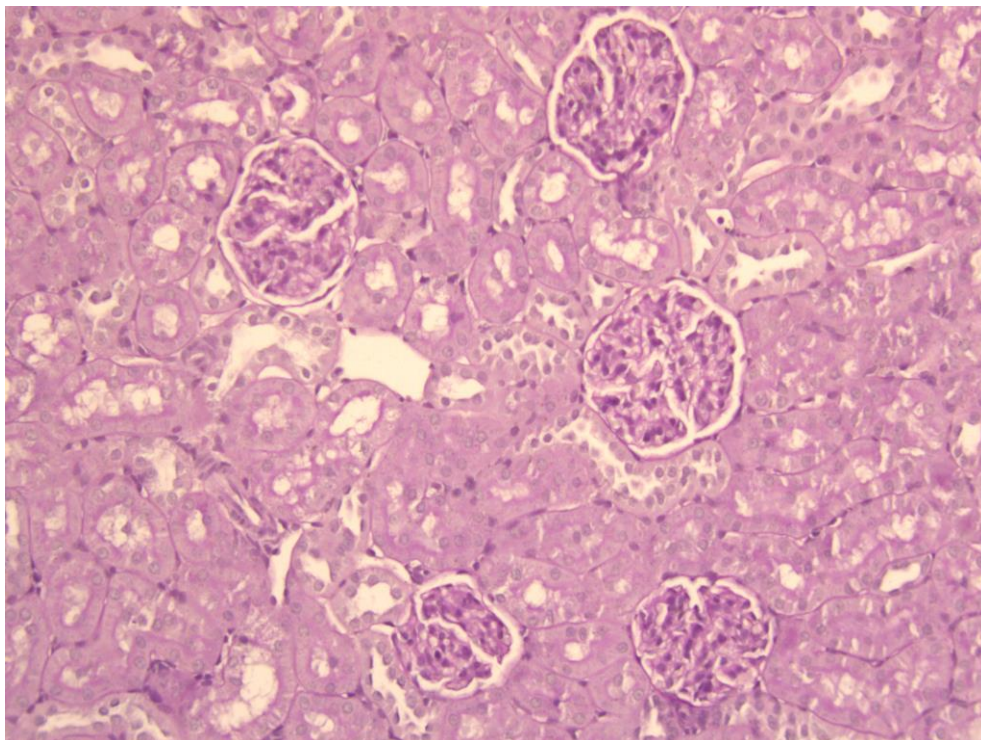
Slika 9. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova GT+GM grupe (*HE x 200*)



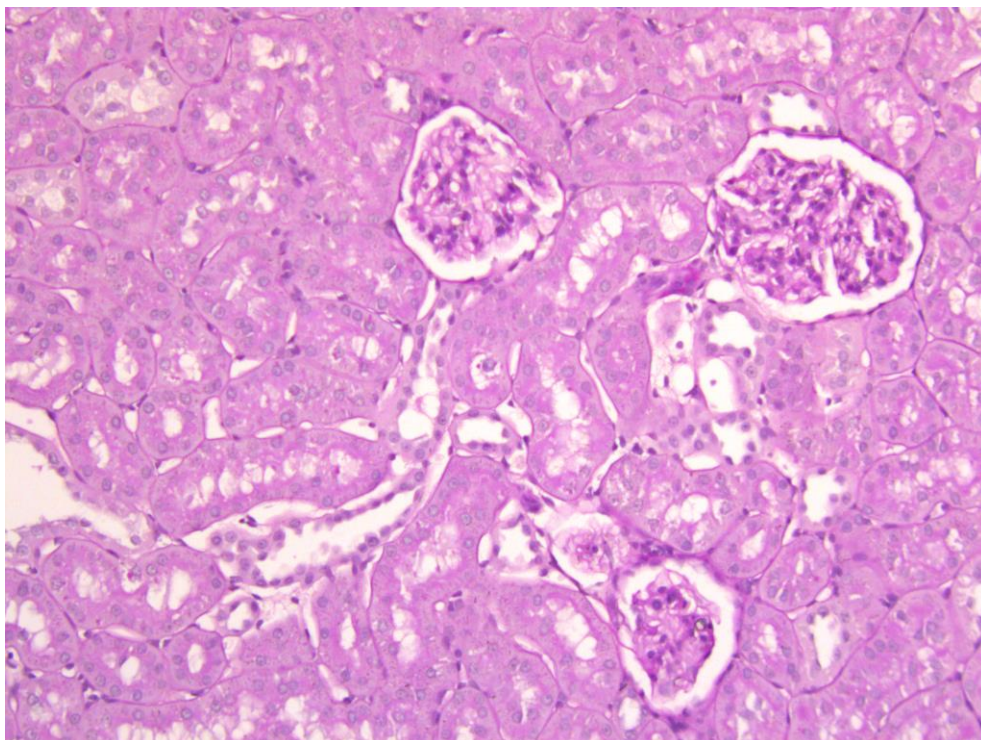
Slika 10. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova B+GM grupe (*HE x 100*)



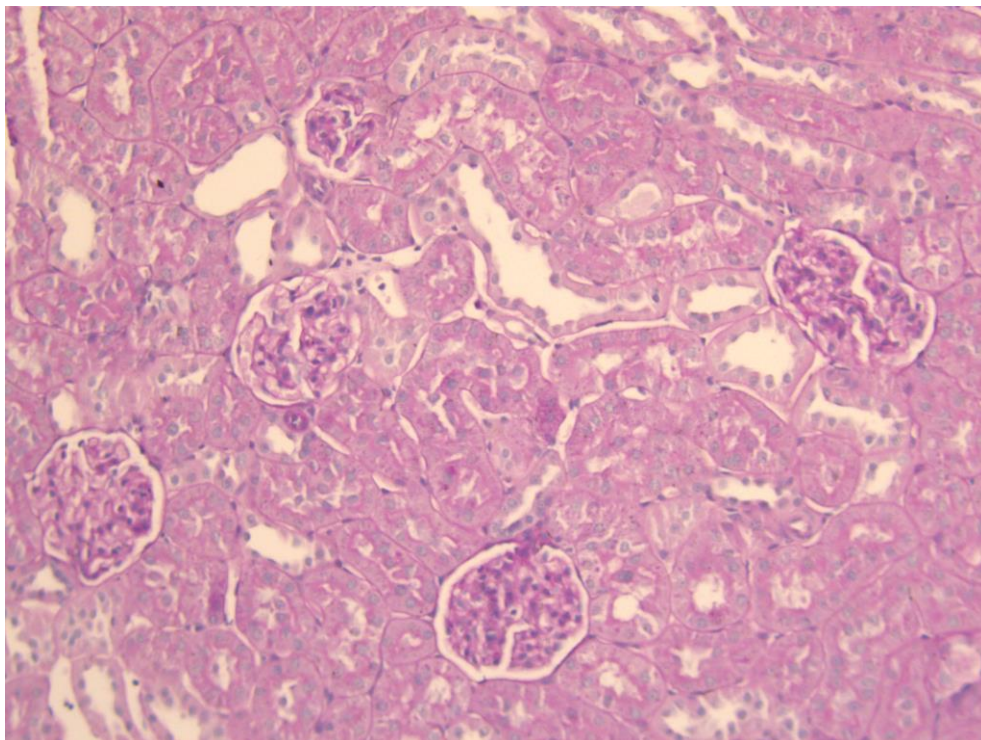
Slika 11. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova GM grupe (*HE x 200*)



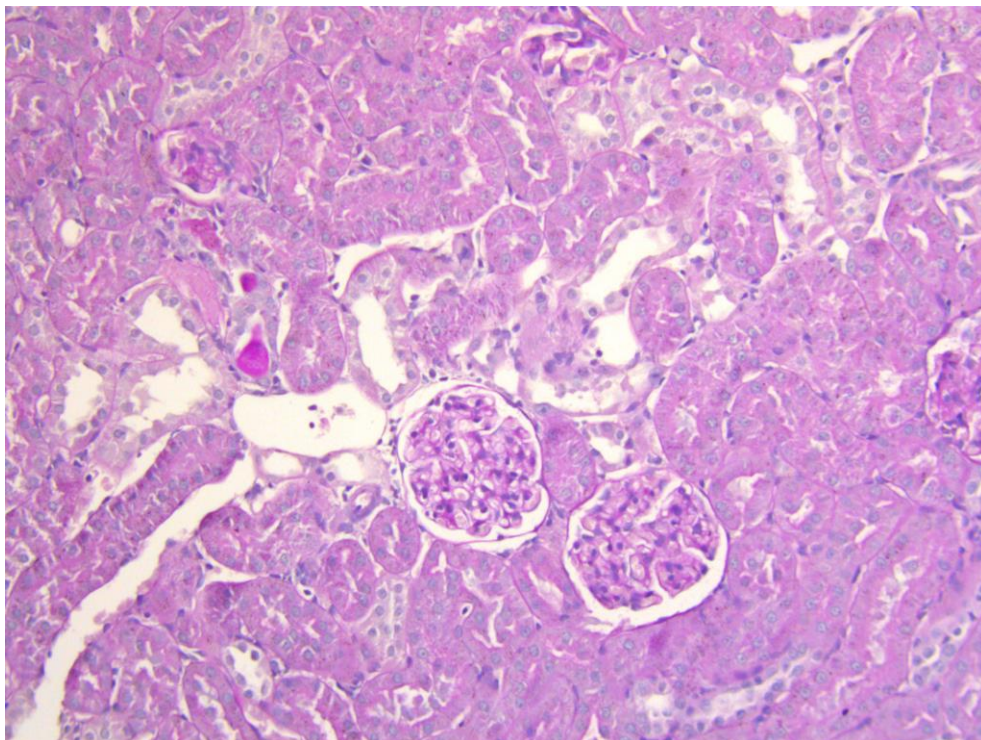
Slika 12. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova kontrolne grupe (*PAS x 200*)



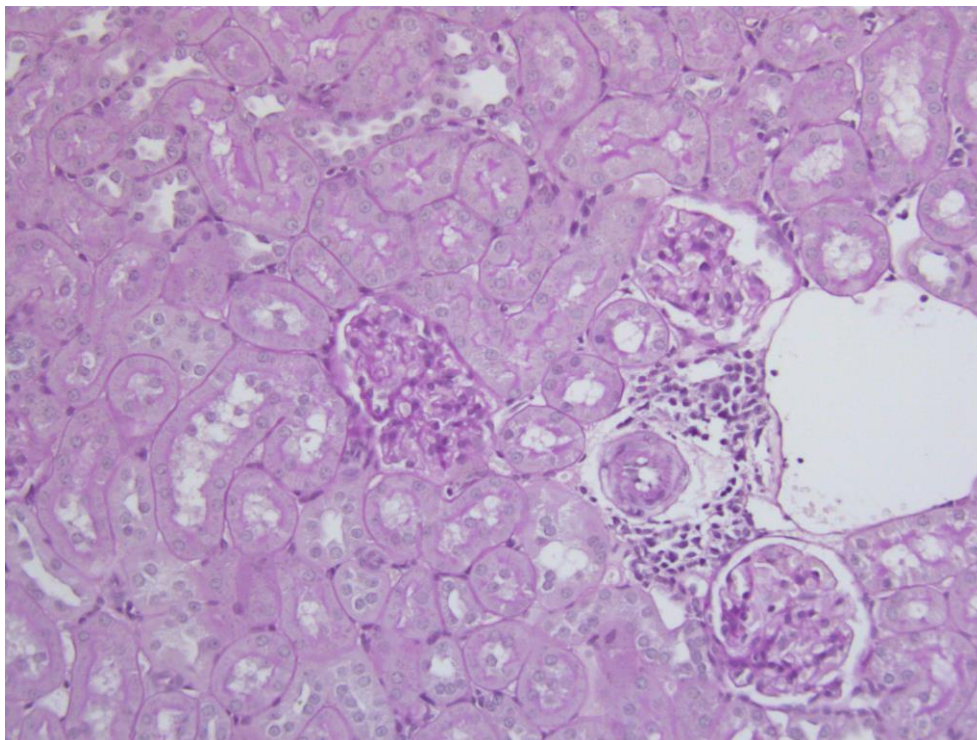
Slika 13. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova GT grupe (*PAS x 200*)



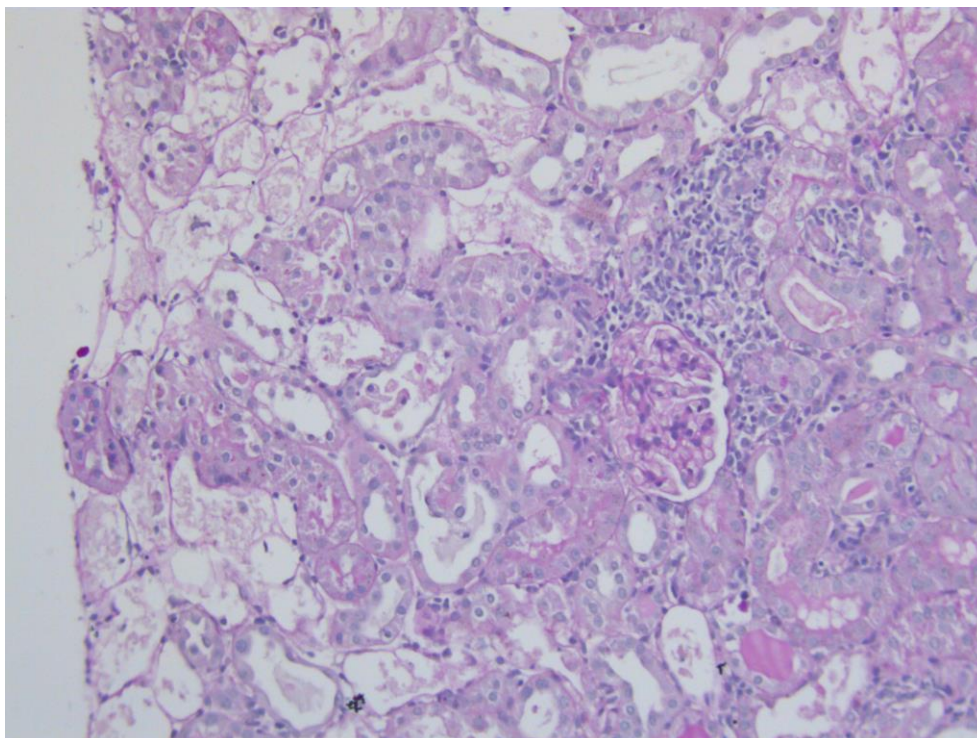
Slika 14. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova B grupe (*PAS x 200*)



Slika 15. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova GT+GM grupe (*PAS x 200*)



