

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Sanjin D. Kovačević

DEJSTVO APOKININA I HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA
ISHEMIJSKO/REPERFUZIJSKO AKUTNO
BUBREŽNO OŠTEĆENJE KOD SPONTANO
HIPERTENZIVNIH PACOVA

doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Sanjin D. Kovačević

EFFECTS OF APOCYNIN AND HYPERBARIC
OXYGENATION ON ISCHEMIA/REPERFUSION
ACUTE KIDNEY INJURY INDUCED IN
SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Jelena Nešović Ostojić, vanredni profesor

Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor doktorske disertacije:

dr Milan Ivanov, viši naučni saradnik

Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Srđan Lopičić, vanredni profesor,

Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Predrag Brkić, vanredni profesor,

Institut za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Jasna Todorović, vanredni profesor,

Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Zoran Miloradović, naučni savetnik

Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu

Doc. dr Milena Trandafilović, docent,

Katedra za anatomiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Datum odbrane:

Mojim najdražima

DEJSTVO APOKININA I HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA ISHEMIJSKO/REPERFUZIJSKO AKUTNO BUBREŽNO OŠTEĆENJE KOD SPONTANO HIPERTENZIVNIH PACOVA

Rezime

Ishemijsko/reperfuzijsko oštećenje je čest uzrok akutnog bubrežnog oštećenja (ABO), a hipertenzija može doprineti povećanoj učestalosti i lošijem ishodu ove bolesti. Cilj ove studije je da ispita efekte preventivnog tretmana hiperbaričnom oksigenacijom (HBO) i tretmana apokininom, samostalno ili u kombinaciji na: sistemske i bubrežne hemodinamske parametre, parametre bubrežne funkcije, oksidativni stres, lipidni profil i strukturu bubrežnog tkiva kod spontano hipertenzivnih pacova nakon ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja bubrega. Studija je sprovedena na mužjacima spontano hipertenzivnih pacova, koji su nasumično podeljeni u sledeće grupe: lažno operisane pacove (SHAM), pacove sa indukovanim ABO (ABO), grupu sa indukovanim ABO, a kojoj je aplikovan apokinin (ABO+APO), grupu sa HBO tretmanom pre indukcije ABO (ABO+HBO) i grupu sa kombinacijom pretretmana HBO i tretmana apokininom (ABO+APO+HBO). HBO tretman sproveden je izlaganjem čistom kiseoniku (2.026 bar) dva puta dnevno, dva uzastopna dana, u trajanju od 60 minuta, a 24 časa pre izvođenja ABO. ABO je izvođeno uklanjanjem desnog bubrega i klemovanjem leve bubrežne arterije u trajanju od 45 minuta. Apokinin je aplikovan (40 mg/kg t.m., intravenski) 5 minuta pre reperfuzije. Izazivanje ABO je dovelo do značajnog pada srednjeg arterijskog pritiska i srčane frekvence, dok je u tretiranim grupama uočen statistički značajan pad ukupnog perifernog vaskularnog otpora. Značajn pad u protoku krvi kroz renalnu arteriju, kao i povećanje vaskularnog otpora u istom krvnom sudu nakon indukcije ABO, poboljšali su se nakon tretmana HBO. Takođe, do jednakog poboljšanja bubrežne hemodinamike dovelo je i tretman apokininom, sa ili bez HBO tretmana. Posmatrajući parametre bubrežne funkcije, ABO je dovelo do statistički značajnog povećanja koncentracija kreatinina, uree i fosfata u plazmi, kao i smanjenja njihovih urinarnih klirensa. Značajno poboljšanje navedenih parametara, a samim tim i funkcije bubrega uočeno je u svim tretiranim grupama. ABO je dovelo do promena u lipidnom profilu, sa statistički značajnim povećanjem koncentracija ukupnog i LDL holesterola. Sa druge strane, u poređenju sa ABO grupom, u svim tretiranim grupama uočen je porast HDL holesterola. HBO tretman, primenjen samostalno ili u kombinaciji sa apokininom, dovelo je do smanjenja intenzivne lipidne peroksidacije u plazmi, nastale usled ABO. Takođe, isti tretman, primenjen samostalno, povećavao je aktivnost antioksidativnog enzima glutation – reduktaze, dok je u kombinaciji sa apokininom dovelo do povećane aktivnosti katalaze u eritrocitima. HBO tretman, samostalno ili u kombinaciji sa apokininom, dovelo je do statistički značajnog pada vrednosti KIM – 1 u plazmi. Imunohistohemijska analiza ekspresije 4-HNE, NGAL, i HO-1 u bubrežnom tkivu ukazala je na

značajno poboljšanje navedenih parametara u svim tretiranim grupama u odnosu na ABO grupu. Obilna i intenzivna glomerulska i intersticijska ekspresija 4-HNE nastala usled izazivanja ABO, značajno se smanjila nakon svih primenjenih tretmana. Slično, i ekspresija NGAL je bila značajno manja, dok je ekspresija HO - 1 u bubrežnom tkivu, u svim tretiranim grupama, pokazala obrasce ekspresije slične onima koji su uočeni kod lažno operisanih pacova. Strukturno oštećenje bubrežnog tkiva, nastalo nakon izazivanja ABO, bilo je u svim tretiranim grupama značajno manje, sa manjim stepenom dilatacije i nekroze tubula u kortiko – medularnoj zoni i manjim prisustvom PAS pozitivnih cilindara u lumenu tubula. Na osnovu rezultata ove studije, može se zaključiti da preventivni tretman hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom, primenjen pojedinačno ili u kombinaciji umanjuje posledice ABO izazvanog kod spontano hipertenzivnih pacova.

Ključne reči: akutno bubrežno oštećenje, hipertenzija, hiperbarična oksigenacija, apokinin

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Fiziološke nauke

UDK broj:

EFFECTS OF APOCYNIN AND HYPERBARIC OXYGENATION ON ISCHEMIA/REPERFUSION ACUTE KIDNEY INJURY INDUCED IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Abstract

Ischemia/reperfusion injury is common cause of acute kidney injury (AKI), while hypertension might contribute to the increased incidence and worse outcome of AKI. The purpose of this study was to investigate the effects of single and combined hyperbaric oxygen (HBO) preconditioning and apocynin treatment on systemic and renal haemodynamics, kidney function, oxidative stress levels, lipid profile and kidney structure in spontaneously hypertensive rats after renal ischemia/reperfusion injury. The study was conducted on male spontaneously hypertensive rats, randomly divided into following groups: sham-operated group (SHAM) AKI control group (AKI), AKI group with apocynin treatment (AKI+APO), group with HBO preconditioning before AKI induction (AKI+HBO) and group with HBO preconditioning before and apocynin treatment after AKI induction (AKI+APO+HBO). HBO preconditioning was performed by exposing to pure oxygen (2.026 bar), twice a day for two consecutive days for 60 minutes, and 24h before AKI induction. For AKI induction, the right kidney was removed and ischemia was performed by clamping the left renal artery for 45 minutes. Apocynin was applied (40 mg/kg b.m., intravenously) 5 minutes before reperfusion. After AKI induction, mean arterial pressure and heart rate were significantly decreased, while total peripheral vascular resistance was significantly increased in all treated groups. AKI significantly increased renal vascular resistance and reduced renal blood flow, which were significantly improved after HBO preconditioning. Also, apocynin treatment, with or without HBO preconditioning showed improvement on renal hemodynamics. Considering kidney function, AKI significantly increased plasma creatinine, urea and phosphate levels and decreased their urinary clearances. Remarkable improvement, both in plasma concentrations and urinary clearances, in comparison to AKI group was observed in all treated groups. AKI induction caused significant increase in total and LDL cholesterol concentrations in plasma. On the other hand, in all treated group significant increase in HDL cholesterol plasma concentrations was noticed in comparison to AKI group. HBO preconditioning, applied both, solitary or with apocynin decreased intense lipid peroxidation in plasma caused by AKI induction. Also, applied solitary, HBO preconditioning increased glutathione reductase enzyme activity while combined with apocynin, it increased catalase activity in erythrocytes. Increased KIM – 1 plasma levels after AKI induction were significantly decreased after HBO preconditioning, solitary or combined with apocynin. Immunohistochemical analysis of 4-HNE, NGAL, and HO-1 tissue expression in all treated groups showed also significant improvement. Abundant and strong glomerular and interstitial expression of

4-HNE after AKI induction was significantly decreased in all treated groups. Similarly, NGAL expression was significantly lower and HO-1 kidney expression was also restored close to the sham – operated group. Considering renal morphology, significant morphological alterations present after AKI induction were significantly improved in all treated groups with reduced tubular dilatation, tubular necrosis in the cortico-medullary zone and PAS positive cast formation. Our results reveal that hyperbaric oxygen preconditioning and apocynin treatment, applied solitary or combined, diminish the consequences of AKI induced in spontaneously hypertensive rats.

Key words: acute kidney injury, hypertension, hyperbaric oxygen, apocynin

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Physiological Sciences

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Akutno bubrežno oštećenje	1
1.1.1 Definicija pojma i opšta razmatranja.....	1
1.2.2 Etiologija.....	2
1.2.3 Patogeneza ishemijskog akutnog bubrežnog oštećenja	5
1.2.3.1 Hipoksija.....	5
1.2.3.2 Oksidativni stres.....	6
1.2.3.3 Inflamacija.....	8
1.2.3.4 Vaskularne promene.....	10
1.2.3.5 Tubulske promene.....	12
1.2.4 Biomarkeri akutnog bubrežnog oštećenja	16
1.3 Hipertenzija i akutno bubrežno oštećenje.....	18
1.4 Apokinin.....	19
1.5 Hiperbarična oksigenacija	22
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
3. MATERIJAL I METODE	26
3.1 Eksperimentalni dizajn	26
3.2 Hemodinamska merenja.....	28
3.3 Sakupljanje uzoraka	29
3.4 Parametri bubrežne funkcije.....	29
3.5 Lipidni profil	30
3.6 Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	30
3.6.1 Određivanje stepena lipidne peroksidacije	31
3.6.2 Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima	31
3.6.2.1 Određivanje sadržaja hemoglobina u eritrocitima	31
3.6.2.2 Određivanje aktivnosti katalaze.....	31
3.6.2.3 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	32
3.6.2.4 Određivanje aktivnosti glutacion reduktaze	32
3.6.2.5 Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze	33

3.7 Određivanje KIM – 1 u plazmi.....	34
3.8 Histopatološka analiza.....	34
3.9 Imunohistohemijska analiza.....	34
3.10 Statistička analiza.....	35
4. REZULTATI.....	36
4.1 Hemodinamski parametri.....	36
4.2 Parametri bubrežne funkcije.....	38
4.3 Lipidni profil.....	42
4.4 Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	43
4.4.1 Lipidna peroksidacija.....	43
4.4.2 Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima.....	44
4.4.2.1 Aktivnost katalaze.....	44
4.4.2.2 Aktivnost superoksid dismutaze.....	45
4.4.2.3 Aktivnost glutation reduktaze.....	45
4.4.2.4 Aktivnost glutation peroksidaze.....	46
4.5 Vrednosti KIM – 1 u plazmi.....	47
4.6 Histopatološke promene.....	47
4.7 Imunohistohemijska ekspresija 4 – HNE, NGAL i HO - 1.....	49
5. DISKUSIJA.....	51
6. ZAKLJUČCI.....	64
7. LITERATURA.....	66

1. UVOD

1.1 Akutno bubrežno oštećenje

1.1.1 Definicija pojma i opšta razmatranja

Akutno bubrežno oštećenje (ABO, engl. *Acute kidney injury*, AKI) klinički je sindrom koga karakteriše iznenadna nemogućnost bubrega da vrši neku ili sve svoje funkcije: eliminaciju raspadnih produkata azotnih jedinjenja, održavanje homeostaze telesnih tečnosti i elektrolita, regulaciju acido - bazne ravnoteže, regulaciju krvnog pritiska i lučenja hormona. U patofiziološkom smislu, ABO se karakteriše naglim padom brzine glomerulske filtracije (engl. *glomerular filtration rate*, GFR) po pojedinačnom nefronu, koje je praćeno oligurijom, sa diurezom manjom od 400 mL dnevno u najvećem broju slučajeva. Izuzetno, ABO može biti praćeno i održavanom diurezom, sa više od 600 mL dnevno, ali je ovaj oblik neoliguričnog ABO izuzetno redak (Gamulin i sar, 2018; Nešović Ostojić, 2020).

Koncept ABO pretrpeo je značajna preispitivanja poslednjih decenija. Pored ustanovljene definicije ovog kliničkog sindroma sa naglasakom na ozbiljno akutno smanjenje funkcije bubrega, koje se manifestuje izrazitom azotemijom i često oligurijom ili anurijom, nedavni dokazi sugerišu da čak i relativno blago oštećenje bubrežne funkcije, praćeno minimalnim promenama vrednosti serumskog kreatinina i/ili diureze može da bude pokazatelj ozbiljnih kliničkih posledica (Makris i Spanou, 2016).

Prvi opis ABO, koji se tada nazivao *ischuria renalis*, dao je *William Heberden* 1802 (Eknoyan i Agodoa, 2002). Početkom dvadesetog veka, ABO, tada nazvan akutna Brajtova bolest (engl. *Acute Bright's disease*), opisan je kao posledica dejstva toksina, trudnoće, opekotina, traume ili operacija, na bubrege. Tokom Prvog svetskog rata ovaj sindrom je nazvan ratni nefritis i publikovan u nekoliko naučnih radova (Davies i Weldon, 1917). Do perioda Drugog svetskog rata spomenuti sindrom u naučnoj literaturi biva zaboravljen, sve do objave rada *Bywatersa i Bealla* o Kraš sindromu (engl. *Crash syndrome*) (Bywaters i Beall, 1941). Akutna tubulska nekroza (engl. *Acute tubular necrosis*, ATN) postaje novo - uvedeni termin, koji se koristio za opisivanje ovog kliničkog stanja, a čiji je naziv nastao na osnovu histoloških dokaza o neravnomernoj nekrozi bubrežnih tubula viđenih na obdukcijama. Dugo godina su se u kliničkoj praksi izrazi ATN i ABI (ABI, engl. *Acute renal failure*, ARF) upotrebljavali naizmenično u opisu ovog sindroma. Termin ABO prvi put je upotrebio *William MacNider* 1918. godine opisujući bubrežne efekte akutnog trovanja živom, a opšte prihvaćen u naučnoj literaturi postaje 2004. godine nakon redefinisivanja pojma ABI, sa sada široko prihvaćenim konsenzusnim kriterijumima poznatim pod akronimom RIFLE (engl. *Risk – Injury – Failure – Loss - End stage kidney disease*). Naime, predloženo je da

izraz „akutna povreda/oštećenje bubrega“ obuhvati čitav spektar sindroma, počev od minimalnih promena u markerima bubrežne funkcije pa sve do ozbiljnijih bubrežnih oštećenja, koja zahtevaju terapijske modalitete zamene bubrežne funkcije, poput dijalize (Kellum i sar., 2002; Makris i Spanou, 2016).

Danas je ABO značajna i česta bolnička komplikacija, a posebno kod pacijenta primljenih na odeljenja intenzivne nege, gde stopa mortaliteta usled razvoja ABO može dostići i 50% (Bonventre i Yang, 2011). Pored povećane stope smrtnosti, ABO može biti uzrok nastanka hroničnih promena u bubrezima koje nose visok rizik za razvoj ili pogoršanje hroničnih bubrežnih bolesti, koje mogu ući u terminalni stadijum (Coca i sar., 2009). Povećanju učestalosti ABO doprinose različiti faktori, uključujući prisustvo komorbiditeta, poput hipertenzije (Choi i sar., 2015) ili primena invazivnih dijagnostičkih procedura i složenih hirurških intervencija poput kardiorakalne hirurgije, delimične nefrektomije, transplantacije bubrega ili operativnog odstranjivanja bubrežnog kamena (Cartin-Ceba i sar., 2012).

1.1.2 Etiologija

Do razvoja ABO mogu da dovedu različiti faktori, a upravo na osnovu uzroka, ovaj sindrom se može podeliti u tri velike grupe: na prerenalno (prerenalna azotemija), renalno (parenhimsko) i postrenalno (opstruktivno) ABO (Gamulin i sar., 2018), Tabela 1.

Prerenalno ABO (prerenalna azotemija) nastaje kao posledica različitih bolesti ili stanja koja dovode do hipoperfuzije bubrega, što rezultuje smanjenjem brzine glomerulske filtracije, ali bez oštećenja parenhima bubregam i ono predstavlja najčešći od svih oblika ABO (55% slučajeva) (Nešović Ostojić, 2020). Bubrežni parenhim u prerentalnom ABO nije oštećen i zbog toga se funkcija bubrega u potpunosti oporavlja, čim se uspostavi normalan protok krvi kroz bubreg. U slučaju da hipoperfuzija potraje ili ako postoji teži stepen hipoperfuzije, dolazi do ishemijskog oštećenja bubrežnog parenhima i razvoja ATN i parenhimskog ABO. Drugim rečima, smanjen protok krvi kroz bubreg može rezultirati u prerentalnom i parenhimskom ABO, odnosno ova dva poremećaja predstavljaju deo istog spektra (Stošić i Borota, 2020). Prerenalno ABO može da nastane kao komplikacija bilo koje bolesti koja dovodi do sistemske vazodilatacije, smanjenog udarnog volumena srca, hipovolemije ili izolovane bubrežne vazokonstrikcije (Makris i Spanou, 2016).

Renalno (parenhimsko) ABO nastaje kao posledica bolesti koje direktno zahvataju bubrežni parenhim, a uzroci parenhimskog ABO se mogu podeliti u odnosu na deo bubrega koji je u najvećoj meri zahvaćen patološkim promenama. Ishemija i nefrotoksične supstance izazivaju direktno akutno oštećenje tubula. Kao što je već navedeno zajednički entitet prerentalnog ABO i ishemijske

ATN je postojanje bubrežne hipoperfuzije, koja u najtežim slučajevima ishemije dovodi do bilateralne bubrežne kortikalne nekroze i ireverzibilnog bubrežnog oštećenja. Stoga, ATN najčešće i nastaje nakon sepse, teških trauma, krvarenja, većeg gubitaka plazme, kao i pri komplikovanim kardiovaskularnim operacijama. Mnoge farmakološke supstance deluju toksično po tubule, a nefrotoksična ATN može biti komplikacija njihove upotrebe. Razvoju nefrotoksične ATN posebno su podložne starije osobe, oboleli od bubrežnih i vanbubrežnih hroničnih bolesti (Jameson i sar., 2018). U nefrotoksičnom ABO nekroza tubulskih ćelija je manje izražena nego kod ishemjskog ABO, a ATN uzrokovana toksinima najizraženija je u savijenim i pravim delovima proksimalnih tubula. Nefrotoksično ABO nastaje i kao posledica štetnog dejstva različitih egzogenih i endogenih toksina koji se izlučuju putem bubrega. Toksičnim efektima različitih supstanci na bubrežno tkivo pogoduje veliki bubrežni protok krvi, kao i činjenica da se većina ovih supstanci koncentruje u meduli, tako da je njihova koncentracija u bubregu i do dva puta veća nego u plazmi (Stošić i Borota, 2020). Radiokontrastna sredstva i neki imunosupresivni lekovi oštećuju bubreg izazivajući izrazitu intrarenalnu vazokonstrikciju i kontrakciju mezangijumskih ćelija. Međutim, kontrastna nefropatija može nastati i usled povećanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV, engl. *Reactive oxygen species*, ROS), koji imaju direktan toksičan efekat na tubulske ćelije. Antibiotici i antikancerski lekovi dovode do ATN direktnim citotoksičnim dejstvom na ćelije tubulskog epitela ujedno izazivajući i opstrukciju tubula. Aminoglikozidni antibiotici se akumuliraju u renalnim tubulskim epitelnim ćelijama. Dovode do oksidativnog stresa i oštećuju ćeliju, tako da se ABO javlja nekoliko dana od započinjanja terapije aminoglikozidima. ATN mogu izazvati i antiprotozoici, antivirusni lekovi, kao i hemioterapeutici, a nefrotoksična oštećenja mogu se pojaviti i u slučaju trovanja teškim metalima i organskim rastvaračima (Jameson i sar., 2018). Najčešći endogeni nefrotoksini su: hemoglobin, mioglobin, kalcijum, urati, oksalati i mijelomski laki lanci imunoglobulina. Hemoglobin i mioglobin mogu uzrokovati ABO direktnim toksičnim efektom na ćelije tubula, uz istovremeno stvaranje cilindara i opstrukciju tubula. Takođe, oba proteina su moćni inhibitori azot monoksida (engl. *Nitrogen oxide*, NO), te mogu da dovedu do renalne vazokonstrikcije i sledstvene ishemije bubrega (Stošić i Borota, 2020). Najčešći uzroci rabdomiolize su: traumatske povrede, akutna mišićna ishemija, toplotni udar, maligna hipertermija, i dr. ABO koje nastaje usled hemolize je relativno retka pojava i može se javiti nakon transfuzijskih reakcija. ABO usled hiperkalcijemije nastaje zbog pada brzine glomerulske filtracije, koja je uslovljena intrarenalnom vazokonstrikcijom. Kod pacijenata sa multiplim mijelomom, ABO nastaje usled stvaranja intratubulskih cilindara koji sadrže filtrovane lake lance imunoglobulina (*Bence Jones*-ovi proteini) i drugih proteina, a sami *Bence Jones*-ovi proteini su direktno toksični za tubulske epitelne ćelije. Značajan uzrok ABO je i intratubulska opstrukcija kod pacijenata sa teškom hiperurikozurijom i hiperoksalurijom (Nešović Ostojić, 2020). ABO je vrlo često

komplikacija sepse, a pored ishemije u patogenezi ABO izazvanog sepsom učestvuje i oštećenje tubulskih i endotelnih ćelija lizozomskim enzimima i slobodnim radikalima oslobođenim iz aktiviranih leukocita, mikrovaskularna disfunkcija, a progresiji oštećenja doprinose i proinflamatorni citokini sekretovani od strane tubulskih epitelnih ćelija (Makris i Spanou, 2016). Takođe, neki od glomerulonefritisa mogu za posledicu imati nastanak ABO (Pesce i sar., 2020).