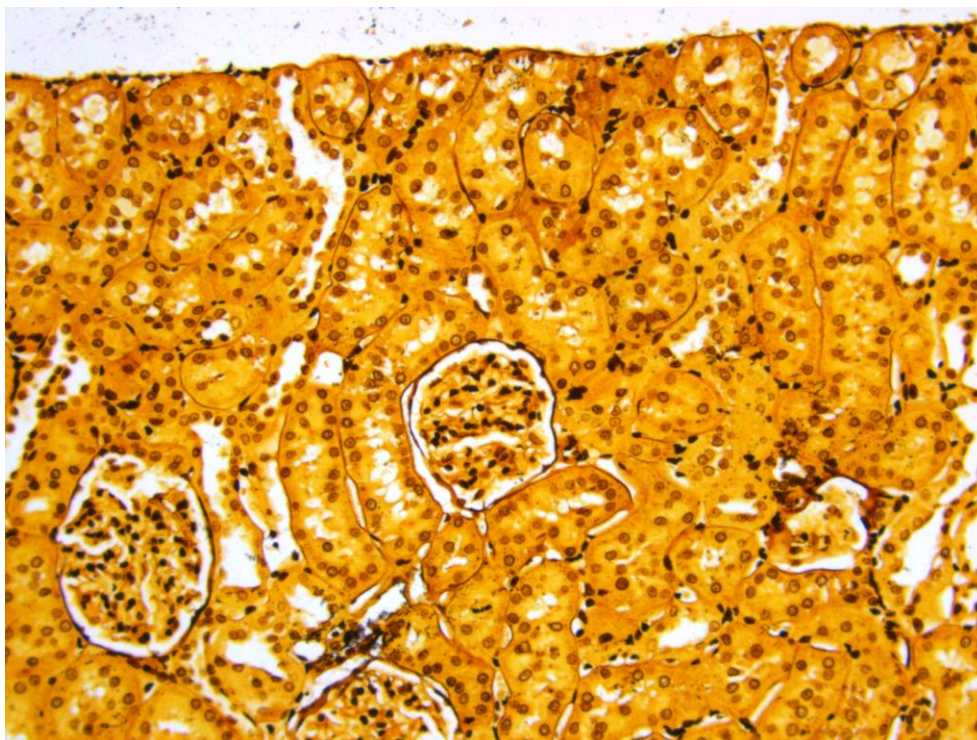
Slika 16. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova B+GM grupe (PAS x 200)



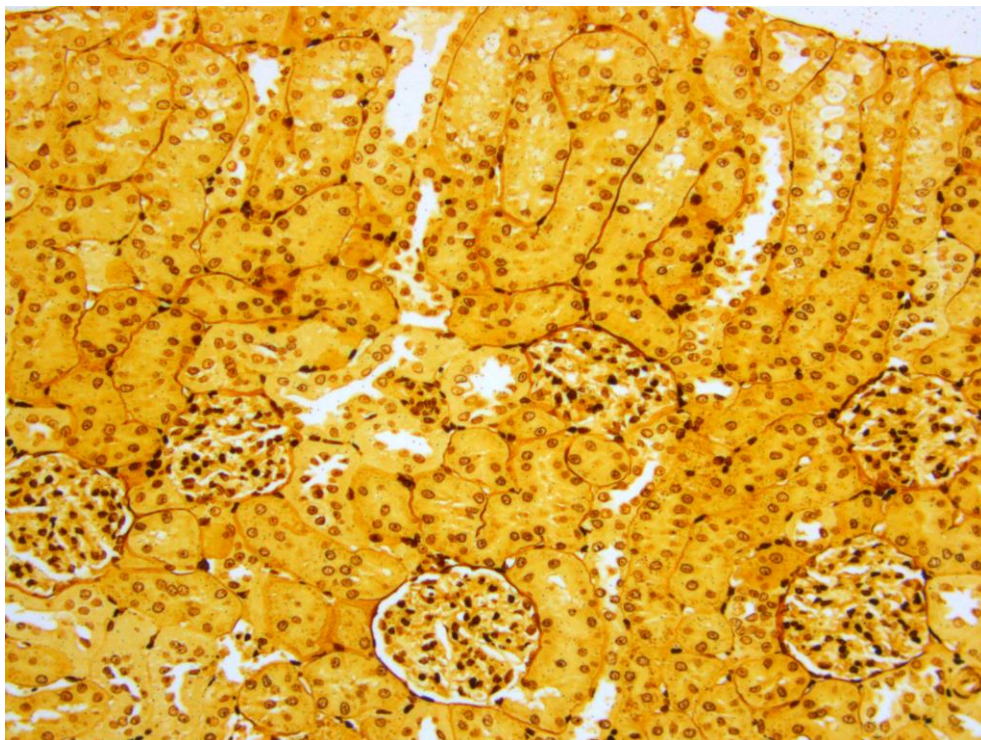
Slika 17. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova GM grupe (PAS x 200)



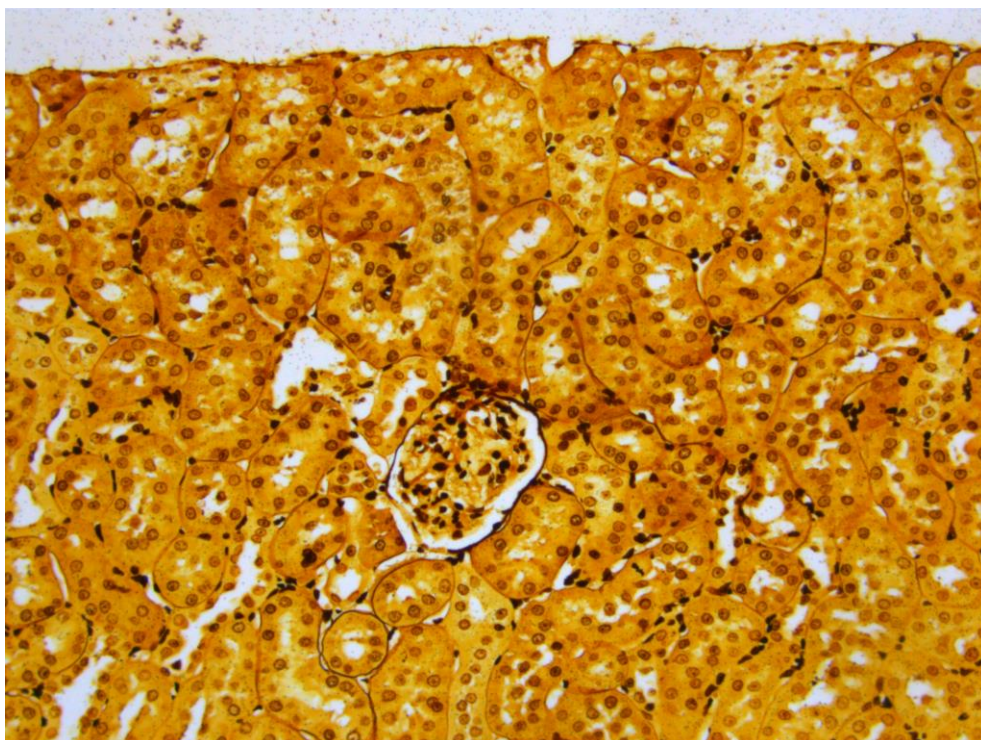
Slika 18. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova kontrolne grupe (*Jones x 200*)



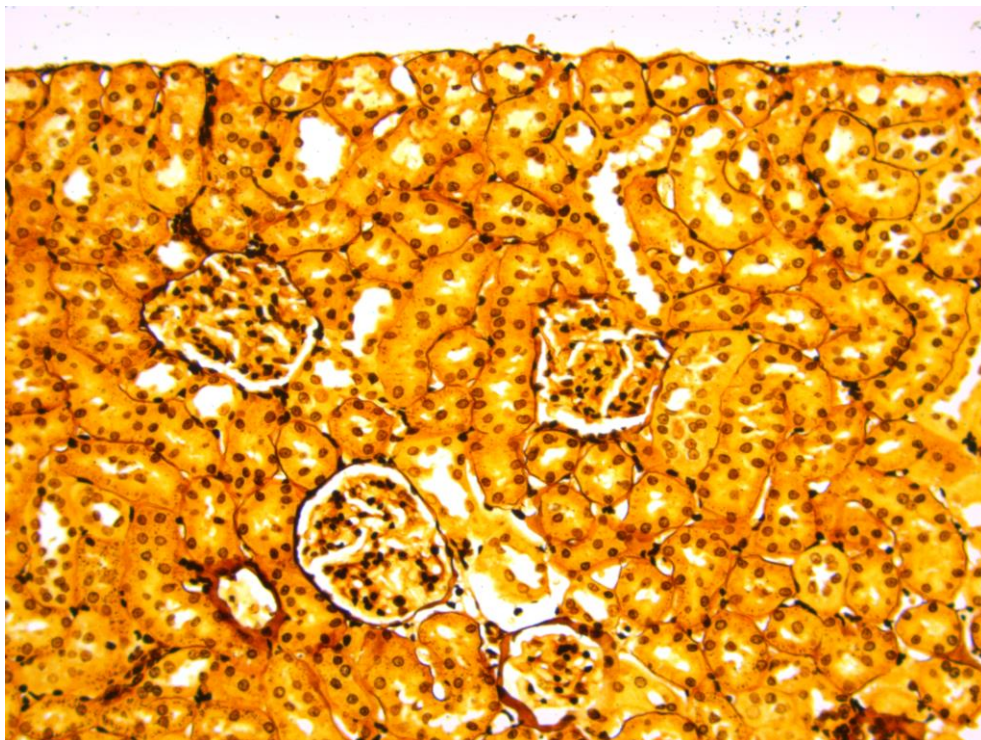
Slika 19. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova GT grupe (*Jones x 200*)



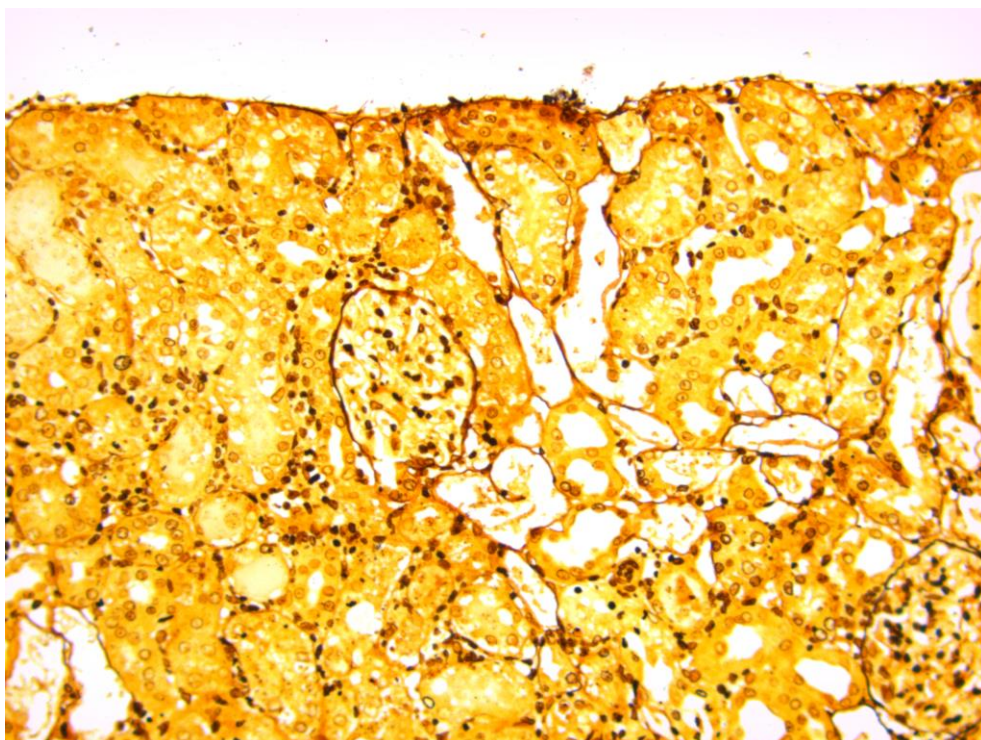
Slika 20. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova B grupe (*Jones x 200*)



Slika 21. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova GT+GM grupe (*Jones x 200*)



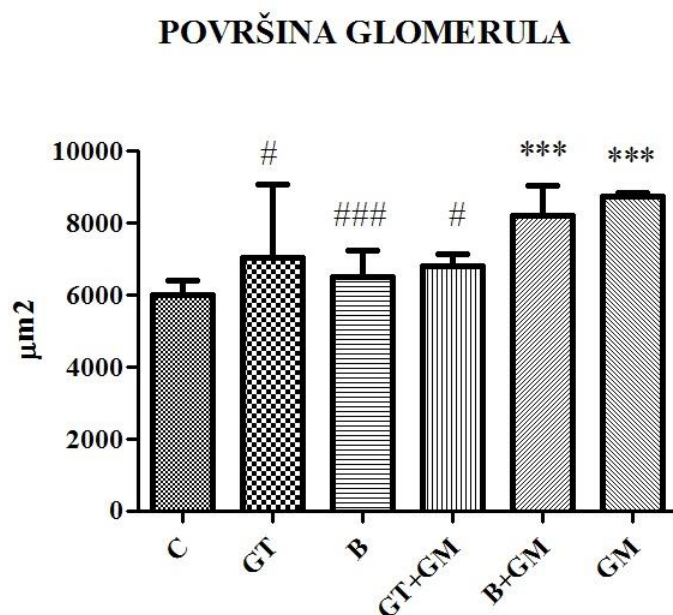
Slika 22. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova B+GM grupe (*Jones x 200*)



Slika 23. Svetlosno mikroskopski izgled tkiva bubrega pacova GM grupe (*Jones x 200*)

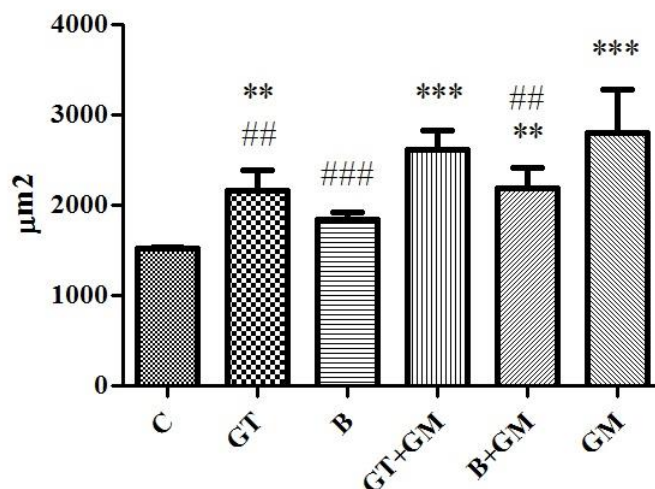
Rezultati morfometrijskih ispitivanja tkiva bubrega

Morfometrijski parametri životinja svake grupe prikazani su na Slikama 24-28. Glomeruli životinja tretiranih gentamicinom imali su značajno veću površinu glomerula u poređenju sa životinjama kontrolne grupe ($p < 0.001$), što ukazuje na kongestiju glomerula. Davanje borovnice umanjilo je ovu kongestiju (ali ne statistički značajno), što se prikazuje nižim vrednostima površine glomerula kod pacova B+GM grupe. Nasuprot borovnici, zeleni čaj je značajno umanjio kongestiju glomerula kada se primeni zajedno sa gentamicinom (GT+GM grupa) u odnosu na tretman isključivo gentamicinom ($p < 0.05$). Životinje GM grupe imale su značajno veću površinu i proksimalnih i distalnih tubula nego one u kontroli ($p < 0.001$). Davanje zelenog čaja ili borovnice istovremeno sa njim (GT+GM i B+GM grupa) značajno je smanjilo površine i jednih i drugih tubula u poređenju sa gentamicinskom grupom ($p < 0.001$). Cirkularnost jedara intersticijumskih ćelija u GM grupi bila je značajno veća nego kod životinja koje su istovremeno primale i ekstrakte i to u odnosu na paralelnu primenu zelenog čaja (GT+GM grupu): $p < 0.05$, a u odnosu na paralelnu primenu borovnice: $p < 0.001$, što ukazuje na nastanak eksperimentalno izazvanog zapaljenja i posledične limfocitne infiltracije.



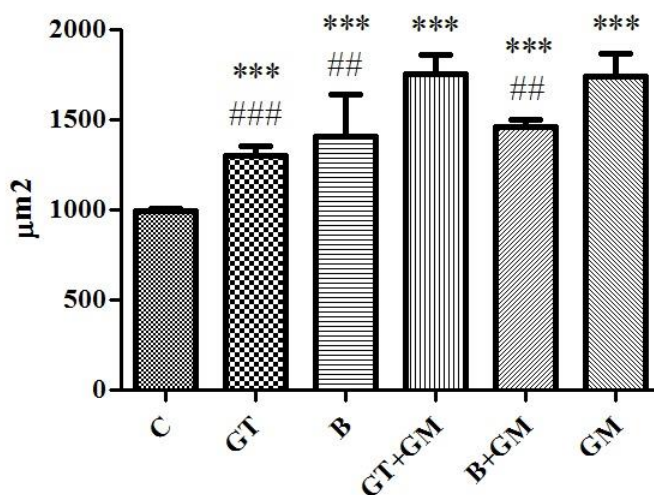
Slika 24. Površina glomerula (μm^2) eksperimentalnih i kontrolnih grupa životinja. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; *** — $p < 0.001$ vs. C, ### — $p < 0.001$, # — $p < 0.05$ vs. GM.

POVRŠINA PROKSIMALNIH TUBULA



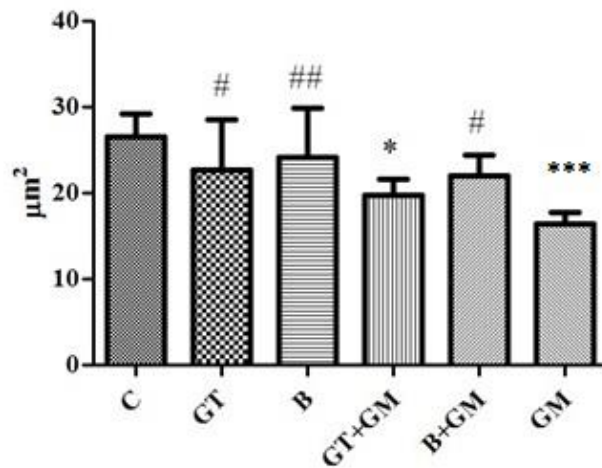
Slika 25. Površina proksimalnih tubula (μm^2) eksperimentalnih i kontrolnih grupa životinja. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; *** — $p < 0.001$, ** — $p < 0.01$ vs. C, ### — $p < 0.001$, ## — $p < 0.01$ vs. GM.

POVRŠINA DISTALNIH TUBULA



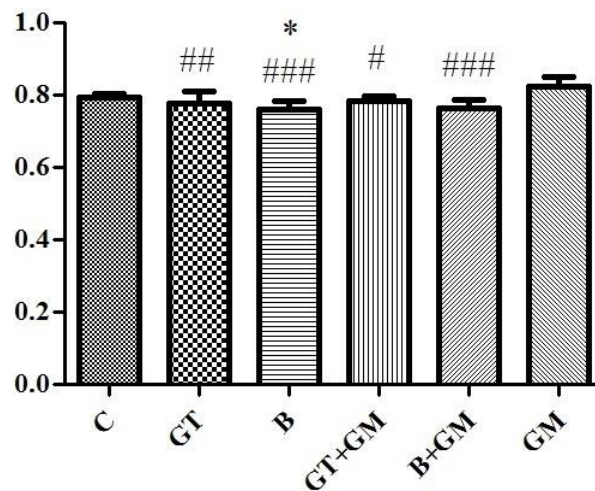
Slika 26. Površina distalnih tubula (μm^2) eksperimentalnih i kontrolnih grupa životinja. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; *** — $p < 0.001$ vs. C, ### — $p < 0.001$, ## — $p < 0.01$ vs. GM.

POVRŠINA JEDARA INTERSTICIJUMSKIH ČELIJA



Slika 27. Površina jedara intersticijskih ćelija (μm^2) eksperimentalnih i kontrolnih grupa životinja. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; *** — $p < 0.001$, * — $p < 0.05$ vs. C, ## — $p < 0.01$, # — $p < 0.05$ vs. GM.

CIRKULARNOST JEDARA INTERSTICIJUMSKIH ČELIJA



Slika 28. Cirkularnost jedara intersticijskih ćelija eksperimentalnih i kontrolnih grupa životinja. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD; * — $p < 0.05$ vs. C, ### — $p < 0.001$, ## — $p < 0.01$, # — $p < 0.05$ vs. GM.

DISKUSIJA

Primenjene doze i periodi tretiranja kontrolnih i eksperimentalnih grupa životinja ustanovljene su na osnovu podataka iz literature i našeg prethodnog iskustva. U ranijim eksperimentima (Veljković i sar., 2015) utvrđeno je da je 8 dana dovoljno za GM da ispolji svoju nefrotoksičnost u dozi od 100 mg/kg/dnevno. Imajući u vidu da se i zeleni čaj i borovnica upotrebljavaju svakodnevno širom sveta kao hrana i narodni lek, a svoj puni efekat ispoljavaju posle 2-4 nedelje, životinje su njima tretirane tokom 15 dana, kako bi bilo dovoljno vremena da pokažu svoj puni uticaj na gentamicinsku nefrotoksičnost.

Gentamicin je još uvek vodeći aminoglikozidni antibiotik u lečenju teških Gram negativnih infekcija, uprkos uvođenju novijih antimikrobnih agenasa sa manjom toksičnošću. To je hidrosolubilni antibiotik sa koncentraciono-zavisnom baktericidnom aktivnošću i potencijalom da izaziva nefrotoksičnost (Acharya i sar., 2013). Upravo je nefrotoksičnost najveća komplikacija i glavni razlog ograničavanja primene GM u borbi protiv životno ugrožavajućih infekcija. Gentamicinom uzrokovana nefrotoksičnost je značajni uzrok akutne bubrežne insuficijencije. Zato, postoji mogućnost da bi njena prevencija ili ublažavanje povećalo kliničku upotrebu GM. Nekoliko pristupa koji podrazumevaju korišćenje hemijskih supstanci (Stojiljković i sar., 2012) kao i prirodnih antioksidanasa (Tavafi i Ahmadvand, 2011; Veljković i sar., 2015) preduzeto je u pokušaju da se umani gentamicinska nefrotoksičnost. Njena specifičnost se odnosi na prvenstvenu akumulaciju gentamicina unutar proksimalnih tubula i lizozoma (Nagai i Takano, 2004). Aminoglikozidni antibiotici, kao što je GM, se ne metabolišu u živom organizmu (Randjelović i sar., 2012). Ekskretuju se glomerulskom filtracijom, ali se jedan njihov deo reapsorbuje u proksimalnim tubulima gde ostaju u nekoliko puta većoj koncentraciji od koncentracije u plazmi (Acharya i sar., 2013). Takođe se pasivno reapsorbuju u proksimalnim tubulima procesom endocitoze (Beauchamp i sar., 1997; El Mouedden i sar., 2000).

Smatra se da kiseli fosfolipidi, široko zastupljeni u ćelijskim membranama raznih tkiva, predstavljaju vezujuće mesto za aminoglikozide na četkastom pokrovu proksimalnih tubulocita (Nagai i Takano, 2004, Nagai 2006, Salem i sar., 2010). Endocitozne vakuole koje sadrže GM se spajaju sa lizozomima unutar kojih se lek nagomilava. Ovo nagomilavanje vodi razvoju lizosomalne fosfolipidoze, koju karakteriše narušavanje aktivnosti fosfolipaze A1 i sfingomijelinaze i nakupljanje fosfolipida unutar lizozoma. Posle nekog vremena, prepunjeni lizozomi počinju da otiču. *In vivo*, ovo može da izazove gubitak integriteta membrane lizozoma i

oslobađanje velike količine hidrolitičkih enzima, fosfolipida i aminoglikozida u citoplazmu. Oslobođeni aminoglikozidi mogu da dospeju do ostalih organela, kao što su mitohondrije, i oštete njihovu funkciju što vodi ćelijskoj smrti u vidu apoptoze ili nekroze (Beauchamp i sar., 1997; El Mouedden i sar., 2000). Smatra se da velika količina nakupljenih aminoglikozida u ćelijama proksimalnih tubula izaziva nefrotoksičnost (Abdel-Naim i sar., 1999; Randjelović i sar., 2012).

Poznato je da GM uzrokuje značajno histološko oštećenje naročito proksimalnih tubula u vidu oticanja, vakuolizacije i nekroze njihovih epitelnih ćelija i nakupljanja mijelinskih telašaca unutar njih (Ali i Bashir, 1994). GM dovodi do apoptoze i nekroze tubulocita u *in vivo* i *in vitro* uslovima (Li i sar., 2009; Pessoa i sar., 2009). Smatra se da je glavni uzrok tubulske toksičnosti GM njegovo nakupljanje u citoplazmi i lizozomima (Servais i sar., 2008). Najveći deo GM ulazi u ćelije pomoću kompleksa megalin/kubilin, a manji deo ostalim mehanizmima (Myrdal i sar., 2005). Presudni trenutak je kada njegova koncentracija u lizozomima, Goldžijevom aparatu i endoplazminom retikulumu pređe prag koji narušava integritet njihovih membrana (Ngaha i sar., 1983). Gentamicin oslobođen u citoplazmu oštećuje mitohondrije putem oksidativnog stresa, smanjenja rezervi ATP-a i izazivanjem apoptoze (Morales i sar., 2010). Pucanje lizozoma dovodi do oslobađanja proteolitičkih enzima katepsina koji takođe uzrokuju apoptozu (Schnellmann i sar., 1998). Uobičajen izgled ćelije koja prolazi kroz process apoptoze je nakupljanje grudvi hromatina uz jedarnu membranu (apoptotična tela), dok organele najčešće imaju normalan izgled. Jedarne promene karakteristične za apoptozu mogu se često videti u ćelijama koje pokazuju znake apoptoze. Apoptoza je process koji zahteva ATP. Čim njegove rezerve padnu, ćelijska smrt gubi karakteristike apoptoze i dobija oblik nekroze koagulacionog tipa (Chiarugi, 2005). Nekroza se može objasniti inhibicijom membranskog transporta. Smanjen izlazak natrijuma iz ćelija izazvan GM uzrokuje da se smanjuje količina glukoze u ćelijama jer se ona reapsorbuje mehanizmom kotransporta sa natrijumom. To dalje smanjuje količinu stvorenog ATP-a u ćelijama i aktivnost Na-K pumpe. Njena smanjena aktivnost dovodi do nakupljanja natrijuma unutar ćelije koji sa sobom povlači vodu. Dolazi do oticanja ćelije i nekroze (Lieberthal i Levine, 1996).

Gentamicinom uzrokovana nefrotoksičnost se široko koristi kao životinjski model za proučavanje akutne bubrežne insuficijencije u eksperimentalnom radu (Tavafi i Ahmadvand, 2011). Manifestacije ove nefrotoksičnosti su dobro proučene i kod ljudi. Njeni početni znaci

ispoljavaju se u vidu prisustva enzima četkastog pokrova (γ -glutamil-transpeptidaze (γ -GT)) i lizozoma (N-acetil- β -D-glukozaminidaza (NAG)) u urinu zajedno sa poliurijom, hipoosmolarnošću urina i smanjenom sposobnošću bubrega da koncentriše mokraću (Tilkian i sar., 1995).

Značajno povećan nivo ureje i kreatinina u eksperimentu, kao markera aktivnosti bubrega, ($p < 0.001$) ukazuje na izraženo funkcionalno oštećenje bubrega u GM grupi. Koncentracija kreatinina u serumu pacova je precizniji pokazatelj ranog stadijuma oštećenja bubrega od ureje čije koncentracije počinju da rastu tek nakon oštećenja parenhima (Tavafi i Ahmadvand, 2011). Povećanje ovih markera povezano je sa smanjenjem glomerulske filtracije. Takođe, izraženo oštećenje proksimalnih tubulocita odgovorno je za glikozuriju, proteinuriju, pojavu cilindara u mokraći i povećane vrednosti Na, K i Mg u urinu (Cojocel i sar., 1984).

Naši rezultati su u skladu sa podacima iz literature. Značajno povećanje nivoa ureje i kreatinina u našem eksperimentu ($p < 0.001$) ukazuje na izrazito oštećenje funkcije bubrega pacova u GM grupi.

Postoje podaci da gentamicinska nefrotoksičnost kod eksperimentalnih životinja izaziva akutnu bubrežnu insuficijenciju i smanjenje koncentracije kalijuma u serumu (Cronin i Thompson, 1991). Gentamicinom uslovljena nekroza tubula dovodi do smanjenja broja funkcionalnih nefrona sa posledičnim smanjenjem glomerulske filtracije. To može da dovede do pokretanja kompenzatornih mehanizama u očuvanim nefronima, kao na primer poremećaj u raznim procesima tubulskog transporta uključujući reapsorpciju natrijuma i kalijuma (Abd-El Latif i sar., 2008). Gentamicin menja aktivnost membranskih enzima, što uključuje promene u membranskom transportu Ca^{2+} i povećanje koncentracije Ca^{2+} unutar ćelije. Zbog izmene permeabilnosti ćelijske membrane, velika količina Ca^{2+} ulazi u ćelije i istovremeno dolazi do preraspodele intraćelijskih depoa Ca^{2+} (Burke i sar., 1984).

Jedan od glavnih toksičnih efekata gentamicina je kontrakcija glomerula koja se ispoljava smanjenjem filtracione površine i smanjenjem glomerulske filtracije. Gentamicin takođe povećava ulazak Ca^{2+} u mezangijalne ćelije. Povećana koncentracija Ca^{2+} u njima dovodi do kontrakcije mezangijalnih ćelija, a samim tim i kontrakcije glomerula. Krajnja posledica ovih procesa je smanjenja koeficijenta ultrafiltracije (Kf) i glomerulske filtracije (Martinez-Salgado i sar., 2007). Mehanizam preko koga GM dovodi do kontrakcije mezangijalnih ćelija je stvaranje pojedinih vazokonstriktora kao što su: faktor aktivacije trombocita (PAF) (Dos Santos i sar.,

1991), endotelin-1 (Valdivieso i sar., 1999), tromboksan A2 (Papanikolau i sar., 1992) i ROS (Perdaza-Chaverri i sar., 2004). Ovi vazokonstriktori parakrinim putem dolaze do glatkih mišića krvnih sudova i izazivaju vazokonstrikciju. Osim što stimuliše sintezu vazokonstriktora, GM takođe blokira sintezu vazodilatatornih prostaglandina (Assael i sar., 1985). Nastala hipoksija stimuliše ekspresiju iNOS, a time i pojačano stvaranje NO koji reaguje sa superoksidnim anjonom i formira peroksinitrit, koji dalje stimuliše vazokonstrikciju i doprinosi smanjenju glomerulske filtracije (Forstermann, 2010).