Postrenalno (opstruktivno) ABO najređi je oblik, koji nastaje kao posledica opstrukcije mokraćnih puteva i nemogućnosti eliminacije mokraće. Poremećaji u eliminaciji mokraće na nivou jednog bubrega najčešće ne dovode do većih odstupanja u sastavu telesnih tečnosti usled funkcionalne kompenzacije kontralateralnog bubrega (Gamulin i sar., 2018). Stoga, ovaj oblik nastaje samo u slučajevima bilateralne intraluminalne (kalkulusi, tumori) ili ekstraluminalne (tumori, apsces, retroperitonealna fibroza) opstrukcije uretera, zatim opstrukcije vrata mokraćne bešike (uvećana prostata, kalkulus, tumor, infekcije) i uretre (suženja ili urođeni poremećaji) (Jameson i sar., 2018). Bez obzira na uzrok i mesto opstrukcije, nemogućnost eliminacije mokraće ima za posledicu porast pritiska iznad mesta opstrukcije, a koji se prenosi sve do *Bowmanove* kapsule, uz posledično smanjenje efektivnog filtracionog pritiska i pada GFR (Gamulin i sar., 2018).

Tabela 1. Uzroci akutnog bubrežnog oštećenja

Prerenalno ABO
1. Hipovolemija (krvarenje, povraćanje, dijareja, hipoaldosteronizam, diuretici, nefrogeni diabetes insipidus, opekotine, peritonitis, i dr.)
2. Oštećenja bubrežne hemodinamike sa bubrežnom hipoperfuzijom <ul style="list-style-type: none"> • Poremećaji funkcije srca (kongestivna srčana insuficijencija, akutni infarkt miokarda, masivna plućna embolija i dr.) • Sistemska vazodilatacija (sepsa, anafilaktički šok i dr.) • Bubrežna vazokonstrikcija (nesteroidni antiinflamatorni lekovi, hepatorenalni sindrom i dr.)
Renalno ABO
1. Oštećenje tubula <ul style="list-style-type: none"> • Bubrežna ishemija (uzroci isti kao za prerenalno ABO, uz teža oštećenja i poremećaj koji duže traje, naročito šok, krvarenje, trauma, operativne komplikacije i dr.) • Egzogene nefrotoksične supstance (radiokontrastna sredstva, antibiotici, hemioterapeutici, organski rastvarači i dr.) • Endogene nefrotoksične supstance (mioglobin, hemoglobin, i dr.)

<ul style="list-style-type: none"> • Opstrukcija tubula (<i>Bence Jones</i>-ovi proteini, urati)
2. Oštećenje glomerula (glomerulonefritisi, vaskulitisi, preeklampsija i dr.)
3. Oštećenje intersticijuma <ul style="list-style-type: none"> • Intersticijumski nefritis (pijelonefritis (bilateralno), lekovi, i dr.)
4. Renovaskularna oštećenja (bilateralna stenozna bubrežnih arterija, bilateralna tromboza bubrežnih vena, vaskulitisi i dr.)
Postrenalno ABO
1. Ekstraluminalna opstrukcija (uvećana prostata, karcinomi, retroperitonealna fibroza i dr.)
2. Intraluminalna opstrukcija (nefrolitijaza, koagulumi i dr.)

1.1.3 Patogeneza ishemijskog akutnog bubrežnog oštećenja

Ishemijsko/reperfuzijska povreda bubrega čest je uzrok ABO, i za rezultat ima generalizovani ili lokalizovani poremećaj u dopremanju kiseonika i drugih nutrijenata, kao i odstranjivanju štetnih produkata iz bubrežnih ćelija. Usled toga dolazi do neusklađenosti između lokalne raspoloživosti i potrošnje kiseonika u tkivu i akumulacije otpadnih proizvoda metabolizma. Kao rezultat ove neravnoteže, tubulske epitelne ćelije bivaju oštećene, a ako je to oštećenje kompleksno i ozbiljno, nastupa ćelijska smrt, bilo procesom apoptoze ili nekroze. Patofiziološki mehanizmi ishemijskog ABO su višestruki i složeni i uključuju hipoksijsko oštećenje ćelije, povećane nivoe oksidativnog stresa, hemodinamske promene, zapaljenje, kao i endotelnu i epitelnu disfunkciju koja prati ishemijsko - reperfuzijsko oštećenje u bubrezima (Bonventre i Yang, 2011).

1.1.3.1 Hipoksija

U fiziološkim uslovima, dotok kiseonika u bubrežno tkivo je adekvatno regulisan proces, shodno energetske potrebama. U ABO, u toku ishemije dolazi do poremećaja normalnog funkcionisanja bubrežne mikrocirkulacije što za posledicu ima smanjen dotok krvi, hipoksiju i oksidativni stres (Pavlakou i sar., 2017). Metaboličke i biohemijske posledice hipoksije su mnogobrojne, uključujući anaerobnu glikolizu, te reverzibilno i naposljetku ireverzibilno oštećenje ćelije.

Usled nedostatka kiseonika u ćelijama, oksidativni metabolizam se prvo smanjuje, a nakon toga dolazi do njegovog potpunog prestanka, što aktivira enzime odgovorne za anaerobnu razgradnju glukoze, tokom koje dolazi do nakupljanja laktata i sledstvenog pada ćelijskog pH. Istovremeno usled nedostatka kiseonika, povećava se koncentracija redukovanih nikotinamid

adenine dinukleotida (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH), što dodatno podstiče stvaranje laktata i pad intraćelijskog pH. Ovi procesi uzrokuju značajnu ćelijsku hipoenergozu, sa smanjenjem količine adenzin trifosfata (engl. *Adenosine triphosphate*, ATP) i posledičnim poremećajem jonskih pumpi. Usled novonastale hipoenergoze, u ćeliji dolazi do nakupljanja jona natrijuma, kalcijuma i vode, sa hidropsnim bubrenjem i bitnim narušavanjem normalnih funkcionalnih i morfoloških svojstava ćelije. Dugotrajna hipoksija podstiče dalje oštećenje ćelije, a oštećenje mitohondrija sa bubrenjem i povećanom propustljivošću mitohondrijske membrane sa isticanjem kalcijuma i mitohondrijskih proteina u plazmu predstavlja trenutak kada je nemoguć povratak na funkcionalni i strukturni integritet ćelije koji je postojao pre hipoksije. Porast intraćelijske koncentracije kalcijuma pokreće čitav niz mehanizama koji dalje oštećuju ćeliju. Aktivacijom kalcijum zavisnih enzima produbljuje se hipoenergoza ćelije, oštećuje citoskelet, a izrazit porast kalcijuma doprinosi povećanom stvaranju RKV. Kalcijum sa kalmodulinom stvara kompleks, te se aktivira proteaza koja razlaže ksantin dehidrogenazu i prevodi je u ksantin oksidazu, koja pri oksidaciji prenosi elektrone na molekularni kiseonik, stvarajući superoksidni anjon. Endotelne ćelije sadrže značajne količine ovog enzima. Pored ksantin oksidaze, kalcijum kalmodulin kompleks u ovim ćelijama podstiče aktivnost NO sintetaze i povećano stvaranje NO, kao i njegov prelazak u peroksinitrite i konačno, stvaranje visoko toksičnog hidroksilnog anjona. Dodatno, povećanim nivoima oksidativnog stresa doprinosi i smanjena aktivnost antioksidativnih enzima u hipoksičnim uslovima (De Luka i sar., 2015).

1.1.3.2 Oksidativni stres

U ABO dolazi do formiranja različitih RKV, kao što su: superoksidni anjon, vodonik - peroksid, hidroksilni anjon, kao i reaktivnih azotnih vrsta (RAV, engl. *Reactive nitrogen species*, RNS), kao što je NO. On može da se ponaša kao slobodni radikal, a i da se konvertuje u toksične peroksinitrite (Basile i sar., 2012).

Bubrežna ishemijsko/reperfuzijska povreda predstavlja glavni okidač za stvaranje RKV i RAV, a oštećene mitohondrije su jedan od glavnih izvora za njihov nastanak. Superoksidni anjon može nastati u brojnim reakcijama u kojima učestvuju oksidazni enzimi, a takođe može voditi poreklo iz transportnog lanca elektrona unutar mitohondrija. Prisustvo superoksidnog anjona pokreće kaskadu događaja i stvaranje drugih RKV (Tomsa i sar., 2019). Pored oštećenih mitohondrija, koje u ishemijskom ABO predstavljaju važan izvor superoksidnog anjona, takođe, ksantin oksidaza, kao i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) oksidaza aktiviranih leukocita predstavljaju dodatne izvore za njegov nastanak (Basile i sar., 2012).

Vodonik peroksid može nastati aktivnošću superoksid dismutaze (engl. *Superoxide dismutase*, SOD) i pretvaranjem superoksidnog anjona u vodonik peroksid, ali i oksidazama koje su u stanju da direktno redukuju molekularni kiseonik. Peroksidi mogu reagovati i sa različitim molekulima koji sadrže gvožđe, kao što su proteini plazme i hem grupe. Usled oštećenja, gvožđe biva otpušteno iz svojih depoa, te reagovanjem vodonik peroksida sa gvožđem dolazi do stvaranja hidroksilnog anjona u reakciji poznatoj kao Fentonova reakcija. Sam hidroksilni anjon reaguje sa skoro svakom ćelijskom komponentom, stvarajući dodatne količine RKV, a dovodi i do peroksidacije lipida sa naknadnim oštećenjem membrane i oslobađanjem toksičnih jedinjenja, uključujući aldehide. Takođe, kada se vodonik peroksid metaboliše pomoću specifične hem peroksidaze u prisustvu drugih molekula, kao što su hloridi ili nitriti, on može stvoriti hipohlorastu kiselinu i azot dioksid. Hipohlorasta kiselina je visoko reaktivan molekul rastvorljiv u lipidima, koji stvara fagocitna mijeloperoksidaza u inflamatornim ćelijama u uslovima lokalne ishemije, a može reagovati sa aminima, proizvodeći hloroamine. Peroksinitriti nastaju u reakciji superoksidnog anjona sa NO, koji je važan regulatorni molekul u fiziološkoj funkciji bubrega. U sklopu ishemijskog ABO, zbog oštećenja i pratećeg inflamatornog odgovora organizma dolazi do stvaranja većih količina NO, koje u interakciji sa gvožđem dovode do produkcije RAV. Takođe, veća koncentracija NO je u kompeticiji sa lokalnim antioksidativnim enzimima u uklanjanju superoksidnog anjona, što dovodi do stvaranja štetnih peroksinitrita (Tomsa i sar., 2019).