Gentamicin, putem smanjenja protoka krvi kroz bubreg, smanjuje dostupnost kiseonika i ATP-a ćelijama tubula. Pošto se zbog narušene funkcije tubula narušava i reapsorpcija u njima, kao posledica aktivacije tubulo-glomerulske povratne sprege nastaje porast vaskularnog otpora u bubregu. Na taj način se smanjuje preveliki gubitak vode i elektrolita urinom u uslovima smanjene tubulske reapsorpcije (Morales i sar., 2002).

Eksperimentalni podaci ukazuju na stvaranje slobodnih radikala, kao medijatora gentamicinske nefrotoksičnosti (Randjelović i sar., 2012) pa se antioksidantna terapija predlaže kao mogućnost njene prevencije (Koyner i sar., 2008).

Postoje podaci da slobodni radikali i oksidativni stres imaju glavnu ulogu u nastanku mnogih hroničnih bolesti (Szajdek i Borowska, 2008; Paredes-Lopez i sar., 2010). Slobodni radikalni predstavljaju visoko reaktivne i stoga destruktivne molekule koji imaju jedan ili više neuparenih elektrona u spoljašnjoj orbiti. U njih spadaju ROS kao što su: superoksid anjon, hidroksilni radikal, vodonik peroksid i RNS, kao što je peroksinitrit (Tavafi i sar., 2012; Vardi i sar., 2013). Ovi molekuli poseduju sposobnost da reaguju sa ćelijskim komponentama, kakvi su lipidi, proteini i DNK, i da ih unište (Acharya i sar., 2013).

Dokazano je da GM povećava stvaranje superoksid anjona i vodonik peroksida u mitohondrijama bubrežnog korteksa (Abdel-Raheem i sar., 2010). Kako je mitohondrijalna DNK podložna oksidativnom stresu, izlazak slobodnih radikala iz mitohondrijalnog matriksa u citoplazmu može dalje da ošteti razne ćelijske komponente. Slobodni radikali takođe oštećuju sintezu DNK sa gubitkom integriteta membrane i izlaskom proteina (Acharya i sar., 2013). Otkriveno je da ROS aktiviraju nuklearni faktor kapa B (Tavafi, 2012), transkripcioni faktor koji ima ulogu u ekspresiji proinflamatornih gena i indukovanju zapaljenja (Lawrence, 2009). Zima i sar. (1995) ustanovili su da slobodni radikali preko nuklearnog faktora kapa B stimulišu

stvaranje različitih medijatora zapaljenja kao što su TNF-alfa, IL-1, IL-6 i ekspresiju citokina specifičnih za monocite (CSF-1 and MCP-1). Pojava zapaljenja je jasno pokazana u našem eksperimentu u vidu masivnog intersticijalnog mononuklearnog zapaljenjskog infiltrata pacova u GM grupi, koji su kasnije svedeni na umeren nivo kod istovremene primene zelenog čaja i blag nivo kod primene borovnice. Zapaljenje koje kod gentamicinske toksičnosti započinje kao odbrambeni mehanizam, kasnije doprinosi napredovanju oštećenja bubrega i pojačava ga. U početku se javlja nekroza tubulskih ćelija. Zatim akutno zapaljenje izaziva dalje oštećenje koje s druge strane opet pojačava zapaljenski proces (Karkar, 2008). Zapaljenje takođe aktiviraju ćelije kao što su mezangijalne, epitelne, endotelne, podociti i leukociti proizvodnjom citokina i faktora rasta koji pojačavaju oštećenje tubula. Stoga, zapaljenje i oksidativni stres predstavljaju vezu između nekroze tubula i kontrakcije mezangijalnih ćelija glomerula i krvnih sudova, što dalje doprinosi smanjenje protoka krvi u glomerulu i oštećenju tubula (Sue i sar., 2009).

Osim indirektno, putem zapaljenja, ROS takođe direktno oštećuju tkivo bubrega, putem kontrakcije mezangijalnih ćelija i smanjenja filtracione površine (Vardi i sar., 2013).

Naši rezultati jasno pokazuju da GM izaziva oštećenje bubrega oksidativnim stresom, što je dokazano povećanom lipidnom peroksidacijom (MDA) i oksidacijom proteina (AOPP), kao i smanjenom katalazom u bubrezima pacova. Malondialdehid je završni produkt oksidativne razgradnje nezasićenih masnih kiselina, dok AOPP ukazuje na povećan nivo oksidisanih proteina i zapaljenje (Witko-Sarsat i sar., 2003). Ovi oksidativni parametri su verovatno povišeni zbog smanjenja aktivnosti katalaze, koja je jedan od glavnih endogenih antioksidativnih enzima. Dokazano je da oksidativna izmena proteina može da izazove strukturne i funkcionalne promene mnogih enzimskih proteina (Sitte i sar., 2000). Oksidativno izmenjeni proteini su podložniji degradaciji proteolitičkim mehanizmima u odnosu na ostale proteine. Ova gentamicinom uzrokovana akumulacija oksidisanih proteina je odraz i posledica njime stvorenih slobodnih radikala (Randjelović i sar., 2012).

Smanjena aktivnost antioksidativnih enzima u GM grupi može da poveća koncentraciju O_2^- , koja kasnije može da reaguje sa NO i stvori peroksinitrit. Peroksinitrit je citotoksični RNS koji zajedno sa već povećanim nivoom ROS može da bude odgovoran za smanjenje glomerulske filtracije (Vardi i sar., 2013) u pacova tretiranih gentamicinom. On direktno oštećuje krvne sudove u uslovima smanjene dostupnosti NO kao vazodilatatora (Kim i sar., 2003). Povišeni nivoi ureje i kreatinina, zajedno sa rezultatima patohistološke analize, oksidativnim i

antioksidativnim parametrima, potvrdili su oksidativnim stresom izazvan razvoj akutne bubrežne insuficijencije kod pacova u GM grupi. Ishrana bogata antioksidansima kao što su borovnica i zeleni čaj mogla bi da bude korisna u održavanju aktivnosti antioksidativnih enzima u grupama GT+GM i B+GM grupe, unutar kojih smo merili nivo katalaze. Naš eksperiment je takođe pokazao da bi ovakva ishrana pored smanjenja oksidativnog stresa mogla da obnovi funkciju bubrega nakon tretiranja gentamicinom.

Svi ovi rezultati potvrđeni su patohistološkim nalazom. Pacovi u GM grupi pokazali su izraženo strukturno oštećenje bubrega sa masivnom nekrozom proksimalnih tubula, vakuolarnom degeneracijom citoplazme, PAS pozitivnim hijalnim cilindrima i masivnim intersticijumskim zapaljenjem. Pojava hijalnih cilindara može se objasniti pojavom proteinurije u uslovima smanjene tubulske reapsorpcije koja prati akutnu bubrežnu insuficijenciju izazvanu GM. Pretpostavlja se da je uzrok proteinurije gubitak selektivnosti glomerulske bazalne membrane zbog neutralizacije negativnog naelektrisanja (De-Barros-e-Silva i sar., 1992). Razvoju proteinurije u GM nefrotoksičnosti najverovatnije značajno doprinosi i nekroza tubulocita proksimalnih tubula. Ove strukture bubrega u fiziološkim uslovima omogućavaju tubulsku reapsorpciju male količine odfiltriranih proteina. Pošto su tubulociti proksimalnih tubula oštećeni, oni ovu svoju značajnu funkciju ne ostvaruju. Tubulska nekroza se nije javila kod pacova koji su simultano tretirani borovnicom ili zelenim čajem uz GM, dok su vakuolarna degeneracija i intersticijumski infiltrati smanjeni.

Morfometrijski, glomerulska kongestija je potvrđena povećanom površinom glomerula u GM grupi u odnosu na kontrolnu. Veća površina i proksimalnih i distalnih tubula u GM u poređenju sa kontrolnom grupom bi se mogla objasniti prisustvom dve vrste tubula u GM grupi životinja: onih sa edemom, kompenzatornom hipertrofijom i očuvanim integritetom epitela i onih kod kojih je epitel potpuno oštećen. Hipertrofija i edem bi mogli da nastanu zbog veće površine i debljine epitela u odnosu na kontrolu. Peritubulski kapilari su verovatno oštećeni i postali su pojačano permeabilni usled upotrebe gentamicina. Ovo može da objasni glomerulsku kongestiju u našem eksperimentu, usled otežane drenaže krvi. Moguće je da je oštećenje distalnih tubula nastupilo sekundarno, usled oštećenja proksimalnih. Povećana cirkularnost jedara intersticijumskih ćelija u GM grupi u odnosu na kontrolnu može da bude zbog masivne limfocitne infiltracije usled gentamicinom izazvanog zapaljenja. Povećana cirkularnost upućuje

na prisustvo okruglih ćelija sa hiperhromatskim jedrima, što je potvrđeno u patohistološkom nalazu prisustvom masivnog zapaljenjskog infiltrata u intersticijumu.

Efekat zelenog čaja na akutnu bubrežnu insuficijenciju pacova izazvanu gentamicinom

Pozitivni efekti ekstrakta zelenog čaja i njegovih sekundarnih metabolita, od kojih je najznačajniji EGCG su detaljno opisani od strane mnogih autora (Chacko i sar., 2010; Graziose i sar., 2010; Kim i sar., 2014). Najviše je proučavana njegova antitumorska (Lee i sar., 2011) i antiinflamatorna aktivnost (Chacko i sar., 2010). Vekovima se u Aziji zeleni čaj povezuje sa mnogobrojnim pozitivnim efektima po zdravlje (Graziose i sar., 2010). Brojne *in vitro* studije su pokazale da su proantocijanidini, od kojih je glavni EGCG, efikasni na različitim nivoima, kao: antioksidansi (Quideau i sar., 2011), inhibitori ulaska virusa (Calland i sar., 2012), inhibitori enzima ili molekuli koji interaguju sa proteinima (Quideau i sar., 2011). Ovi nalazi se slažu sa *in vivo* studijama koje su izvedene kako na životinjama, tako i na zdravim ljudskim dobrovoljcima. One ukazuju na koristan efekat u prevenciji ili lečenju različitih hroničnih bolesti i bolesti koje se povezuju sa stilom života, kao što su tumori i kardiovakularne bolesti (Chacko i sar., 2010), starenje kože izazvano UV zracima (Hunt i sar., 2010). Kao suplement u ishrani zeleni čaj podstiče gubitak težine, ublažavanje konstipacije, a može biti koristan i u tretmanu glaukoma (Rhone i Basu, 2008).

Rezultati našeg eksperimenta pokazali su da je istovremena primena zelenog čaja u dozi od 300 mg/kg TT sa GM normalizovala serumske vrednosti ureje i kreatinina, markere akutne bubrežne insuficijencije. Zaštitni efekat zelenog čaja na razvoj oštećenja bubrega može se objasniti njegovim antioksidativnim i antiinflamatornim svojstvima. Smatra se da je glavni uzrok za nastanak gentamicinske nefrotoksičnosti oksidativni stres, što je potvrđeno u našem eksperimentu, gde se u grupi pacova tretiranih isključivo GM povećao nivo oksidativnih parametara (MDA, AOPP) i smanjio nivo glavnog endogenog antioksidativnog enzima katalaze. Ovaj porast oksidativnog stresa oštećuje funkciju bubrega, kako direktno, tako i indirektno putem izazivanja zapaljenja. U GT+GM grupi pacova isti oksidativni parametri značajno su smanjeni ($p < 0.001$), dok je antioksidativni parametar katalaza značajno povećan u poređenju sa GM grupom ($p < 0.001$). Ovakav nalaz ukazuje na to da zeleni čaj smanjuje stvaranje slobodnih

radikala (čije stvaranje okida GM) u bubregu i sprečava nastanak oksidativnog stresa kao jednog od glavnih uzroka gentamicinske nefrotoksičnosti.

Zeleni čaj znatno povećava antioksidativnu odbranu organizma. U našem eksperimentu povećao je nivo katalaze. Khan i sar. (2009) su utvrdili da zeleni čaj pored katalaze povećava nivo SOD, još jednog važnog antioksidativnog enzima, što je u skladu sa našim nalazom. Ovi rezultati ukazuju da zeleni čaj obezbeđuje zaštitu od GM nefropatije mehanizmom koji uključuje ili katalazu ili SOD ili oba enzima zajedno.

Richi i sar. (2012) su dokazali antioksidativne efekte zelenog čaja na modelu ćelijskog oksidativnog stresa izazvanog γ -zračenjem. Naime, tretiranje splenocita zamorca EGCG zelenog čaja 2 sata pre izlaganja γ -zračenju zaštitilo je prekidanje DNK lanca ovih ćelija. Epigalokatehin galat je takođe sprečio apoptozu splenocita izazvanu ovim zračenjem, smanjio je nivo lipidne peroksidacije i oštećenje membrana, a nivo glutationa i LDH vratio na normalu.

TNF- α , koji stvaraju ćelije u zapaljenju se povećava kod GM nefrotoksičnosti. Upravo on izaziva citotoksičnost i oštećenje bubrega povezano sa zapaljenjem, a EGCG iz zelenog čaja dovodi do njegove nishodne regulacije (Fujiki i sar., 2003). Istraživanja na humanim keratinocitima su pokazala da EGCG menja ćelijsku signalizaciju preko p38 MAPK puta, nishodno od MEK3 (Balasubramanian i sar., 2002). Kako je EGCG efektivan u dozi 15-100 μ M, što se fiziološki može postići oralnim unosom (Yang i sar., 1999), može se izvesti zaključak da bi oralni unos zelenog čaja mogao da zaštititi tkivo bubrega od GM-izazvanog oštećenja. Mehanizmi dejstva bi bili: ublažavanje jednog ili više puteva patogeneze (apoptoza, ekspresija gena ili stvaranje citokina), antioksidativna aktivnost ili aktivacija p38 puta u tkivu bubrega. Hsu i sar. (2007) su dokazali da zeleni čaj štiti od citotoksičnosti uzrokovane TNF- α i to putem p38 signalizacije.