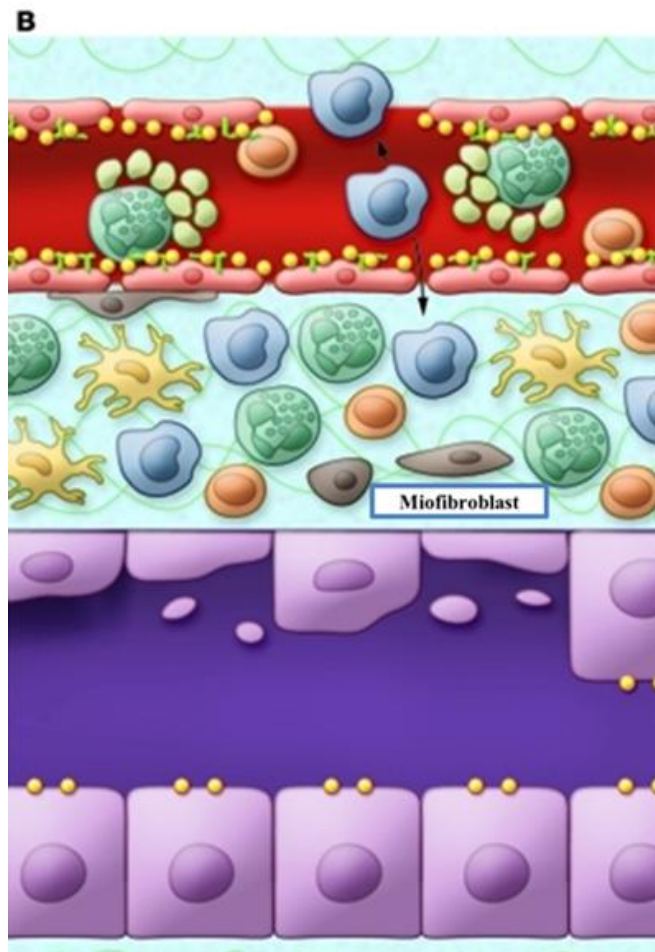
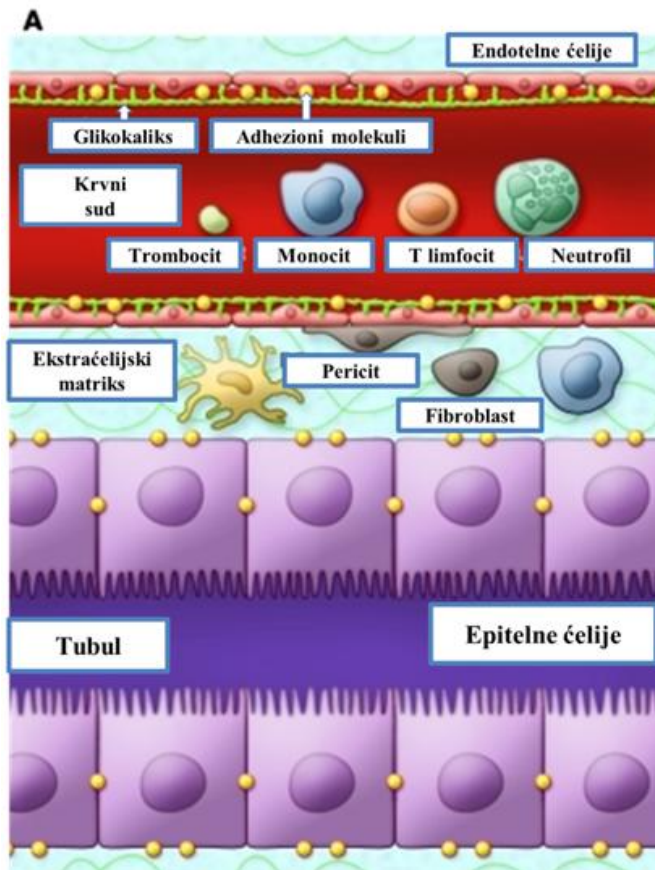
Efekte slobodnih radikala su mnogobrojni, a pre svega se ogledaju u lipidnoj peroksidaciji ćelijske membrane, oksidativnoj promeni ćelijskih proteina, oštećenju DNK, i dr. Kako su slobodni radikali nestabilni i teže da se spontano razlože, ćelije su razvile brojne enzimske i neenzimske mehanizme odbrane, u cilju uklanjanja slobodnih radikala i sprečavanja ćelijskog oštećenja (De Luka i sar., 2015).

U toku ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja bubrega poremećena aktivnost antioksidativnih enzima takođe doprinosi opsežnosti bubrežnog oštećenja, usled smanjenog uklanjanja slobodnih radikala. Takođe, u animalnim modelima postishemijskog ABO dolazi do porasta enzima hem - oksigenaze (engl. *Heme oxygenase*, HO) i to izoforme HO - 1, koja je važna u borbi protiv oksidativnog stresa, a on predstavlja važan stimulus za njenu ekspresiju. Pored oksidativnog stresa, i drugi stimuli, poput faktora rasta, angiotenzina II, NO, i dr. utiču na aktivnost ovog enzima. HO - 1 smanjuje nivo oksidativnog stresa, pre svega razgradnjom hema, toksičnog pro - oksidanta, kao i sintezom bilirubina, koji inhibira lipidnu peroksidaciju. Takođe, ugljen monoksid (engl. *Carbon monoxide*, CO), kao međuprodukt aktivnosti HO - 1 omogućava potencijalni vazodilatatorni efekat na bubrežnu cirkulaciju, te dovodi do poboljšanja bubrežnog protoka krvi (Basile i sar., 2012).

1.1.3.3 Inflamacija

U toku reperfuzije, koju karakteriše inflamatorni odgovor posredovan leukocitima, dolazi do dodatnog oksidativnog i ćelijskog oštećenja (Pavlakou i sar., 2017). Naime, uspostavljanje krvotoka u tkivu u kome već postoji ćelijsko oštećenje može višestruko povećati stvaranje RKV i time doprineti ozledi ćelije. Slobodni radikali u reverzibilno oštećenim ćelijama mogu delovati kao sekundarni glasnici i podstaći aktivaciju transkripcionog faktora nuklearnog faktora kapa – B (engl. *Nuclear factor kappa B*, NF – κ B), koji uslovljava ekspresiju adhezionih molekula na endotelnim ćelijama. Kada se krvotok uspostavi, prilikom priliva krvi u hipoksično tkivo, leukociti iz krvi se vezuju za adhezione molekule na endotelnim ćelijama, te dolazi do njihove aktivacije i oslobađanja velikih količina slobodnih radikala (De Luka i sar., 2015). Stoga, oštećenje mikrovaskularnog endotela dovodi do aktivacije endotelne ćelije sa ekspresijom adhezionih molekula na površini ćelije, koji promovišu privlačenje i adheziju leukocita i trombocita, što dovodi do daljih promena u perfuziji i isporuci kiseonika, te dodatne amplifikacije endotelne oštećenja i inflamatornog odgovora (Bonventre i Yang, 2011).

Kao što je prikazano na Slici 1 (Bonventre i Yang, 2011), bubrežno ishemijsko/reperfuzijsko oštećenje dovodi do otoka endotelne ćelije i poremećaja endotelne sloje ćelije u krvnim sudovima, kao i glikokaliksa koji ga prekriva, a to izaziva curenje tečnosti u okolno tkivo i pojavu intersticijskog edema. U nedostatku kiseonika, anaerobna glikoliza postaje primarni izvor energije, sa posledičnim nakupljanjem mlečne kiseline, mitohondrijalne disfunkcije i povećane proizvodnje RKV. Povećanje vaskularne propustljivosti i intersticijski edem dalje doprinose dodatnom kompromitovanju protoka krvi (Zuk i Bonventre, 2016).



Slika 1. Oštećenje endotela u bubrežnom ishemijsko/reperfuzijskom oštećenju, A) normalan endotel, B) endotelne promene nakon ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja bubrega – otok endotelnih ćelija, povećana propustljivost, otok intersticijuma, mikrotromboze, ispoljavanje adhezivnih molekula, interakcija endotelnih ćelija i leukocita, Bonventre i Yang, 2011.

Oštećene proksimalne tubulske ćelije eksprimiraju na svojoj površini molekule MHC (engl. *major histocompatibility complex*) klase II, i sekretuju različite proinflamatorne citokine i hemokine, koji su značajni u privlačenju i aktivaciji imunskih ćelija. U patofiziologiji ABO, oba imunska odgovora, i urođeni i stečeni zauzimaju značajan ulogu. Urođeni imunološki odgovor je antigen nespecifičan, a otpočinje već nakon 30 minuta od nastanka ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja, i uključuje direktno oštećenje tubulskih epitelnih ćelija od strane aktiviranih neutrofilnih granulocita, makrofaga i NK (engl. *Natural killer*) ćelija, kao i aktivaciju sistema komplementa. Dendritske ćelije potenciraju urođeni imunski odgovor kroz oslobađanje proinflamatornih citokina, a takođe podstiču i stečeni imunski odgovor kroz prezentaciju antigena. Kako je stečeni imunski odgovor antigen specifičan, on se razvija u roku od nekoliko sati od nastanka oštećenja, a uključuje aktivaciju, proliferaciju i interakciju T i B limfocita. Prvi talas imunskog odgovora dovodi do privlačenja neutrofilnih granulocita u zoni spoljašnje medule, gde je intenzitet oštećenja najveći. Početna interakcija ovih ćelija sa endotelom, dovodi do oslobađanja različitih produkata, kao što su mijeloperoksidaza, proteaze, RKV i citokini, što rezultira povećanjem vaskularne propustljivosti, oštećenjem tubulskih ćelija i daljim privlačenjem leukocita. Drugi talas imunskog odgovora uključuje regrutovanje monocita iz krvi i njihovu diferencijaciju u makrofage, već nakon 1 časa od ishemijsko/reperfuzijske povrede i perzistira sedam dana. Glavna funkcija makrofaga je fagocitoza oštećenog tkivnog materijala, ali oni igraju i ključnu ulogu u stečenom imunskom odgovoru, pre svega kroz prezentaciju antigena T limfocitima i aktivaciju stečenog imunskog odgovora. Takođe, aktivirani sistem komplementa doprinosi urođenom imunskom odgovoru (Kanagasundaram, 2015).

1.1.3.4 Vaskularne promene

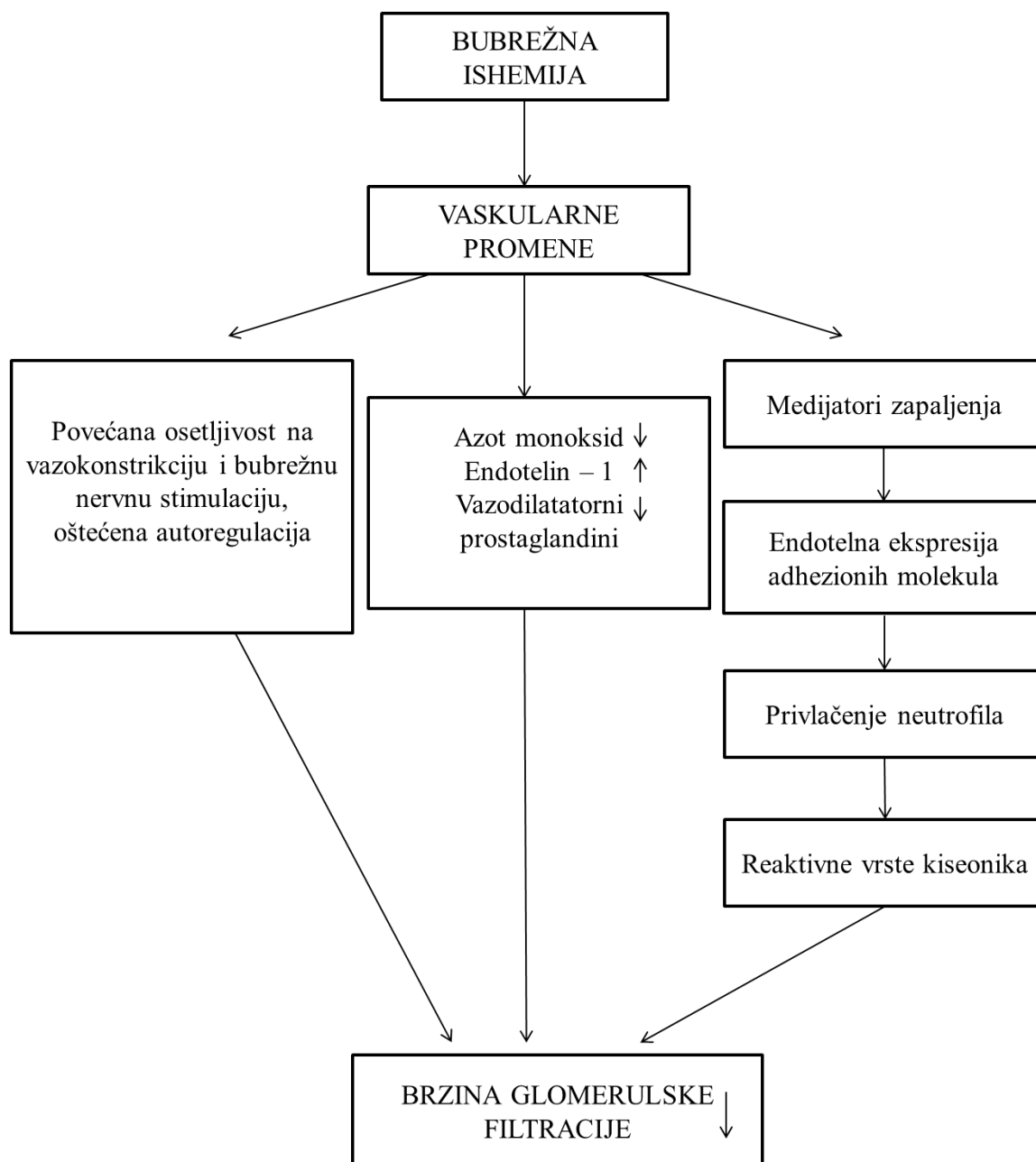
U ishemijsko/reperfuzijskom oštećenju bubrega dominiraju dva patofiziološka procesa koja za rezultat imaju naglo smanjenje GFR: vaskularne promene i tubulske promene, a koja su međusobno povezana i bitno doprinose uzajamnom oštećenju (Lameire i sar., 2005).

U patofiziologiji ishemijskog ABO bubrežna mikrovaskulatura zauzima ključnu ulogu (Pavlaou i sar., 2017), Slika 2. U toku ishemijskog oštećenja bubrega, dolazi do gubitka bubrežne autoregulacije, pa umesto očekivane autoregulatorne vazodilatacije, koja nastaje kao posledica

zmanjenog bubrežnog krvnog protoka, dolazi do vazokonstrikcije bubrežne vaskulature i pada GFR (Nešović Ostojić, 2020). Istraživanja su pokazala, kako klinička, tako i eksperimentalna da prilikom ABO dolazi do značajnog smanjenja ukupnog protoka krvi kroz bubrege, koji se u proseku smanjuje i do 50% (Nissenson, 1998).

Endotelne ćelije su važne determinante bubrežnog vaskularnog tonusa, funkcije leukocita i reaktivnosti glatkih mišićnih ćelija. U slučaju oštećenja endotela, male arteriole se, u postishemično oštećenom bubregu, kontrahuju u većoj meri nego u zdravom bubregu, u odgovoru na povećane vrednosti endotelina - 1, angiotenzina II, tromboksana A₂, prostaglandina H₂, leukotriena C₄ i D₄ i adenzina, kao i na povećanu simpatičku stimulaciju. Takođe, u postishemijskom ABO postoji i smanjen vazodilatatorni odgovor na acetilholin, bradikinin i NO. Vazokonstrikcija je posredovana i smanjenom proizvodnjom NO i drugih vazodilatatornih supstanci od strane oštećenih endotelnih ćelija, kao i sekrecijom proinflammatoryh citokina od strane leukocita (Bonventre i Yang, 2011). Oštećene endotelne ćelije stimulišu snažan inflamatorni odgovor, pre svega ispoljavanjem adhezivnih molekula za leukocite, koji oslobađajući proinflammatoryh citokine i svoje enzime dovode do umnožavanja inflamatornog odgovora i do dodatnog oštećenja endotelnih ćelija, a stvoreni vazoaktivni citokini pogoršavaju nastalu vazokonstrikciju i ishemiju (Kanagasundaram, 2014).

Tubuloglomerulska povratna sprega doprinosi takođe vazokonstriktornom odgovoru u postishemijskom ABO. Naime, ćelije u području *maculae dense* detektuju porast soli u distalnim tubulima, koji je posledica smanjene reapsorpcije soli u oštećenim proksimalnijim delovima nefrona, što uslovljava stimulisanu vazokonstrikciju susedne aferentne arteriole od strane ćelije *maculae dense* i dalje smanjenje glomerulske perfuzije i filtracije (Nešović Ostojić, 2020).



Slika 2. Zbirni prikaz vaskularnih promena u ishemijskom ABO.

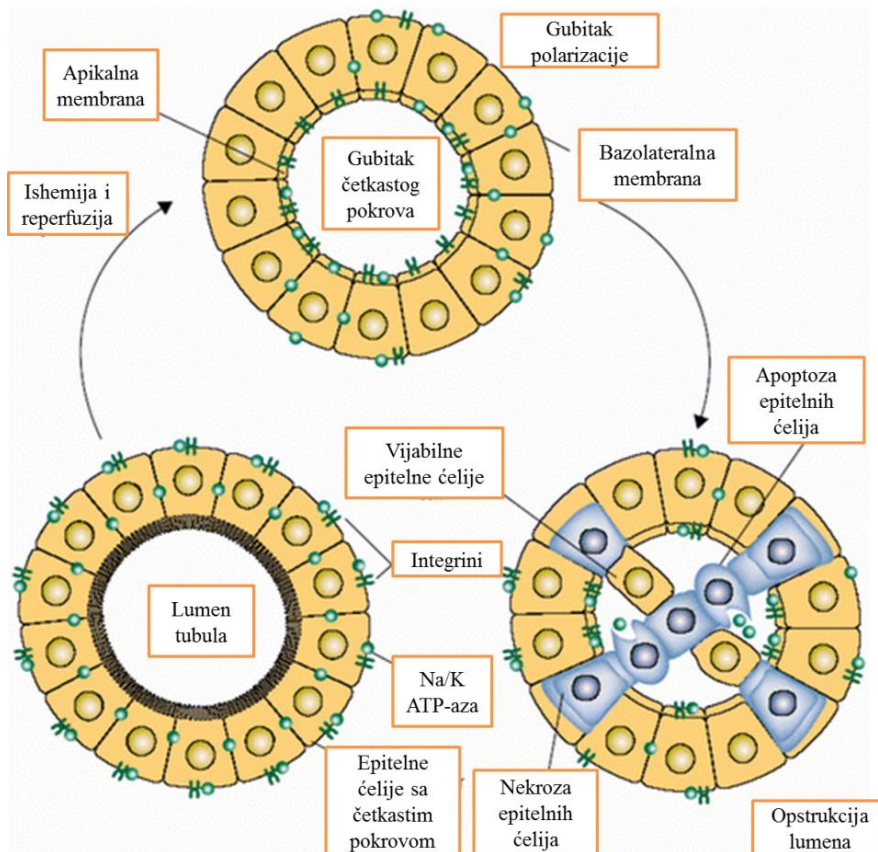
1.1.3.5 Tubulske promene

Tubulske epitelne ćelije se izuzetno osetljive na hipoksiju. U toku ishemijske dolazi do pojave čitavog niza strukturnih i funkcionalnih oštećenja tubulskih ćelija (Kanagasundaram, 2015).

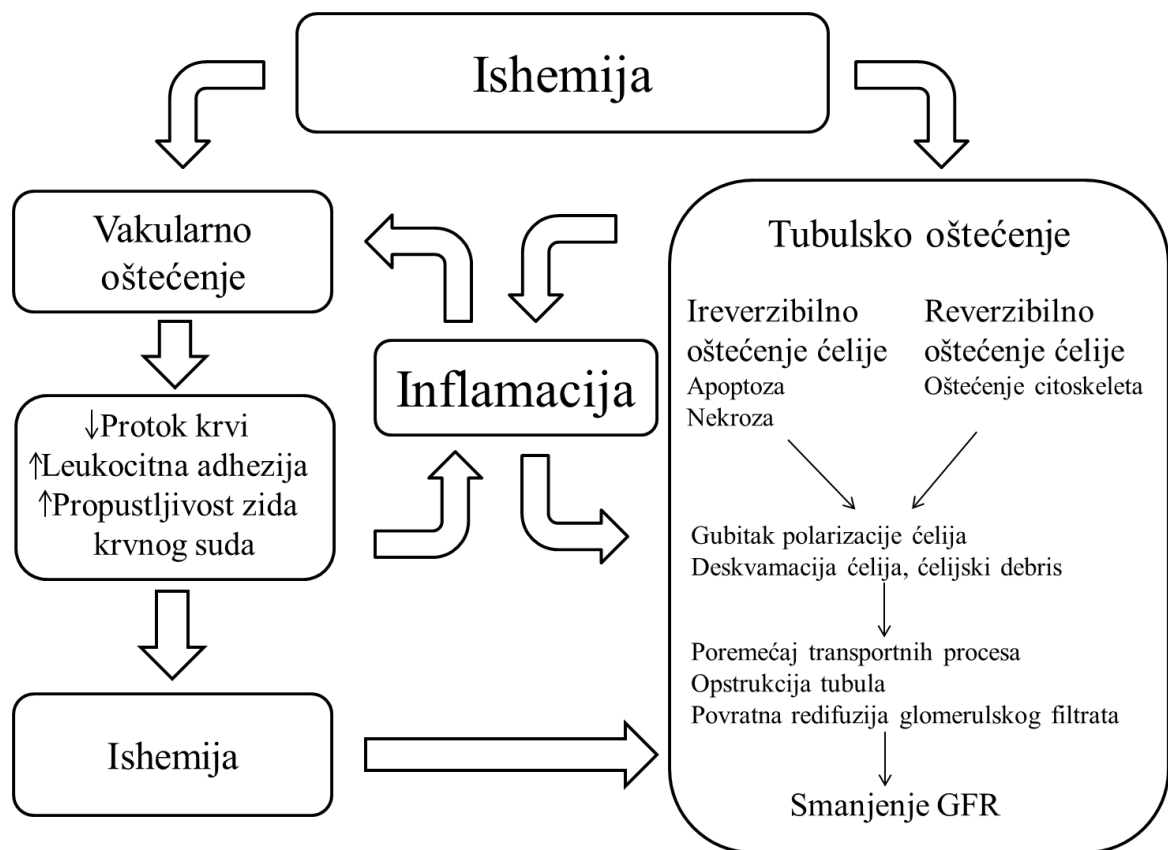
U toku ishemijskog ABO, kao odraz tubulske disfunkcije dolazi do poremećaja reapsorpcije natrijuma i vode, koja je udružena sa otpadanjem mikrovila proksimalnih tubulskih ćelija. Takođe, dolazi do promena u citoskeletu epitelnih ćelija proksimalnih tubula, pre svega povećanja citoplazmatske koncentracije $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -aze i proteina koji se vezuju za aktin, a koji se premeštaju sa bazolateralne membrane u citoplazmu. Upravo ovakvo premeštanje $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -aze razlog je smanjene reapsorpcije natrijuma u ishemijskoj ABO i može objasniti funkcionalne