Azot monoksid je važan signalni molekul kratkog poluživota koji ima značajnu ulogu u modulaciji brojnih fizioloških i patofizioloških procesa (Moncada i sar., 1992) kao što su citotoksičnost, prenos signala između ćelija, regulacija krvnog pritiska unutar bubrega i intraglomerulske dinamike. Već je dokazano da se NO pojačano stvara u glomerulima pacova koji su tretirani GM (Martinez-Salgado i sar., 2004), kao i da dolazi do pojačanog stvaranja inducibilne NO sintetaze (iNOS) (Martinez-Salgado i sar., 2005). U malim količinama NO daje fiziološki vazodilatatorni efekat. Kako smo već naglasili da je jedan od mehanizama GM nefrotoksičnosti smanjena perfuzija bubrega, moglo bi se zaključiti da bi primena vazodilatatora u ovom slučaju mogla da deluje zaštitno. Koncentracije NO koje imaju vazodilatatorni efekat u

bubregu ispoljavaju zaštitni efekat kod akutne bubrežne insuficijencije izazvane GM. S druge strane povećane koncentracije NO nastale usled pojačane ekspresije iNOS koju izaziva GM dovode do citotoksičnih efekata. Naime, ovakva koncentracija NO izaziva oštećenje DNK i deluje mutageno na životinjske, kao i ljudske ćelije (Wink i sar., 1991). Ostali mehanizmi citotoksičnosti su: oštećenje oksidativne fosforilacije, inhibicija enzima, nitrozilacija proteina i oksidativni stres izazvan peroksinitritom nastalim u interakciji NO i superoksid anjona. Peroksinitrit reaguje sa kritičnim biomolekulima i dovodi do njihove strukturne i funkcionalne izmene kao što su lipidna peroskidacija, presecanje DNK lanaca, oksidacija i/ili nitracija proteina što neizbežno vodi ćelijskoj smrti (Bolaños i sar., 1997).

Lin i sar. (1998) su zaključili da katehini zelenog čaja inhibiraju iNOS i stvaranje NO. Sudeći po jačini supresije iNOS, među teaflavinima, teaflavin 3.3 digalat, sa dve galne komponente, ispoljava najjače antiinflamatorno dejstvo. Teaflavin, koji nema galnu komponentu u molekulu, ispoljio je najslabije inhibitorne efekte na iNOS, a samim tim ima i najslabiju antiinflamatornu aktivnost. Odatle se može izvesti zaključak da je za antiinflamatornu aktivnost teaflavina veoma važna galna komponenta. Obzirom da GM izaziva jako zapaljenje intersticijuma, ovo je verovatno značajno za zaštitu od GM oštećenja bubrega. Takođe, pored smanjenja ekspresije iNOS, zeleni čaj bi mogao ovim mehanizmom i da ispolji antioksidativno dejstvo i smanji oksidativni stres bubrega, jer se sa smanjenim stvaranjem NO smanjuje se i nivo peroksinitrita.

Između ostalih i Zhang i sar. (2011) su potvrdili antiinflamatorno dejstvo EGCG zelenog čaja. U njihovom eksperimentu je administracija ovog katehina smanjila stopu ćelijske smrti indukovane proinflamatornim citokinima (rekombinantni IL-1 β , TNF- α i IFN- γ). Epigalokatehin galat je u ovoj studiji smanjio stvaranje citokinima indukovanih slobodnih radikala, gubitak membranskog potencijala mitohondrija, oslobađanje citohroma C iz njih i translokaciju Bax proteina iz mitohondrija u citosol. Davanje EGCG sprečilo je citokinima uzrokovanu prekomernu ekspresiju iNOS i stvaranje NO. Dakle, unos EGCG može sprečiti zapaljenske reakcije koje indukuju proinflamatorni citokini, a koje se odvijaju preko mitohondrija.

Bayer i sar. (2004) su našli da su polifenoli zelenog čaja inhibisali sekreciju INF- γ u ćelijskoj kulturi monoklonalnih T limfocita kao i aloreaktivnih T limfocita u mešovitim limfocitnim reakcijama. Rezultati njihove studije ukazuju da bi oralni unos zelenog čaja svojim antiinflamatornim mehanizmom mogao da posluži kao pomoćna terapija u prevencija odbacivanja transplantiranih organa kod ljudi.

Wu i sar. (2009) su pokazali da EGCG zelenog čaja u fiziološkim koncentracijama od 2.5 do 10 μM inhibiše proliferaciju T limfocita bez izazivanja citotoksičnosti i apoptoze. Kao mehanizam ovog delovanja naveli su smanjenu ekspresiju receptora za IL-2 i veću akumulaciju IL-2 što ukazuje na poremećenu signalizaciju između IL-2 i njegovog receptora. Ovi rezultati upućuju na to da bi konzumiranje zelenog čaja moglo da bude korisno kod onih koji imaju pojačanu funkciju T limfocita, kao što je slučaj kod autoimunih i inflamatornih oboljenja. Međutim, treba biti oprezan kod unosa visokih doza kod pacijenata koji imaju oštećenu funkciju T limfocita.

Kim i sar. (2009) su otkrili da tretman EGCG-om povećava ćelijske rezerve redukovano glutaciona tako što povećava ekspresiju γ -glutamylcistein ligaze (GCL), ključnog enzima u metaboličkom putu biosinteze glutaciona. Ovi rezultati ukazuju na to da bi EGCG zelenog čaja mogao da ima preventivni i/ili terapijski potencijal u akutnoj bubrežnoj insuficijenciji izazvanoj GM obzirom na to da pojačava endogenu antioksidativnu odbranu ćelije povećavanjem rezervi glutaciona i smanjivanjem učestalosti apoptoze uzrokovane oksidativnim i nitroaktivnim stresom.

Rezultati patohistološke analize tkiva bubrega GT+GM grupe pokazali su da zeleni čaj deluje zaštitno i na morfološka oštećenja bubrega. Sprečio je većinu patohistoloških promena uzrokovanih GM. Glomeruli pacova u ovoj grupi bili su normalne strukture, tubularna degeneracija bila je ublažena, a zapaljenski infiltrati u intersticijumu svedeni na blag do umeren nivo. Važno je istaći da u ovoj grupi nisu zabeleženi znaci ireverzibilnog oštećenja bubrega u vidu nekroze i prekida bazalne membrane tubula. Nije uočeno ni prisustvo hijalinih cilindara. Morfometrijska analiza kvantifikovala je ove histološke nalaze. Zeleni čaj je olakšao kongestiju glomerula izazvanu GM ($p < 0.001$). Povećana površina proksimalnih tubula je smanjena ali ne statistički značajno, što ukazuje da je epitel tubula obnovljen do neke mere, ali verovatno je potrebno duže davati zeleni čaj radi postizanja značajnijih efekata. GT+GM grupa je imala smanjenu cirkularnost jedara u poređenju sa GM grupom, iako ne značajno, najverovatnije zbog malog uzorka. To možemo objasniti time što se limfociti zamenjuju fibroblastima, koji imaju veće, eliptično i euhromatsko jedro. Ovi novoformirani fibroblasti su verovatno započeli ublažavanje zapaljenskog procesa. Kako fibroblasti predstavljaju veće ćelije od limfocita, ovo bi takođe moglo da objasni veću površinu jedara intersticijumskih ćelija GT+GM grupe u odnosu na GM grupu.

Postoji nekoliko mehanizama koji mogu objasniti znatno smanjenje strukturnog oštećenja bubrega usled suplementacije zelenim čajem. U mnogim akutnim zapaljenskim stanjima neutrofili koji migriraju na mesto zapaljenja sekretuju agense koji mogu da oštete zdrave ćelije i okolno vezivno tkivo (Reiter i sar., 2000). U pregledu literature smo već naglasili da su oksidativni stres i zapaljenje stanja koja jedno drugo okidaju i pojačavaju i vremenom vode u *circulus vitiosus*. Tokom ovih stanja i mezangijalne ćelije i neutrofili luče hemoatraktante koji dalje privlače nove neutrofile u bubreg i povećavaju njegovo oštećenje (Reiter i sar., 2000). Međutim, u intersticijumu bubrega pacova koji su primali i GM i zeleni čaj zapaljenje je bilo znatno manje u odnosu na one koji su primali samo GM. Ovo smanjenje zapaljenja potvrđeno je i morfometrijskom analizom. Katehini zelenog čaja, za koje je dokazano da imaju antiinflamatorno dejstvo, na više načina inhibiraju infiltraciju zapaljenskih ćelija u bubreg pacova i time sprečavaju oštećenje tkiva.

U normalnom tkivu bubrega stvaranje TXA_2 i prostaciklina PGI_2 je kontrolisano, a ravnoteža između njih je važna za održavanje homeostaze organizma. Izmena odnosa PGI_2 i TXA_2 ubrzava stvaranje tromba u bubrežnom intersticijumu povećavajući rizik za oštećenje funkcije i razvoj ateroskleroze. Stvaranje ovih molekula zavisi od aktivnosti fosfolipaze A2 i sastava masnih kiselina. Gentamicin povećava stvaranje TXA_2 , smanjuje stvaranje PGI_2 , čime remeti perfuziju bubrega, što je jedan od mehanizama njegove nefrotoksičnosti. Davanje zelenog čaja pacovima tretiranih gentamicinom smanjuje stvaranje TXA_2 i povećava stvaranje PGI_2 i na taj način vraća njihov odnos na onakav kakav je kod pacova koji ne primaju GM. Katehini zelenog čaja popravljaju funkciju bubrega svojom antitrombogenom aktivnošću, što za uzvrat kontroliše kaskadni sistem arahidonske kiseline. To takođe dovodi do povećanja glomerulske filtracije, koja je inicijalno bila narušena GM (Rhee i sar., 2002; Crespy i Williamson, 2004).

Efekat borovnice na akutnu bubrežnu insuficijenciju pacova izazvanu gentamicinom

U cilju istraživanja mogućih zaštitnih efekata borovnice na oksidativni stres i nefrotoksičnost izazvane gentamicinom, ispitivali smo da li davanje metanolnog ekstrakta borovnice u koncentraciji 100 mg/kg TT dnevno tokom 15 dana utiče na funkcionalna, strukturna i morfometrijska oštećenja bubrega opisana kod životinja tretiranih GM.

Naše istraživanje ima dva dela. Prvi deo proučava antioksidativni potencijal i hemijski sastav ekstrakta borovnice. Antioksidativnu aktivnost našeg ekstrakta potvrdili smo *in vitro* i *in vivo*, što bi moglo da posluži kao jedno od objašnjenja mogućeg zaštitnog efekta u oštećenju bubrega izazvanim oksidativnim stresom (Fitzmaurice i sar., 2011; Pavlović i sar., 2013). Polifenoli su uključeni u ovu studiju zbog činjenice da ovi sekundarni metaboliti biljaka sve više ulaze u fokus novijih istraživanja zbog svojih korisnih efekata po zdravlje. Fenolna jedinjenja su se dugo koristila kao prirodni lekovi u terapiji oboljenja urinarnog trakta (Szajdek i Borowska, 2008). Zabeleženi renoprotektivni efekat ekstrakta borovnice protiv oksidativnog oštećenja izazvanim gentamicinom se najverovatnije javlja zbog antioksidativnog dejstva njegovih sastojaka, uglavnom antocijana, što se slaže sa studijom Valentove i sar. (2007) na jetri eksperimentalnih životinja tretiranih borovnicom. Postoji nekoliko unutrašnjih i spoljašnjih faktora koji utiču na kvalitet i sastav antocijana kod različitih bobica. Oni uključuju genetsku varijabilnost kao i brojne faktore spoljašnje sredine poput intenziteta svetlosti, vlažnosti, temperature, korišćenja đubriva i pesticida, prisustva oštećenja ili infekcija na plodu i ostalih stresogenih faktora (Kähkönen i sar., 2003). Može i sar. (2011) su otkrili povećan trend u biosintezi antocijana u zemljama Severne Evrope, kao i u predelima sa nadmorskom visinom preko 650 m. Ova akumulacija povezana sa visinom je naročito značajna za sadržaje definidina i malvidina, dok za sadržaje cijanidina i peonidina nije toliko izražena. Borovnice su bogatije antocijanima nego ostalo bobičasto voće kao što su crna i crvena ribizla, jagode, brusnice, kupine i maline (Heinonen, 2007, Konić-Ristić i sar., 2011). Kod bobica antocijani počinju da se sintetišu na početku sazrevanja kada se zapaža velika aktivnost određenih enzima fenilpropanoidnog puta, a

nastavljaju da se nagomilavaju tokom sazrevanja (Slatnar i sar., 2012). Ukupan sadržaj antocijana u našem metanolnom ekstraktu značajno je viši nego što predviđaju minimalni zahtevi iz farmakopeje od 0.3 % antocijana izraženih kao cijanidin-3-glukozid hlorid u suvom plodu borovnice (Ph. Eur. 7.0., 2011). Antocijani su hidrosolubilni pigmenti borovnice odgovorni za tamno ljubičastu boju njenog ploda i veliki deo efekata koje borovnice ispoljavaju na zdravlje. Kako predstavljaju većinski deo fenolnih jedinjenja borovnice, bezbedno je zaključiti da je antioksidativna aktivnost ovog ekstrakta postignuta pre svega njegovim antocijanima. Ključna korist njihovog antioksidativnog dejstva je da doprinose zaštitnom efektu u borbi protiv degenerativnih i hroničnih bolesti (Castaneda-Ovando i sar., 2009; Bornsek i sar., 2012). HPLC analiza pokazuje da su delfinidin i cijanidin glikozidi najzastupljeniji antocijani u našem ekstraktu borovnice. Dokazano je da imaju jaču antioksidativnu aktivnost od malvidina i njegovih glikozida (Bornsek i sar., 2012). Iako su fenolna jedinjenja borovnice najpoznatija po svojoj antioksidativnoj aktivnosti, noviji podaci ukazuju da je zapravo njihovo antiinflamatorno dejstvo odgovorno za smanjen kardiovaskularni rizik i prevenciju metaboličkih poremećaja. I antocijani i proantocijanidini smanjuju zapaljenje preko NF kappa B i TNF- α puteva (Esposito i sar., 2014) koje je prisutno kod pacova tretiranih GM kao posledica oksidativnog stresa.

Ukupni sadržaji polifenola, tanina i fenilpropanoide u našem ekstraktu su bili značajni. Sadržaj fenilpropanoide je određivan zbog činjenice da ovi biljni sekundarni metaboliti poseduju značajno antiinflamatorno, antimikrobno, citoprotektivno dejstvo i ubrzavaju zarastanje rana. Oni ublažavaju zapaljenje tako što deluju kao antioksidansi, heliraju gvožđe, indukuju glutathion-S-transferazu i stimulišu regeneraciju tkiva (Korkina, 2007).

Hlorogenska kiselina, koja je u značajnoj količini prisutna i u našem ekstraktu, ispoljava antiinflamatornu (Shan i sar., 2009), antiedematoznu (Dos Santos i sar., 2006), antinociceptivnu aktivnost (Shan i sar., 2009) i snažno inhibiše mikrozomalnu lipidnu peroksidaciju (Korkina, 2007). Putem ovih aktivnosti ona se verovatno suprotstavlja *circulus vitiosus*-u masivnog intersticijskog zapaljenja i oksidativnog stresa pacova kojima je davan GM, pri čemu svako od ovih patoloških stanja počinje i pojačava ono drugo. Hlorogenska kiselina bi jednim delom mogla biti odgovorna za *in vivo* efekte zabeležene u našoj studiji.