poremećaje u odsustvu većih morfoloških oštećenja. Usled novonastale hipoksije, dolazi do povećanja intraćelijskog kalcijuma u proksimalnim tubulskim ćelijama, što za posledicu ima dalju progresiju morfoloških i funkcionalnih oštećenja ćelija. Takođe, oksidativni stres doprinosi oštećenju tubulskih ćelija, koje i same stvaraju različite proinflamatorne citokine (Kanagasundaram, 2014; Bonventre i Yang, 2011; Padanilam, 2003).

Ishemija dovodi do gubitka apiko – bazalne polarizacije ćelije i odlublivanja pojedinih ćelija sa podloge. Od ovako deskvamiranih ćelija i otpalih mikrovila nastaju intraluminalni cilindri, koji se često viđaju kod ovog tipa ABO (Basta – Jovanović i Marković - Lipkoviski, 2009). Intraluminalni cilindri, prisutni u distalnom nefronu sadrže *Tamm-Horsfall*-ov protein, koga normalno sekretuju ćelije debelog ascedentnog kraka Henleove petlje. U prisustvu povećane luminalne koncentracije natrijuma u distalnim tubulima, ovaj protein, najpre sekretovan kao monomer, polimerizuje i formira proteinski gel, koji predstavlja idealan medijum za stvaranje distalnih cilindara koji se sastoje od vitalnih i avitalnih ćelija, mikrovila i ekstracelularnog matriksa. Ovakva opstrukcija dovodi do povećanja intratubulskog pritiska, što sekundarno dovodi do smanjenja GFR. Upravo, kombinacija tubulskog stvaranja cilindara i aktivacija tubuloglomerulskog mehanizma u ishemijskoj ABO mogu da objasne drastično smanjenje GFR. U retkim slučajevima gubitak tubulske epitelne ćelijske membrane i/ili tesnih spojeva između vitalnih ćelija mogu da dovedu do povratne redifuzije glomerulskog filtrata nazad u cirkulaciju i smatra se da samo 10% smanjenja GFR može biti objašnjeno ovim mehanizmom (Nešović Ostojić, 2020), Slika 3 i 4.



Slika 3. Tubulske promene u ishemijskom ABO, Kanagasundaram, 2015.



Slika 4. Zbirni prikaz interakcije vaskularnih i tubulskih promena u postishemijskom ABO

Oštećenje pojedinačnih bubrežnih tubulskih ćelija, pre svega, zavisi od intenziteta štetnog etiološkog faktora. Veliki broj ćelija i nakon dejstva nokse ostaje i dalje vitalan, bilo da u potpunosti izbegne štetno dejstvo ili pak dolazi do subletalnih i reverzibilnih oštećenja. Sa druge strane, veći stepen oštećenja dovodi do ireverzibilnih promena i rezultira smrću ćelija. Sa aspekta smrti ćelije, vrlo je verovatno da faktori jačeg intenziteta uvode ćeliju u apoptozu, dok dejstvo faktora izuzetno jakog intenziteta dovodi do kritične energetske istrošenosti, sledstvenog metaboličkog kolapsa ćelije i nekroze. U okviru ABO mogu se istovremeno ispoljiti i apoptoza i nekroza. Za razliku od apoptoze, koja predstavlja programiranu ćelijsku smrt, nekroza je uvek praćena inflamatornim procesom, a samim tim i dodatnim oštećenjem okolnog tkiva. U ishemijsko/reperfuzijskom ABO, pokazana je dozna zavisnost u ispoljavanju apoptoze, odnosno nekroze. Ishemija nižeg stepena, u trajanju od 15 minuta dovodi do apoptoze tubulskih epitelnih ćelija, bez ispoljavanja nekroze, dok je duže trajanje ishemije povezano sa većim stepenom apoptoze i pojavom nekroze. Ipak, kako se u ishemijskom ABO najčešće javljaju obe vrste ćelijske smrti, u njihovom opisu predložen je izraz nekrapoza. Ovaj izraz sugerise da apoptoza i nekroza mogu biti pokrenute zajedničkim, istovetnim mehanizmima, a da drugi potpomažući faktori određuju da li će se razviti liza ćelije ili programirano samouništenje. Ovakva hipoteza počiva na ideji da se biohemijski putevi koji dovode do klasične nekroze i apoptoze međusobno preklapaju, sa značajnom ulogom mitohondrija, pre svega u aktiviranju klasičnih apoptotskih puteva i regulaciji ćelijskog ATP. Ukoliko se nivoi ATP održavaju i pored postojeće hipoksije, ćelijska smrt nastaje pre svega apoptozom. Sa druge strane, pražnjenje depoa ATP, vodi ćeliju u smrt nekrozom. Ovakvoj zavisnosti ćelijske smrti od količine ćelijskog ATP ide u prilog lakša pojava nekroze u spoljašnjoj meduli gde je hipoksija pogoršana vazokonstrikcijom i kongestijom, za razliku od kortikalne zone, koja u ABO biva relativno bolje perfundovana (Basile i sar., 2012).

U sklonu ABO, dolazi i do autofagije, procesa u kome ćelija razgrađuje sopstveni sadržaj, a predstavlja jedan od zaštitnih mehanizama za preživljavanje ćelija u uslovima različitog stresa (Zuk i Bonventre, 2016). Naime, pokazano je da se u cisplatin uzrokovanom ABO, autofagične vezikule i autofagozomi pojavljuju u tubulskim ćelijama pre otpočinjanja apoptoze ćelije, te da inhibicijom autofagije, apoptoza ovih ćelija biva izražena u dosta većoj meri (Periyasamy-Thandavan i sar., 2008)

Histološka slika postishemijskog ABO je vrlo varijabilna i zavisi u kojoj se fazi oštećenja posmatra. Mogu se videti delovi ogoljene tubulske bazalne membrane usled deskvamacije ćelija, a ređe postoji i ruptura membrane. Tubuli su dilatirani, a usled gubitka četkastog pokrova, proksimalni kanalići su istanjeni. U lumenu tubula se nalaze cilindri, koji mogu biti eozinofilni, pigmentirani i granulirani. Nekroza, u zavisnosti od stepena oštećenja, može i da izostane, a obično

je fokalna i zahvata proksimalne tubule i ascedentni deo Henleove petlje. Intersticijum je edematozan, sa diskretnom limfocitno – monocitnom infiltracijom (Basta – Jovanović i Marković - Lipkovski, 2009).

U fazi oporavka dolazi do reparacije i regeneracije tubulskih epitelnih ćelija, kao i postepenog povratka GFR na nivoe pre samog oštećenja. U proksimalnim tubulima vitalne epitelne ćelije stvaraju signale koji pokreću proces reparacije. Takođe, citokini koji oslobađaju neutrofilni granulociti i monociti, stimulišu dediferencijaciju i proliferaciju epitelnih ćelija (Bonventre i Yang, 2011).

1.2.4 Biomarkeri akutnog bubrežnog oštećenja

Serumski kreatinin predstavlja jedan od najčešće korišćenih biomarkera za procenu bubrežne funkcije, bilo samostalno ili u proceni GFR i predstavlja važan biomarker u praćenju ABO. Ipak, i pored česte upotrebe u dijagnostici i praćenju razvoja bolesti, korišćenje ovog biomarkera u proceni bubrežne funkcije pokazuje izvesna ograničenja. Pre svega, u dijagnostici ABO, obično je potreban gubitak bubrežne funkcije i do 50%, pre nego što vrednosti kreatinina porastu. Takođe, na produkciju kreatinina značajno utiču i vanbubrežni faktori, kao što su pol, godine života, nutritivni status, postojanje infekcije i dr. Poznato je i da mnogi lekovi remete tubulsku sekreciju kreatinina, te dovode do promena serumskog kreatina nezavisno od GFR (Bojić i sar., 2013; Simsek i sar., 2013). Pored kreatinina, često korišćen marker je urea. Iako serumске vrednosti uree pokazuju inverzan odnos sa padom GFR, one takođe, mogu biti lažno povišene, čak i u većoj meri nego vrednosti kreatinina kod osoba koje konzumiraju namirnice bogate proteinima, usled korišćenja glukokortikoidne terapije, oštećenja tkiva, gastrointestinalnog krvarenja, hipovolemije i dr., a lažno snižene kod pothranjenosti, te hroničnih bolesti jetre (Rizvi i Kashani, 2019). Stoga se poslednjih decenija intenzivno tragalo za biomarkerom koji bi bio nezavisan od drugih kliničkih parametara i karakteristika pacijenta, a koji bi bio u mogućnosti da identifikuje smanjenje GFR ubrzo nakon nastanka (Simek i sar., 2013).

Idealan biomarker za ABO bila bi supstanca koju bi bubrezi otpuštali ubrzo nakon oštećenja i koja bi mogla da bude detektovana u krvi ili urinu, kao i da se značajnije ne metaboliše. Takođe, idealan biomarker bi trebalo da se lako meri neinvazivnim metodama, da pokazuje visoku senzitivnost i specifičnost, te značajnu prognostičku vrednost i biološku verodostojnost.

U svetlu navedenih saznanja, tokom prethodne dve decenije identifikovan je veliki broj serumskih i urinarnih biomarkera koji bi mogli da omoguće ranu dijagnostiku i predvide tok ABO, a među najviše proučenim glavno mesto zauzimaju protein bubrežnog oštećenja - 1 (engl. *kidney injury molecule-1*, KIM - 1) i lipokalin povezan sa neutrofilnom želatinazom (engl. *neutrophil*

gelatinase - associated lipocalin, NGAL). Pored ova dva biomarkera, istraživanja sugerišu i na značajnost drugih potencijalnih biomarkera, poput interleukina 18, cistatina C, tkivnog inhibitora metaloproteinaza – 2, i dr. (Rizvi i Kashani, 2019; Alge i Arthur, 2015; Simek i sar., 2013).