Rezultati biohemijske analize krvi životinja B+GM grupe bili su u skladu sa njihovim patohistološkim i morfometrijskim nalazom. Kontinuitet bazalne membrane glomerula i tubula nije bio narušen što ukazuje da nema znakova ireverzibilnih promena. Degeneracija parenhima je

znatno manje izražena, dok su zapaljenski infiltrati u intersticijumu svedeni na samo blag nivo. Glomerulska površina smanjena je u odnosu na GM grupu, ali ne statistički značajno, moguće zbog malog uzorka. Površina proksimalnih i distalnih tubula bila je manja u odnosu na GM grupu, što objašnjavamo time da je davanje borovnice smanjilo hipertrofiju i edem tubula i ima odličan zaštitni efekat na njih, dok ne sprečava u potpunosti promene glomerula nastale usled oštećenja glomerulske kapilarne mreže. U nekom od narednih eksperimenata duže davanje borovnice bi možda bilo uspešnije u prevenciji glomerulskih promena izazvanih GM. Izmene distalnih tubula, koje su verovatno nastale sekundarno usled izmena proksimalnih, su takođe ublažene borovnicom. Masivni mononuklearni zapaljenski infiltrat u intersticijumu GM grupe predstavljen je povećanom cirkularnošću jedara intersticijumskih ćelija u odnosu na kontrolu, što ukazuje na prisustvo limfocita. Borovnica je očigledno imala antiinflamatorni efekat jer je značajno smanjila cirkularnost B+GM grupe u poređenju sa GM grupom ($p < 0.001$). Najverovatnije objašnjenje je da su limfociti zamenjeni fibroblastima koji poseduju veliko, eliptično i euhromatsko jedro i prisutni su u ranoj fazi oporavka od zapaljenja.

Naši rezultati jasno pokazuju da GM izaziva oksidativni stres jer znatno povećava MDA i AOPP, a smanjuje katalazu u odnosu na kontrolu. Zato smo ispitivali uticaj borovnice na MDA kao parametra lipidne peroksidacije u tkivu bubrega i utvrdili da su njene vrednosti znatno manje u B+GM grupi životinja u odnosu na grupu koja je tretirana samo GM. Slično stanje je i sa AOPP, pokazateljem nivoa oksidisanih proteina i zapaljenja (Witko-Sarsat i sar., 2003). AOPP je bio značajno manji kod istovremenog davanja borovnice i GM u odnosu na tretiranje samo GM. Kako je značajno povećala nivo katalaze u odnosu na GM grupu, mogli bismo zaključiti da je ishrana borovnicom korisna za održavanje aktivnosti endogenih antioksidativnih enzima.

Naši rezultati su u skladu sa zaključcima Valentove i sar. (2007) koji su ispitivali citoprotektivni efekat ekstrakta borovnice na oksidativno oštećenje hepatocita pacova. Zabeležen citoprotektivni efekat borovnice nastao je najverovatnije usled antioksidativnih svojstava njenih sastojaka, pre svega antocijana. Joshi i sar. (2000) su dokazali zaštitni efekat proantocijanidina ekstrakta grožđa na ćelije jetre. Njihovi rezultati podržavaju upotrebu borovnice i njenih ekstrakata kao funkcionalne hrane i suplemenata namenjenih prevenciji hroničnih bolesti udruženih sa oksidativnim stresom.

Esposito i sar. (2014) su objavili da malvidin-3 glukozid, u koncentracijama koje se mogu postići u digestivnom traktu i portnoj cirkulaciji, inhibiše aktivaciju ključnih proinflamatornih gena

usled pojave nekog zapaljenjskog stimulusa. Ovi geni imaju centralnu ulogu u regulaciji transkripcionih faktora i citokina koji su prisutni kod akutnog i hroničnog zapaljenja. Njihovi rezultati sugerišu da bi ishrana bogata malvidin-3-glukozidom mogla da poboljša ishod imunih i metaboličkih poremećaja udruženih sa produženim trajanjem zapaljenja. Bobičasto voće sa većim sadržajem cijanidina i peonidina češće ispoljava antiinflamatorni efekat u organizmu (Fang i sar., 2015).

Shi i sar. (2014) su ispitivali da li antocijani borovnice mogu da štite od ciklofosfamidom izazvanog oštećenja jetre. Kako ciklofosfamid slično gentamicinu izaziva oštećenje organa putem oksidativnog stresa, i on je doveo do povećanja sličnih parametara kao i GM. Naime, povećao je nivo proinflamatornih citokina, a smanjio nivo antiinflamatornih kao i apoptozu ispitivanih ćelija, što je dokazano indirektno, putem povećanja proapoptičnih gena. Antocijani su i u ovom slučaju imali zaštitni efekat i izazvali inhibiciju zapaljenja i apoptoze, antiinflamatornim i antioksidativnim dejstvom.

Bertuglia i sar. (1995) su utvrdili da antocijani borovnice štite od oštećenja zida krvnog suda nakon ponovnog uspostavljanja cirkulacije posle ishemije. Mehanizmi kojima to čine su: smanjivanje adherencije leukocita za zid krvog suda, sprečavanje stvaranja medijatora zapaljenja, očuvanje endotela i poboljšanje kapilarne perfuzije. Kako je jedan od mehanizama GM nefrotoksičnosti narušavanje perfuzije bubrega i oštećenje kapilarne mreže, može se zaključiti da je i jedan od mehanizama kojima borovnica štiti od ove nefrotoksičnosti taj što se suprotstavlja vaskularnim štetnim efektima GM.

Kako antocijani deluju unutar ćelije kao tako moćni antioksidansi u GM nefrotoksičnosti? Bornsek i sar. (2012) tvrde da po njihovom ulasku u ćeliju, endogeni antioksidantni sistemi organizma stupaju na snagu. Tu spadaju pre svega enzimi, čija se aktivnost povećava. Kakvi god mehanizmi bili uključeni, podaci njihovih istraživanja ukazuju da čak i veoma niske koncentracije, kao što su one prisutne u plazmi nakon konzumiranja uobičajene porcije borovnica (1 nM), mogu da dovedu do izvanredne antioksidativne aktivnosti na nivou ciljnih tkiva ili organa. Antocijani unešeni ishranom takođe smanjuju oksidativni stres u HepG2 ćelijama, što ukazuje da postoji mogućnost da se i oni transportuju u ćelije (Vanzo i sar., 2011). Cijanidin-3-glukozid, dat i.v. kako bi se zaobišla crevna barijera, brzo preuzimaju i jetra i bubrezi ali ga i brzo metabolišu i vraćaju nazad u plazmu. Nešto kasnije, zapaža se efikasnija

ekskrecija putem žuči i urina (Bornsek i sar., 2012). Ovi podaci ukazuju da bi antocijani mogli biti ne samo efikasni antioksidansi, već i hepato i renoprotektivni agensi.

Karlsen i sar. (2010) su ispitivali efekte soka borovnice na biomarkere zapaljenja u serumu i plazmi i antioksidantni status kod osoba sa barem jednim faktorom rizika za kardiovaskularne bolesti, kao predstavnicima stanja hroničnog zapaljenja. Ubacivanje soka borovnice u ishranu izazvalo je značajni pad koncentracije C-reaktivnog proteina, interleukina (IL)-6, IL-15 i monokina indukovanih interferonom $INF-\gamma$ (MIK). Neočekivano, u njihovoj studiji došlo je do porasta u plazma koncentraciji $TNF-\alpha$ kod osoba koje su unosile borovnicu. Kod ovih osoba su zabeleženi i povišeni nivoi kvercetina i kumarinske kiseline. Osim toga, nikakve druge razlike nisu zabeležene što se tiče kliničkih parametara, oksidativnog stresa ili antioksidativnog statusa.

ZAKLJUČAK

Utvrđeno je prisustvo značajnih količina fenolnih jedinjenja – sekundarnih biljnih metabolita sa antioksidativnom aktivnošću: polifenola, flavonoida, tanina i fenilpropanoida u ekstraktima zelenog čaja i borovnice, a kod slučaju borovnice i antocijana. U ekstraktu borovnice HPLC analizom je identifikovano 15 antocijana (glikozida delfinidina, cijanidina, petunidina, peonidina i malvidina). Detaljna analiza pojedinačnih antocijana u svežim borovnicama potvrdila je da su delfinidin i cijanidin najzastupljeniji aglikoni.

I ekstrakt zelenog čaja i ekstrakt borovnice ispoljavaju snažnu antioksidativnu aktivnost u dva primenjena komplementarna test sistema (DPPH i inhibicija lipidne peroksidacije u lipozomima), iako je efekat zelenog čaja izraženiji.

Vrednosti kreatinina u serumu GM gupe statistički su značajno veće od vrednosti kreatinina kontrolne grupe ($p < 0.001$). Vrednosti kreatinina grupa GT+GM i B+GM bile su statistički značajno niže ($p < 0.001$) od istih u GM grupi.

Vrednosti ureje u serumu GM grupe pacova su statistički značajno veće od vrednosti ureje kontrolne grupe ($p < 0.001$), kao i grupa GT+GM i B+GM.

Vrednosti MDA u tkivu bubrega GM grupe su statistički značajno veće od vrednosti kontrolne grupe ($p < 0.001$). Vrednosti MDA grupa GT+GM i B+GM su statistički značajno niže od vrednosti MDA u GM grupi ($p < 0.001$).

Vrednosti AOPP u tkivu bubrega GM grupe su bile statistički značajno veće od vrednosti kontrolne grupe ($p < 0.001$). Vrednosti AOPP grupa GT+GM i B+GM su bile statistički značajno niže od vrednosti MDA GM grupe ($p < 0.001$).

Vrednosti katalaze u tkivu bubrega GM grupe su bile statistički značajno niže od vrednosti kontrolne grupe ($p < 0.001$). Vrednosti katalaze grupa GT+GM i B+GM su bile statistički značajno više od vrednosti katalaze GM grupe ($p < 0.001$).

Strukturne promene i oštećenja u tkivu bubrega bile su najizraženije kod GM grupe, dok je suplementacija zelenim čajem (GT+GM) ili borovnicom (B+GM) znatno ublažila ove promene.

Površina glomerula GM grupe statistički je značajno viša u odnosu na površinu kontrolne grupe ($p < 0.001$), kao i grupe GT+GM ($p < 0.05$).

Površina epitela proksimalnih tubula GM grupe bila je statistički značajno viša u odnosu na površinu kontrole ($p < 0.001$). Ovaj parameter kod B+GM bio je statistički značajno niži ($p < 0.01$) u odnosu na GM grupu, dok je kod GT+GM grupe takođe bio niži, ali ne statistički značajno.

Površina epitela distalnih tubula GM grupe bila je statistički značajno viša u odnosu na onu kod kontrole ($p < 0.001$). Ovaj parameter kod B+GM bio je statistički značajno niži ($p < 0.01$) u odnosu na GM grupu, dok je kod GT+GM grupe nije pokazivao statističku značajnost.

Površina jedara intersticijskih ćelija GM grupe bila je statistički značajno niža u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$). Ova vrednost B+GM grupe bila je statistički značajno viša u odnosu na GM ($p < 0.05$), dok je kod GT+GM takođe bila viša, ali ne statistički značajno.

Cirkularnost jedara intersticijskih ćelija GM grupe bila je viša od cirkularnosti jedara intersticijskih ćelija kontrole ali ne statistički značajno. Ove vrednosti kod GT+GM i B+GM grupa su bile statistički značajno niže od vrednosti GM grupe ($p < 0.05$ i $p < 0.001$).

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da primena zelenog čaja i borovnice kod pacova sa akutnom bubrežnom insuficijencijom izazvanom gentamicinom ima zaštitni efekat i umanjuje strukturna i funkcionalna oštećenja.

LITERATURA

Abd-El Latif HA, Ibrahim SS, El-Yamany MF, Ali MA, Abass MM. 2008. Amelioration of gentamicin-induced nephrotoxicity by vitamin B6 in Wistar rats. *Egypt J Biochem Mol Biol* 26: 133-49.

Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Attia FF. 1999. Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 40(2): 183-7.

Abdel-Raheem IT, El-Sherbiny GA, Taye A. 2010. Green tea ameliorates renal oxidative damage induced by gentamicin in rats. *Pak J Pharm Sci* 23(1): 21-28.

Acharya C, Thakar H, Vajpeyee. 2013. A study of oxidative stress in gentamicin induced nephrotoxicity and effect of antioxidant vitamin C in Wistar rats. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 3(1): 14-20.

Ali BH. 2003. Agents ameliorating or augmenting experimental gentamicin nephrotoxicity: some recent research. *Food Chem Toxicol* 41: 1447-1452.

Ali BH, Al Za`abi MA, Blunden G, Nemmar A. 2011. Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: amini-review of recent research. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109: 225-232.

Ali BH, Bashir AA. 1994. Effect of fish oil treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Ann Nutr Metab* 38(6): 336-9.

Akyol S, Ugurcu V, Altuntas A, Hasgul R, Cakmak O, Akyol O. 2014. Caffeic acid phenethylester as a protective agent against nephrotoxicity and/or oxidative kidney damage: a detailed systematic review. *Sci World J* doi: 10.1155/2014/561971.

Assael BM, Chiabrando C, Gagliardi L, Nosedo A, Bamonte F, Salmona M. 1985. Prostaglandins and aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 78(3): 386-94.

Awodele O, Tomoye OP, Quashie NB, Amagon KI, Ogunnowo SA. 2015. Gentamicin nephrotoxicity: animal experimental correlate with human pharmacovigilance outcome. *Biomed J* 38(2): 125-130.

- Bae EH, Kim IJ, Joo SY, Kim EY, Choi JS, Kim CS, Ma SK, Lee JU, Kim, SW. 2013. Renoprotective effects of the direct renin inhibitor aliskiren on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Renin Angiotens Aldosterone Syst* 15(4): 1-14.
- Balakumar P, Chakkarwar V, Kumar V, Jain A, Reddy J, Singh M. 2008. Experimental models for nephropathy. *J Renin Angiotens Aldosterone Syst* 9: 189-195.
- Balakumar P, Rohilla A, Thangathirupathi A. 2010. Gentamicin-induced nephrotoxicity: do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol Res* 62: 179-86.
- Balasubramanian S, Efimova T, Eckert RL. 2002. Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 277(3): 1828-36.
- Bayer J, Gomer A, Demir Y, Amano H, Kish DD, Fairchild R, Heeger PS. 2004. Effects of green tea polyphenols on murine transplant-reactive T cell immunity. *Clin Immunol* 110(1): 100-8.
- Beauchamp D, Laurent G, Grenier L, Gourde P, Zanen J, Heuson-Stiennon JA, Bergeron MG. 1997. Attenuation of gentamicin-induced nephrotoxicity in rats by fleroxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 41(6): 1237-1245.
- Benedet JA, Shibamoto T. 2008. Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II) and Cd(II), in lipid peroxidation. *Food Chem* 107: 165-168.
- Bertino JS, Rotschafer JC. 1997. Single daily dosing of aminoglycosides: A concept whose time has not yet come. *Clin Infect Dis* 24: 820-823.
- Bertuglia S, Malandrino S, Colantuoni A. 1995. Effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on ischaemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Pharmacol Res* 31(3-4): 183-7.
- Bledsoe G, Crickman S, Mao J, Xia CF, Murakami H, Chao L, *et al.* 2006. Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrol Dial Transplant* 21: 624-633.