KIM – 1 je transmembranski protein proksimalnih tubulskih ćelija, koji je po sastavu fosfatidilserinski receptor, a u postishemičnom bubregu ispoljava svoje dejstvo tako što prepoznaje apoptotske ćelije i epitelnim ćelijama daje karakteristike fagocitnih ćelija u cilju uklanjanja mrtvih ćelija (Alge i Arthur, 2015; Bajić i sar., 2013; Ichimura i sar., 2008).

Njegova značajnost se ogleda u tome što se u vrlo malim količinama ekspirira u zdravom bubrežnom tkivu. U slučaju ishemijskog ili toksičnog oštećenja bubrega, dolazi do njegove brze i enormne ekspresije na apikalnoj membrani proksimalnih tubulskih ćelija. Upravo ovakva selektivna ekspresija KIM - 1 na oštećenim proksimalnim tubulskim ćelijama predstavlja siguran podsticaj za upotrebu ovog biomarkera, pri čemu urinarne vrednosti KIM – 1 strogo koreliraju sa njegovom ekspresijom u bubrežnom tkivu (Alge i Arthur, 2015; Vaidya i sar., 2006). Prednost KIM – 1 u odnosu na ostale bubrežne biomarkere ogleda se u njegovoj sposobnosti da perzistira nakon bubrežne povrede sve do potpunog oporavka bubrežnih proksimalnih tubulskih ćelija, kao i stabilnost na sobnoj temperaturi i činjenici da osim bubrega, ovaj protein ne ekspirira ni jedan drugi organ u obimu koji bi mogao da utiče na njegovu bubrežnu ekskreciju (Bonventre, 2009; Huo i sar., 2010).

U eksperimentalnim studijama, pokazano je da u postishemijskom ABO serumske koncentracije KIM - 1 rastu značajno ranije nego serumske koncentracije uree i kreatinina, a slični rezultati su dobijeni i u nefrotoksičnim studijama. U ishemijsko/reperfuzijskom oštećenju bubrega, desetominutna ishemija dovodi do značajnog porasta vrednosti KIM - 1, bez promene u serumskim koncentracijama i klirensu kreatinina (Coca i sar., 2008; Jost i sar., 2009; Hung i Yung, 2004; Nijboer i sar., 2009). U humanoј populaciji, takođe je uočen značajan porast ekspresije KIM – 1 u uzorcima tkiva bubrega i urinu obolelih od ABO, a u istoj studiji pronađena je i korelacija između vrednosti KIM – 1 u urinu i težine bolesti (Han i sar., 2002).

NGAL je protein iz porodice lipokalina, molekulske mase 25 kDa. Inicijalno je otkriven u neutrofilnim granulocitima, a ekspirira se u tragovima u različitim humanim epitelnim ćelijama, uključujući bubreg, traheju, pluća, želudac i debelo crevo. U bubregu, debeli ascedentni deo Henleove petlje i sabirni kanali predstavljaju primarno mesto produkcije ovog proteina, a pokazano je da i ćelije proksimalnih tubula luče NGAL u *in vitro* uslovima kao odgovor na pražnjenje depoa ATP. Glavna funkcija ovog proteina je u uklanjanju slobodnog gvožđa koje se oslobađa iz organela tokom ishemijske ili toksične povrede. Ovakvo smanjenje katalitički raspoloživog gvožđa inhibira

rast bakterija i umanjuje stepen oksidativnog stresa tokom povrede organa. Studije ukazuju da je NGAL jedan od maksimalno eksprimiranih proteina u tubulskim ćelijama bubrega ubrzo nakon početka bubrežne ishemije, što mu daje karakteristike odličnog ranog markera ABO (Rizvi i Kashani, 2019; Alge i Arthur, 2015).

Vrednosti NGAL rastu vrlo rano nakon bubrežnog oštećenja, u roku od 1 do 3 sata od oštećenja i 36 do 72 sati pre bilo kakvog povećanja vrednosti kreatinina, dosežu svoj plato 5 dana nakon povrede, a proporcionalne su sa težinom i trajanjem bubrežnog oštećenja (Rizvi i Kashani, 2019; Alge i Arthur, 2015).

NGAL se dosta lako određuje iz krvi i urina, a studije sugerišu da urinarno određivanje ovog biomarkera ima veliku specifičnost za ABO. Njegova sposobnost da predvidi ABO pre klinički ispoljenih znakova i simptoma mogla bi značajno olakšati primenu odgovarajućih preventivnih mera i poboljšati lečenje pacijenta. Sa druge strane, pored bubrega, NGAL se oslobađa iz aktiviranih neutrofilnih granulocita tokom bakterijske infekcije i sistemske inflamacije, kao i inflamacije epitela u kojima se ovaj protein luči, što bi trenutno usled nepostojanja velikog broja kliničkih studija i utvrđenih referentnih i prediktornih vrednosti moglo umanjiti njegovu tačnost u dijagnostikovanju ABO (Rizvi i Kashani, 2019).

1.3. Hipertenzija i akutno bubrežno oštećenje

Arterijska hipertenzija se definiše kao povećanje vrednosti sistolnog arterijskog krvnog pritiska iznad 140 mmHg i dijastolnog iznad 90 mmHg, a deli se na primarnu ili esencijalnu (90 – 95%) i sekundarnu (Žunić, 2020).

Hipertenzija je vodeći uzrok kardiovaskularnih bolesti i prerane smrti širom sveta. Zahvaljujući širokoj upotrebi antihipertenzivnih lekova, globalni srednji krvni pritisak u populaciji ostao je konstantan ili se čak blago smanjio u poslednje četiri decenije. Nasuprot tome, učestalost hipertenzije na globalnom nivou se povećala, a posebno u zemljama u razvoju. Procenjuje se da je tokom 2010. godine 31,1% odraslih osoba (1,39 milijardi) širom sveta razvilo hipertenziju (Mills i sar., 2020). U SAD, prosečno 1 od 3 odrasle osobe, starije od 20 godina boluje od hipertenzije, a njena učestalost se povećava sa godinama života na približno 2/3 kod svih osoba starijih od 60 godina (Roger i sar., 2012).

Hipertenzija predstavlja poligenski poremećaj u kome pojedinačni gen ili kombinacija gena deluju zajedno sa faktorima spoljašnje sredine u nastanku hipertenzije. U odnosu na sredinske faktore, gojaznost predstavlja najvažniji faktor rizika, a procenjuje se da čak 60% osoba obolelih od hipertenzije ima prekomernu telesnu masu. Takođe, povećana učestalost hipertenzije povezana je i

sa povećanim dijetarnim unosom soli, kao i konzumacijom alkohola, smanjenim nivoima fizičke aktivnosti i psihosocijalnim stresom (Žunić, 2020).

Etiologija primarne hipertenzije je multifaktorska, a uključuje različite sredinske i genetičke faktore, te je i njena patogeneza rezultat komplikovane interakcije između navedenih faktora, što je praćeno povećanjem perifernog vaskularnog otpora i volumena krvi, a samim tim i krvnog pritiska. Mnogobrojni patofiziološki mehanizmi i sistemi su uključeni u patogenezu hipertenzije, pre svega simpatički nervni sistem, sistem renin – angiotenzin - aldosteron, a povećanju krvnog pritiska dodatno doprinose inflamacija, endotelna disfunkcija, gojaznost i insulinska rezistencija. Posledice i komplikacije hipertenzije mogu dovesti do razvoja različitih bolesti srca, krvnih sudova, centralnog nervnog sistema, i dr. Na nivou bubrega, dugotrajna hipertenzija dovodi do oštećenja bubrežnog tkiva, bubrežnih krvnih sudova, te razvoja terminalne bubrežne slabosti (Žunić, 2020).

Veza između ABO i hipertenzije je višestruka. Hipertenzija predstavlja jedan od faktora rizika za razvoj ABO, a takođe je čest komorbiditet kod obolelih pacijenata (Dylewska i sar., 2019, Nie i sar., 2017). Sa patofiziološkog aspekta, ABO i hipertenzija su entiteti koji su praćeni povećanim stvaranjem RKV, a enzim NADPH oksidaza, jedan je od glavnih izvora RKV u oba spomenuta stanja (Paravicini i Touyz, 2008; Ratliff i sar., 2016). Kod pacijenta obolelih od hipertenzije, hronično je povećan nivo RKV, a smanjena aktivnost antioksidantnih enzima u krvi i leukocitima. (Redon i sar., 2003, Fortuno i sar., 2004). Takođe, hipertenzija je praćena strukturnim i funkcionalnim promenama krvnih sudova, pre svega smanjenjem normalne endotelne funkcije, povećanjem osetljivosti na vazokonstriktorne supstance, te vaskularnom inflamacijom (Intengan i Schiffrin, 2001).

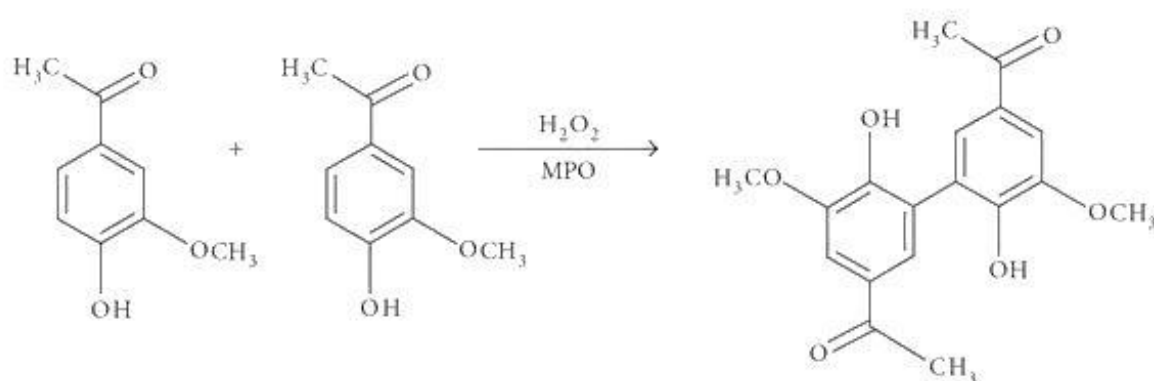
Kako u ABO, oksidativni stres indirektno i/ili direktno utiče na gotovo sve elemente bubrežnog oštećenja, uključujući vaskularnu reaktivnost, bubrežnu hemodinamiku, glomerulsku filtraciju, te tubulsku reapsorpciju i sekreciju u svim segmentima nefrona, a da je već postojeća hipertenzija udružena sa većim nivoima oksidativnog stresa, NADPH oksidaza, kao jedan od glavnih izvora RKV bi mogla da predstavlja i potencijalnu metu za primenu terapijskih modaliteta (Ratliff i sar., 2016).