- Chiarugi A. 2005. 'Simple but not simpler': toward a unified picture of energy requirements in cell death. *FASEB J* 19: 1783-8.
- Chwieralski CE, Welte T, Buhling F. 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* 11: 143-149.
- Cojocel C, Docu N, Ceacmacudis E, Baumann K. 1984. Nephrotoxic effects of aminoglycoside treatment on renal protein reabsorption and accumulation. *Nephron* 37(2): 113-9.
- Conway BP, Tabatabay CA, Peter A, Campochiaro PA, D'Amico DJ, Hanninen LA; Kenyon KR. 1989. Gentamicin toxicity in the primate retina. *Arch Ophthalmol* 107(1): 107-112.
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, Dyatmiko W. 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* 80: 1144–1152.
- Currier BL, Banovac K, Eismont FJ. 1994. Gentamicin penetration into normal rabbit *nucleus pulposus*. *Spine* 19(23): 2613-2728.
- Crespy V, Williamson G. 2004. A review of the health effects of green tea catechins in *in vivo* animal models. *J Nutr* 134: 3431s-34405s.
- Cronin RE, Thompson JR. 1991. Role of potassium in the pathogenesis of acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 17(2): 100-5.
- De-Barros-e-Silva ML, Varanda WA, Lachat JJ, Alves-da-Silva CG, Coimbra TM. 1992. Glomerular permeability to macromolecules in gentamicin-treated rats. *Braz J Med Biol Res* 25: 409-417.
- Dhodi JB, Thanekar DR, Mestry SN, Juvekar AR. 2015. *Carissa carandas* Linn. Fruit ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats via attenuation of oxidative stress. *J Acute Dis* 135-140.
- Didry N, Seidel V, Dubreuil L, Tillequin F, Bailleul F. 1999. Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. *J Ethnopharmacol* 67: 197-202.

- Dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, Schor N. 1991. Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 40: 742-747.
- Dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, De Souza GEP. 2006. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull* 29(11): 2236-2240.
- Edwards JR, Diamantakos EA, Peuler JD, Lamar PC, Prozialeck WC. 2007. A novel method for the evaluation of proximal tubule epithelial cellular necrosis in the intact rat kidney using ethidium homodimer. *BMC Physiol* 7: 1.
- El-Ashmawy IM, El-Nahas A, Salama OM. 2006. Grape Seed Extract Prevents Gentamicin-Induced Nephrotoxicity and Genotoxicity in Bone Marrow Cells of Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99: 230-236.
- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Henryk S, Taper H, Cumps J, Tulkens PM. 2000. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 44(3): 665-675.
- Elhalwagy MEA, Darwish NS, Zaher EM. 2008. Prophylactic effect of green tea polyphenols against liver and kidney injury induced by fenitrothion insecticide. *Pest Biochem Physiol* 91: 81-89.
- Esposito D, Chen A, Grace MH, Komarnytsky S, Lila MA. 2014. Inhibitory effect of wild blueberry anthocyanins and other flavonoids on biomarkers of acute and chronic inflammation in vitro. *J Agric Food Chem* 62: 7022-7028.
- European Pharmacopoeia, 7th edition (Ph. Eur. 7.0), Council of Europe, Strasbourg, 2011.
- Fang J. 2015. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition* 31: 1301-1306.
- Feyissa T, Asres K, Engidawork E. 2013. Renoprotective effects of the crude extract and solvent fractions of the leaves of *Euclea hierns* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Ethnopharm* 145: 758-766.

- Fitzmaurice SD, Sivamani RK, Isseroff RR. 2011. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin Pharmacol Physiol* 24: 113-126.
- Forstermann U. 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Arch* 459: 923-939.
- Fujiki H, Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Imayoshi Y, Taniguchi S, Yoshida T. 2003. New TNF-alpha releasing inhibitors as cancer preventive agents from traditional herbal medicine and combination cancer prevention study with EGCG and sulindac or tamoxifen. *Mutat Res* 523-524: 119-25.
- Fukumoto LR, Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48: 3597-3604.
- Geleilate TJ, Melo GC, Costa RS, Volpini RA, Soares TJ, Coimbra TM. 2002. Role of myofibroblasts, macrophages, transforming growth factor-beta endothelin, angiotensin-II, and fibronectin in the progression of tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *J Nephrol* 15: 633-642.
- Gescher K, Hensel A, Hafezi W, Derksen A, Kühn J. 2011. Oligomeric proanthocyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of *Herpes simplex* virus type-1. *Antiviral Res* 89(1): 9-18.
- Gheng TO. 2006. All teas are not created equal: The Chinese green tea and cardiovascular health. *Int J Cardiol* 108: 301-308.
- Gilbert DN. 1997. Meta-analyses are no longer required for determining the efficacy of single daily dosing of aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 24: 816-819.
- Goldstein P, Kroemer G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32: 37-43.
- Gonzalez US, Spencer JP. 1998. Aminoglycosides: a practical review. *Am Fam Physician* 58(8): 1811-1820.

- Goth L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision reference range. *Clin Chim Acta* 196: 143–151.
- Graziose R1, Lila MA, Raskin I. 2010. Merging traditional Chinese medicine with modern drug discovery technologies to find novel drugs and functional foods. *Curr Drug Discov Techno* 17(1): 2-12.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci* 899: 136-147.
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141: 312-322.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: 572-584.
- Heinonen M. 2007. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - A Finnish perspective. *Mol Nutr Food Res* 51(6): 684-691.
- Hines J, Viores SA, Campochiaro PA. 1993. Evolution of morphologic changes after intravitreal injection of gentamicin. *Curr Eye Res* 12: 521-529.
- Hsu SD, Dickinson DP, Qin H, Borke J, Ogbureke KU, Winger JN, Camba AM, Bollag WB, Stöppler HJ, Sharawy MM, Schuster GS. 2007. Green tea polyphenols reduce autoimmune symptoms in a murine model for human Sjogren's syndrome and protect human salivary acinar cells from TNF-alpha-induced cytotoxicity. *Autoimmunity* 40(2): 138-47.
- Hunt KJ, Hung SK, Ernst E. 2010. Botanical extracts as anti-aging preparations for the skin: a systematic review. *Drugs Aging* 27(12): 973-85.
- Hutchin T, Cortopassi G. 1994. Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2517-2520.
- Joseph SV, Edirisinghe I, Burton-Freeman BM. 2014. Berries: anti-inflammatory effects in humans. *J Agric Food Chem* 62: 3886-3903.

- Joshi SS, Kuszynski CA, Bagchi M, Bagchi D. 2000. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. *Toxicol* 155(1-3): 83-90.
- Kacew S, Bergeron MG. 1990. Pathogenic factors in aminoglycoside induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 51: 241-259.
- Kähkönen MP, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M. 2003. Anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J Sci Food Agr* 83(14): 1403-1411.
- Kakailij RM, Alla CP, Kshirsagar RP, Kumar BH, Mutha SS, Diwan PV. 2014. Ameliorative effect of *Elaeocarpus ganitrus* on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Indian J Pharmacol* 46(3): 298-302.
- Kaloyanides GJ, Pastoriza-Munoz E. 1980. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int* 8: 571-582.
- Karkar A. 2008. Modulation of renal inflammation: therapeutic strategies. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 19: 1-19.
- Karlsen A, Paur I, Bøhn SK, Amrit K, Sakhi AK, Borge GI, Serafini M, Erlund I, Laake P, Tonstad S, Blomhoff R. 2010. Bilberry juice modulates plasma concentration of NF- κ B related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *Eur J Nutr* 49(6): 345-55.
- Khan SA, Priyamvada S, Farooq N, Khan S, Khan W, Yusufi ANK. 2009. Protective effect of green tea extract on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Pharmacol Res* 59(4): 254-262.
- Kim CY, Lee C, Park GH, Jang JH. 2009. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against β -amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death via augmentation of antioxidant defense capacity. *Arch Pharm Res* 32(6): 869-881.
- Kim HS, Quon MJ, Kim JA. 2014. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biol* 10(2): 187-95.

- Kim YK, Choi TR, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS. 2003. Beneficial effect of pentoxifylline on cisplatin-induced acute renal failure in rabbits. *Ren Fail* 25(6): 909-22.
- Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, De Groot A, Evstatieva LN. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Analysis* 13: 8–17.
- Konić-Ristić A, Šavikin K, Zdunić G, Janković T, Juranic Z, Menković N, Stanković I. 2011. Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chem* 125: 1412-1417.
- Korkina LG. 2007. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell Mol Biol* 53(1): 15-25.
- Kovačević N. 2002. *Osnovi farmakognozije*. Srpska školska knjiga, Beograd.
- Koyner J, Sher Ali R, Murray P. 2008. Antioxidants. Do they have a place in the prevention or therapy of acute kidney injury? *Nephron Exp Nephrol* 109(4): 109-17.
- Koyner JL, Sher Ali R, Murray PT. 2008. Antioxidants. Do they have a place in the prevention or therapy of acute kidney injury? *Nephron Exp Nephrol* 109: e109-e117.
- Lamaison JL, Carnat A. 1990. Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C.) en fonction de la vegetation. *Pharm Acta Helv* 65: 315-320.
- Laurent G, Carlier MB, Rollman B, Van Hoof F, Tulkens P. 1982. Mechanism aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochem Pharmacol* 31: 3861-3870.
- Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM. 1990. Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 40: 2383-2392.
- Lawrence T. 2009. The nuclear factor NF-kappa B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (6): a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651.

- Lee KW, Bode AM, Dong Z. 2011. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 11(3): 211-8.
- Leung JC, Marphis T, Craver RD, Silverstein DM. 2004. Altered NMDA receptor expression in renal toxicity: protection with a receptor antagonist. *Kidney Int* 66: 167-176.
- Li J, Li QX, Xie XF, Ao Y, Tie CR, Song RJ. 2009. Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin-induced renal tubular toxicity in rats. *Eur J Pharmacol.* 620(1-3): 97-104.
- Li J, Li QX, Xie XF, Ao Y, Tie CR, Song RJ. 2009. Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin-induced renal tubular toxicity in rats. *Eur J Pharmacol* 620: 97-104.
- Lieberthal W, Levine JS. 1996. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271: F477-88.
- Lin YL, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. 1998. Theaflavin-3,3X-digallate from black tea blocks the nitric oxide synthase by down-regulating the activation of NF-kB in macrophages. *Eur J Pharmacol* 367: 379–388.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4(8): 118–126.
- Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. 2011. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 79: 33-45.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with folinphenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Makkar HPS, Hagerman A, Mueller-Harvey I. 2000. *Quantification on Tannins in Tree Foliage-A Laboratory Manual*. FAO/IAEA, Vienna.

- Martínez-Salgado C, Eleno N, Morales AI, Pérez-Barriocanal F, Arévalo M, López-Novoa JM. 2004. Gentamicin treatment induces simultaneous mesangial proliferation and apoptosis in rats. *Kidney Int* 65(6): 2161–2171.
- Martinez-Salgado C, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM. 2007. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol* 223: 86-98.
- Martinez-Salgado C, Rodriguez-Barbero A, Eleno N, Lopez-Novoa JM. 2005. Gentamicin induces Jun-AP1 expression and JNK activation in renal glomeruli and cultured mesangial cells. *Life Sci* 77: 2285-2298.
- Martinez-Salgado C, Rodriguez-Barbero A, Rodriguez-Puyol D, Perez de Lema G, Lopez-Novoa JM. 1997. Involvement of phospholipase A2 in gentamicin-induced rat mesangial cell activation. *Am J Physiol* 273: F60-66.
- McCord JM. 2000. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med* 108: 652–659.
- Meyer As, Donovan JL, Pearson DA, Waterhouse AI, Frankel EN. 1998. Fruit hydroxyl cinnamic acid inhibit human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. *J Agric Food Chem* 46: 1783-1787.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs DA. 1992. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109–142.
- Morales AI, Buitrago JM, Santiago JM, Fernandez-Tagarro M, Lopez-Novoa JM, Perez-Barriocanal F. 2002. Protective effect of trans-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antioxid Redox Signal* 4: 893-898.
- Morales AI, Detaille D, Prieto M, Puente A, Briones E, Arevalo M, *et al.* 2010. Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. *Kidney Int* 77: 861-869.
- Moreira MA, Nascimento MA, Bozzo TA, Cintra A, da Silva SM, Dalboni MA, Mouro MG, Higa M. 2013. Ascorbic acid reduces gentamicin-induced nephrotoxicity in rats through the control of reactive oxygen species. *Clin Nutr* 33: 296-301.

- Može Š, Polak T, Gašperlin L, Koron D, Vanzo A, Poklar Ulrih N, Abram V. 2011. Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J Agric Food Chem* 59(13): 6998–7004.
- Myrdal SE, Johnson KC, Steyger PS. 2005. Cytoplasmic and intranuclear binding of gentamicin does not require endocytosis. *Hear Res* 204: 156-69.
- Nabavi SF, Nabavi SM, Moghaddam AH, Naqinezhad A, Bigdellou R, Mohammadzadeh S. 2012. Protective effects of *Allium paradoxum* against gentamicin-induced nephrotoxicity in mice. *Food Funct* 3: 28-29.
- Nagai J. 2006. Molecular mechanisms underlying renal accumulation of aminoglycoside antibiotics and mechanism-based approach for developing nonnephrotoxic aminoglycoside therapy. *Yakugaku Zasshi* 126(5): 327-35.
- Nagai J, Katsube T, Murakami T, Takano M. 2002. Effect of gentamicin on pharmacokinetics of lysozyme in rats: interaction between magalin substrates in the kidney. *J Pharm Pharmacol* 54: 1491-1496.
- Nagai J, Saito M, Adachi Y, Yumoto R, Takano M. 2006. Inhibition of gentamicin binding to rat renal brush-border membrane by megalin ligands and basic peptides. *J Control Release* 112: 43-50.
- Nagai J, Takano M. 2004. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab Pharmacokinet* 19(3): 159-70.
- Neugarten J, Aynedijan HS, Bank N. 1983. Role of tubular obstruction in acute renal failure due to gentamicin. *Kidney Int* 24: 330-335.
- Ngaha EO, Ogunleye IO. 1983. Studies on gentamicin-induced labilization of rat kidney lysosomes *in vitro*. Possible protection by selenium. *Biochem Pharmacol* 32: 2659-64.
- Nicolau DP, Freeman DC, Belliveau PP, Nightingale CH, Ross JW, Quintiliani R. 1995. Experience with a once-daily aminoglycoside program administered to 2184 patients. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 650-655.

- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
- Otunctemur A, Ozbek E, Cekmen M, Cakir SS, Dursun M, Polat EC, Somay A, Ozbay N. 2013. Protective effect of montelukast which is cysteinyl-leukotriene receptor antagonist on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Ren Fail* 35(3): 403-410.
- Papanikolaou N, Peros G, Morphake P, Gkikas G, Maraghianne D, Tsipas G, et al. 1992. Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45: 131-136.
- Paredes-Lopez O, Cervantes-Ceja ML, Vigna-Perez M, Hernandez-Perez T. 2010. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life – a review. *Plant Foods Hum Nutr* 65: 299-308.
- Parker RA, Bennett WM, Plamp CE, Houghton DC, Gilbert DN, Porter GA. 1980. Resistance of female rats to gentamicin nephrotoxicity. *Curr Chemother* 1: 601.
- Pavlović D. 2012. Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih biljnih vrsta rodova *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* Salisb. i *Erica* L. (Ericaceae) (disertacija). Beograd: Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Pavlović DR, Tasić-Kostov M, Marčetić M, Lakušić B, Kitić D, Savić S, Kovačević N. 2013. Evaluation of in vivo effects on surfactant-irritated human skin, antioxidant properties and phenolic composition of five Ericaceae species extracts. *Riv Ital Sostanze Gr* 90(4): 255-264.:
- Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macias-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, et al. 2004. S-allylmercaptocysteinescavanges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage *in vivo*. *BMC Clin Pharmacol* 30: 4-5.

- Pessoa EA, Convento MB, Silva RG, Oliveira AS, Borges FT, Schor N. 2009. Gentamicin-induced preconditioning of proximal tubular LLC-PK1 cells stimulates nitric oxide production but not the synthesis of heat shock protein. *Braz J Med Biol Res* 42(7): 614-620.
- Peyrou M, Hanna PE, Cribb AE. 2007. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. *Toxicol Sci* 99: 346-353.
- Peyrou M, Cribb AE. 2007. Effect of endoplasmic reticulum stress preconditioning on cytotoxicity of clinically relevant nephrotoxins in renal cell lines. *Toxicol In Vitro* 21: 878-886.
- Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Nuñez M J. 2005. A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol and grape extract cases. *Eur Food Res Technol* 221(3): 284-290.
- Porter GA 2013. *Nephrotoxic mechanisms of drugs and environmental toxins*. Springer Science & Business Media.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53: 4290-4302.
- Priyamvada S, Priyadarshini M, Arivarasu NA, Farooq N, Khan S, Khan SA, Khan W, Yusufi ANK. 2008. Studies on the protective effects of dietary fish oil on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Prostag Leukot Ess* 78: 369-381.
- Quideau S1, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 50(3): 586-621.
- Randjelovic P, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Velickovic Lj, Sokolovic D, Stoilkovic M, Ilic I. 2012. Protective effect of selenium on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 35(2): 141-148.
- Randelović P. 2013. *Protetktivni efekti selena i salicilne kiseline kod pacova sa akutnom insuficijencijom bubrega izazvanom gentamicinom (disertacija)*. Niš: Medicinski fakultet.

- Ranjbar A, Ghasmeinezhad S, Zamani H, Malekirad AA, Baiaty A, Mohammadirad A, Abdollahi M. 2006. Antioxidative stress potential of *Cinnamomum zeylanicum* in humans: a comparative cross-sectional clinical study. *Therapy* 3(1): 113-117.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 7(6): 444-58.
- Rhee SJ, Choi JH, Park MR. 2002. Green tea catechin improves microsomal phospholipase A2 activity and the arachidonic acid cascade system in the kidney of diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 11(3): 226-31.
- Rhone M, Basu A. 2008. Phytochemicals and age-related eye diseases. *Nutr Rev* 66(8): 465-72.
- Richi B, Kale RK, Tiku AB. 2012. Radio-modulatory effects of green tea catechin EGCG on pBR322 plasmid DNA and murine splenocytes against gamma-radiation induced damage. *Mutat Res* 747(1): 62-70.
- Rivas-Cabanero L, Garcia-Bastos JL, Arevalo M, Rodriguez-Barbero A, Lopez-Novoa JM. 1993. Effect of gentamicin treatment on glutamine and lactate metabolism by the renal cortex of the rat. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 101: 193-196.
- Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E. 2006. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 40: 619-630.
- Salem EA, Salem NA, Kamel M, Maarouf AM, Bissada NK, Hellstrom WJG, El Adl M. 2010. Amelioration of gentamicin nephrotoxicity by green tea extract in uninephrectomized rats as a model of progressive renal failure. *32(10): 1210-1215.*
- Sandoval RM, Molitoris BA. 2004. Gentamicin traffics retrograde through the secretory pathway and is released in the cytosol via the endoplasmic reticulum. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F617-F624.

Schmitz C, Hilpert J, Jacobsen C, Boensch C, Christensen EI, Luft FC, Willnow TE. 2002. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *J Biol Chem* 277: 618-622.

Schnellmann RG, Williams SW. 1998. Proteases in renal cell death: calpains mediate cell death produced by diverse toxicants. *Ren Fail* 20: 679-86.

Seçilmiş MA, Karataş Y, Yorulmaz Ö, Büyükaşar K, Şingirik E, Doran F, Inal TC, Dikmen A. 2005. Protective effect of L-arginine intake on the impaired renal vascular responses in the gentamicin-treated rats. *Nephron Physiol* 100: 13-20.

Servais H, Jossin Y, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. 2006. Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1213-1221.

Servais H, Ortiz A, Devuyst O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. 2008. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis* 13: 11-32.

Servais H, Van Der Smissen P, Thirion G, Van der Essen G, Van Bambeke F, Paul M, Tulkens, Mingeot-Leclercq MP. 2005. Gentamicin induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. *Toxicol Appl Pharmacol* 206: 321-333.

Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 9(9): 1042-1048.

Shi L, Liu Y, Tan D, Yan T, Song D, Hou M, Meng X. 2014. Blueberry anthocyanins ameliorate cyclophosphamide-induced liver damage in rats by reducing inflammation and apoptosis. *J Funct Food* 11: 71-81.

Silan C, Uzun O, Comunoglu NU, Gokcen S, Bedirhan S, Cengiz M. 2007. Gentamicin-induced nephrotoxicity in rats ameliorated and healing effects of resveratrol. *Biol Pharm Bull* 30: 79-83.

- Sitte N, Merker K, Von Zglinicki T, Davies KJ, Grune T. 2000. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II-aging of nondividing cells. *FASEB Journal* 14: 2503-2510.
- Slatnar A, Mikulic Petkovsek M, Halbwirth H, Stampar F, Stich K, Veberic R. 2012. Polyphenol metabolism of developing apple skin of a scab resistant and a susceptible apple cultivar. *Trees* 26(1): 109-119.
- Stojiljkovic N, Mihailovic D, Veljkovic S, Stoilkovic M, Jovanovic I. 2008. Glomerular basement membrane alterations induced by gentamicin administration in rats. *Exp Toxicol Pathol* 60: 69-75.
- Stojiljkovic N, Stoilkovic M, Mihailovic D, Randjelovic P, Ilic S, Gocmanac-Ignjatovic M, Veljkovic M. 2012. Beneficial effects of calcium oral coadministration in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail* 34(5): 622-627.
- Sue YM, Cheng CF, Chang CC, Chou Y, Chen CH, Juan SH. 2009. Antioxidation and antiinflammation by haem oxygenase-1 contribute to protection by tetramethylpyrazine against gentamicin-induced apoptosis in murine renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 24: 769-777.
- Surveswaran S, Cai Y-Z, Corke H, Sun M. 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* 102(3): 938-953.
- Swan SK, Kohlhepp SJ, Kohnen PW, Gilbert DN, Bennett WM. 1991. Long-term protection of polyaspartic acid in experimental gentamicin nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2591-2595.
- Syed DN, Afaq MHK, Hadi N, Bhatia N, Spiegelman VS, Mukhtar H. 2007. Green tea polyphenol EGCG suppresses cigarette smoke condensate-induced NF- κ B activation in normal human bronchial epithelial cells. *Oncogene* 26: 673-682.
- Szajdek A, Borowska EJ. 2008. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum Nutr* 63: 147-156.

Štajner D. 1990. Prilog poučavanju antioksidantnih jedinjenja pšenice. Disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Jugoslavija.

Tam VH, Kabbara S, Vo G, Schilling AN, Coyle EA. 2006. Comparative pharmacodynamics of gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 50(8): 2626-2631.

Tavafi M, Ahmadvand H. 2011. Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Tissue Cell* 43: 392-397.

Tavafi M. 2012. Inhibition of gentamicin-induced renal tubular cell necrosis. *J Nephropathology* 1(2): 83-86.

Tavafi M, Ahmadvand H, Toolabi P. 2012. Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iran J Kidney Dis* 6(1): 25-32.

Tavafi M. 2013. Protection of renal tubules against gentamicin induced nephrotoxicity. *J Renal Inj Prev* 2(1): 5-6.

Tilkian SM, Conover MB, Tilkian AG. 1995. *Clinical and Nursing Implications of Laboratory Tests*, Fifth Edition.

Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(2): 335-344.

Upaganlawar A, Farswan M, Rathod S, Balaraman R. 2006. Modification of biochemical parameters of gentamicin nephrotoxicity by Coenzyme Q10 and green tea in rats. *Iranian J Exp Biol* 44: 416-418.

Valdivieslo JM, Rivas-Cabanero L, Morales AI, Arevalo M, Lopez-Novoa JM, Perez-Barriocanal F. 1999. Increased renal glomerular endothelin-1 release in gentamicin-induced nephrotoxicity. *Int J Exp Pathol* 80: 265-70.

Valentova K, Ulrichova J, Cvak L, Simanek V. 2007. Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes. *Food Chem* 101: 912-917.

- Vanzo A, Vrhovsek U, Tramer F, Mattivi F, Passamonti S. 2011. Exceptionally fast uptake and metabolism of cyanidin 3-glucoside by rat kidneys and liver. *J Nat Prod* 74(5): 1049-54.
- Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlua. 2013. The protective effects of *Prunus armeniaca* L. (apricot) against methotrexate- induced oxidative damage and apoptosis in rat kidney. *J Physiol Biochem* 69: 371-381.
- Veberic R, Slatnar A, Bizjak J, Stampar F, Mikulic-Petrovsek M. 2015. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *Food Sci Technol* 60: 509-517.
- Veljković M, Ilić S, Stojiljković N, Veličković Lj, Pavlović D, Radenković M, Branković S, Kitić D, Ignjatović-Gočmanac M. 2015. Beneficial effects of green tea extract in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta Fac Med Naiss* 32: 51-58.
- Vergote D, Cren-Olive C, Chopin V, Toillon RA, Rolando C, Hondermarck H, Le Bourhis X. 2002. (-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts. *Breast Cancer Res Treat* 76: 195-201.
- Wang H, Cao G, Prior RL. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 44: 701-705.
- Wang D, Meng J, Xu K, Xiao R, Xu M, Liu Y, Zhao Y, Yao P, Yan H, Liu L. 2012. Evaluation of oral subchronic toxicity of Pu-erh green tea (*Camellia sinensis var. assamica*) extract in Sprague Dawley rats. *J Ethnopharmacol* 142: 836-844.
- Wickman G, Nessim Ma, Cook Da, Vollrath B. 2001. The polycationic aminoglycosides modulate the vasoconstrictive effects of endothelin: relevance to cerebral vasospasm. *Br J Pharmacol* 133: 5-12.
- Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuri RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer LK. 1991. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254: 1001–1003.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nquyen-Khoa T, Nquyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 49: 1304–1313.

- Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Drüeke T, Santangel, F, Descamps-Latscha B. 2003. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int* 64: 82-91.
- Wu D, Guo Z, Ren Z, Guo W, Meydani SN. 2009. Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. *Free Radic Biol Med* 47(5): 636-43.
- Yang CS, Lee MJ, Chen L. 1999. Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(1): 83-9.
- Yen GC, Chen HY. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 43: 27-32.
- Yin X, Quan J, Kanazawa T. 2008. Banana prevents plasma oxidative stress in healthy individuals. *Plant Foods Hum Nutr* 63: 71-76.
- Yu Y, Szczepek AJ, Haupt H, Mazurek B. 2009. Geldanamycin induces production of heat shock protein 70 and partially attenuates toxicity caused by gentamicin in the organ of Corti explants. *J Biomed Sci* 16: 79.
- Zima T, Tesar V, Stipek S, Nemecek K, Platenik J. 1995. The role of oxygen radicals in the pathogenesis of glomerulonephritis. *Cas Lek Cesk* 134: 716-719.
- Zhang Z, Ding Y, Dai X, Wang J, Li Y. 2011. Epigallocatechin-3-gallate protects pro-inflammatory cytokine induced injuries in insulin-producing cells through the mitochondrial pathway. *Eur J Pharmacol* 670: 311–316.
- Zheng W, Wang SY. 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. *J Agric Food Chem* 51: 502-509.

BIOGRAFIJA AUTORA

Ime i prezime: Milica S. Veljković

Datum i mesto rođenja: 23.09.1984. Niš

Obrazovanje:

- gimnaziju Stevan Sremac u Nišu završila je odličnim uspehom kao nosilac Vukove diploma
- Medicinski fakultet u Nišu upisala je školske 2003/04. godine, diplomirala decembra 2009. sa prosečnom ocenom 9.97.
- Doktorske akademske studije Molekularne medicine upisala je 2010. godine na Medicinskom fakultetu u Nišu

Profesionalna karijera:

- 2012. godine je izabrana za saranika u nastavi za UNO Fiziologija na Medicinskom fakultetu u Nišu
- u zvanje asistenta za UNO Fiziologija na Medicinskom fakultetu u Nišu izabrana je 2014. godine

Stipendije i nagrade u toku školovanja:

- na drugoj godini studija proglašena najboljim studentom u generaciji
- stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka
- stipendista Ministarstva nauke za stipendiranje 100 mladih istraživača – doktoranada

IZJAVA O AUTORSTVU

Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom:

UTICAJ EKSTRAKATA LISTA ZELENOG ZELENOG ČAJA I PLODA BOROVNICE NA
TOK AKUTNE BUBREŽNE INSUFICIJENCIJE PACOVA IZAZVANE GENTAMICINOM
koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivao/la na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredio/la autorska prava, niti zloupotrebio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu, _____.

Potpis autora disertacije:



Dr Milica S. Veljković

IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANOG I ELEKTRONSKOG OBLIKA
DOKTORSKE DISERTACIJE

Naslov disertacije:

UTICAJ EKSTRAKATA LISTA ZELENOG ZELENOG ČAJA I PLODA BOROVNICE NA
TOK AKUTNE BUBREŽNE INSUFICIJENCIJE PACOVA IZAZVANE GENTAMICINOM
Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predala za unošenje u
Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, istovetan štampanom.

U Nišu, _____.

Potpis autora disertacije:



Dr Milica S. Veljković

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Nikola Tesla“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom:

UTICAJ EKSTRAKATA LISTA ZELENOG ZELENOG ČAJA I PLODA BOROVNICE NA TOK AKUTNE BUBREŽNE INSUFICIJENCIJE PACOVA IZAZVANE GENTAMICINOM
Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)
- 4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)**
5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

U Nišu, _____.

Potpis autora disertacije:



Dr Milica S. Veljković