1.4 Apokinin

Apokinin (4-hidroksi-3-metoksiacetofenon) je poznat kao efikasan inhibitor NADPH oksidaze. Korišćen je u mnogim eksperimentalnim modelima i studijama, gde je pokazano njegovo antioksidativno i antiinflamatorno dejstvo (Li i Wang, 2015; Stefanska i Pawliczak, 2008). Prvi put je opisan od strane *Schmiedeberg*-a 1883. godine kada je izolovan iz korena biljke *Apocynum cannabinum*, a njegovi ekstrakti korišćeni su u lečenju edema i srčanih tegoba. Takođe, 1971. godine apokinin je identifikovan tokom izolovanja imunomodulatornih sastojaka iz korena biljke

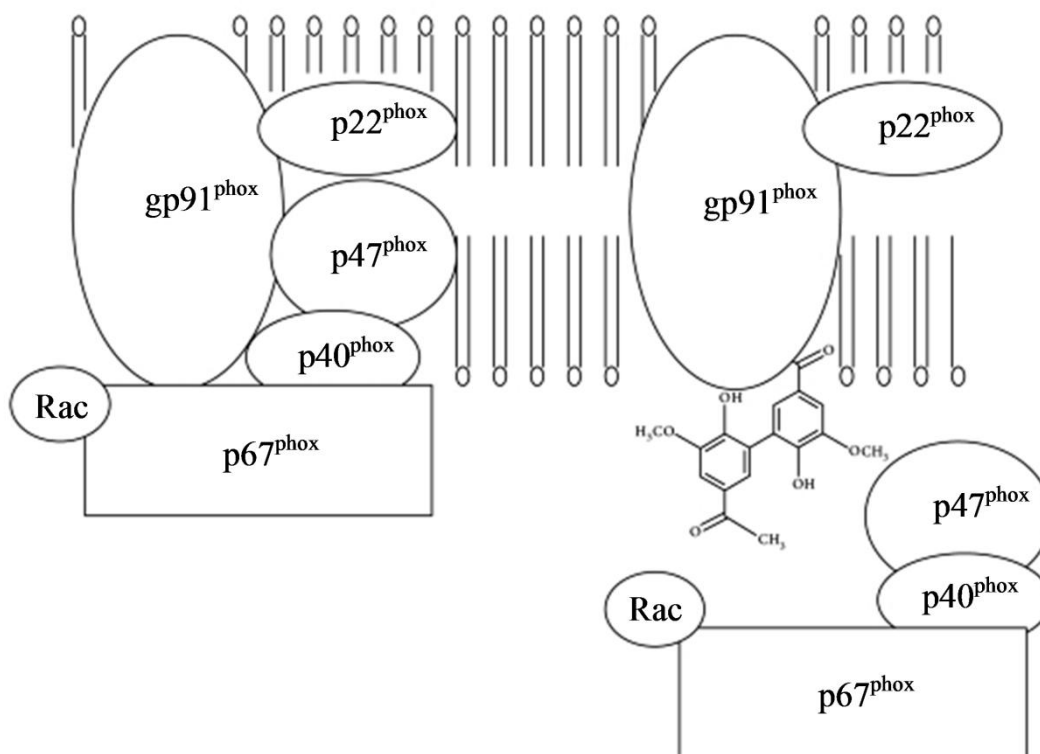
Picrorhiza kurroa, autohtone biljke koja se uzgaja u planinskim predelima Indije, Nepala, Tibeta i Pakistana, dobro poznate u tradicionalnoj indijskoj medicini. Apokinin je acetofenon molekulske težine 166,17 i formira igličaste strukture nagon kristalizacije iz vode. Posедуje slab miris vanile, a tačka topljenja mu je na 115 °C (Luchtefeld i sar., 2008; Hougee i sar., 2006).

U mnogim eksperimentalnim studijama, apokinin je korišćen kao efikasan inhibitor NADPH oksidaze. Iako precizan mehanizam inhibicije nije u potpunosti definisan, on uključuje poremećaj membranske translokacije citoplazmatske komponente *p47phox* enzimskog kompleksa NADPH oksidaze. Takođe, u sklopu ovog mehanizma, otkriveno je da se apokinin, posredstvom mijeloidne peroksidaze prevodi u dimersku formu, za koju se pokazalo da ima bolji efekat od samog apokinina (Stefanska i Pawliczak, 2008), Slika 5.



Slika 5. Prevođenje apokinina u dimersku formu posredstvom mijeloidne peroksidaze (MPO), Stefanska i Pawliczak, 2008.

U fiziološkim uslovima, NADPH oksidaza uzrokuje stvaranje RKV, što u fagocitnim ćelijama dovodi do uklanjanja invazivnih mikroorganizama. Mnogo godina se smatralo da se stvaranje RKV posredstvom NADPH oksidaze odigrava jedino u fagocitima, međutim, u novijim studijama identifikovano je u različitim tkivima nekoliko sličnih izoformi (Panday i sar., 2014). Struktura NADPH oksidaze je prilično kompleksna, sastoji se od dva membranski - vezana elementa (*gp91phox* i *p22phox*), tri citoplazmatske komponente (*p67phox*, *p47phox* i *p40phox*) i nisko - molekuskog G proteina, a aktivacija ovog enzima povezana je sa migracijom citoplazmatskih komponenti na ćelijsku membranu, Slika 6 (Panday i sar., 2014; Stefanska i Pawliczak, 2008). Apokinin svojim dejstvom sprečava translokaciju *p47phox* subjedinice u leukocitima i monocitima, a proces uključuje prisustvo mijeloidne peroksidaze, jer u ćelijama koje ne sadrže mijeloidnu peroksidazu, ova inhibicija izostaje, dok sa druge strane, agensi koji pospešuju oslobađenje mijeloidne peroksidaze, povećavaju i efikasnost apokinina (Stefanska i Pawliczak, 2008).



Slika 6. Mehanizam inhibicije NADPH oksidaze apokininom , Stefanska i Pawliczak, 2008.

Pored navedenog efekta apokinina, nedavne studije ističu i njegove indirektne efekte, pre svega antioksidativnu ulogu kao sakupljača RKV, zatim sposobnost inhibicije endotelne azot - monoksid sintaze (engl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) i od nje zavisne proizvodnje superoksidnog anjona u dijabetičkoj kardiomiopatiji, smanjenu ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i smanjenu retinalnu aktivaciju NF - kB, u dijabetičkoj retinopatiji, i dr. (Savla i sar., 2021). Heumuller i sar. su u svojim eksperimentima pokazali da apokinin pretežno ima antioksidativnu ulogu, te da ne inhibiše NADPH oksidazu u kulturama nefagocitnih ćelija. U vaskularnim ćelijama, apokinin ne blokira NADPH oksidazu, već se prvenstveno ponaša kao antioksidantno sredstvo (Heumuller i sar., 2008). Sa druge strane, opisuju se i paradoksalni prooksidantni efekti apokinina. Naime, Riganti i sar. su pretpostavili da je apokinin sposoban da poveća nivo vodonik - peroksida u glijalnoj ćelijskoj liniji i da pri izglaganju u dužem vremenskom intervalu može da izazove oksidativno oštećenje i citotoksični efekat (Riganti i sar., 2008). Moguće je da je pri maksimalnoj aktivnosti NADPH oksidaze preovladava antioksidativni i protektivni efekat apokinina, što je u dosadašnjim literaturnim podacima višestruko potkrepljeno, a da u odsustvu stimulacije NADPH oksidaze, preovlađuje prooksidativni efekat. Takođe se može pretpostaviti, pošto su sulfhidrilne grupe važne za funkciju leukocitne NADPH

oksidaze, da upravo oksidativni efekat apokinina učestvuje u mehanizmu inhibicije enzima (Riganti i sar, 2006; Riganti i sar., 2008).

Pored nabrojanih efekata, različite studije sugeriraju da, pored inhibicije NADPH oksidaze apokinin inhibira aktivnost citohroma P450 u endotelnim ćelijama, inhibira tromboksan sintazu, ometa polimerizaciju aktina i preuređivanje citoskeleta u polimorfonuklearima, modulira metabolizam arahidonske kiseline kroz još nerazjašnjeni mehanizam, i dr. (Stefanska i Pawliczak, 2008).

1.5 Hiperbarična oksigenacija

Terapija hiperbaričnom oksigenacijom se koristi kao primarna ili pomoćna terapija pacijenata tokom poslednjih 50 godina, ali i u eksperimentalnim i kliničkim studijama. Hiperbarična oksigenacija predstavlja tretman pri kome se pacijent povremeno izlaže dejstvu 100% kiseonika pri pritisku koji je veći od atmosferskog pritiska na nivou mora (Weaver, 2014).

Međutim, uprkos decenijama opsežnih istraživanja, celokupni spektar delovanja ovakvog terapijskog protokola nije još uvek u potpunosti razumljiv, iako su predloženi mnogi potencijalni mehanizmi njegovog dejstva (Drenjančević, 2018).

Od aprila 2016. godine, donet je konsenzus o prihvaćenim kliničkim indikacijama i smernicama u lečenju hiperbaričnom oksigenacijom. Preporuke su navedene kroz tri različita nivoa indikacija: tip 1 – snažne preporuke za hiperbaričnu oksigenaciju kao primarni tretman (npr. trovanje CO, mandibularna osteonekroza, gasna embolija, anaerobne ili mešovite infekcije, dekompresijska bolest, iznenadna gluvoća, itd.); tip 2 – preporuka za tretman hiperbaričnom oksigenacijom, koji je potkrepljen naučnim dokazima (npr. dijabetično stopalo, fraktura glave femura, ishemijski ulkusi, itd.) i tip 3 preporuka gde je terapija hiperbaričnom oksigenacijom opcionalna, jer njeno benefitno dejstvo nije u potpunosti potkrpljeno naučnim dokazima (npr. povrede mozga, radijacijom - indukovane lezije, ishemijsko/reperfuzijsko oštećenje, i dr.). Takođe, donete su i preporuke, za stanja u kojima terapija hiperbaričnom oksigenacijom ne bi trebalo da se koristi, kao što su: poremećaji iz autističnog spektra, placentalna insuficijencija, cerebralna paraliza, i dr. (Mathieu i sar., 2017).

Eksperimentalne studije i klinička zapažanja potkrepljuju dokaze da preventivni tretman hiperbaričnom oksigenacijom ima blagotvorno dejstvo na postishemijsko reperfuzijsko oštećenje (Hentia i sar., 2017). U ishemijskoj povredi, hiperbarična oksigenacija predstavlja korisnu terapijsku strategiju koja za cilj ima povećanje parcijalnog pritiska kiseonika u krvi, koji zatim biva isporučen do ishemijskih područja i oštećenog tkiva u znatno većoj količini nego u normobaričnim

uslovima. Povećan dotok kiseonika u hipoksično tkivo pospešuje ćelijsko disanje, a samim tim i stvaranje ATP. (Calvert i sar., 2007). Povećana difuzija kiseonika u područja sa smanjenim protokom krvi, rezultira i poboljšanom funkcijom endotela i lokalnim smanjenjem zapaljenskog procesa i edema. Takođe, hiperbarična oksigenacija može direktno uticati i na ekspresiju gena, transdukciju signala, kao i na ćelijsku apoptozu (Hentia i sar., 2017), a pokazano je da indukuje i ekspresiju antioksidativnih enzima (Drenjančević i sar., 2013).

Ispitivanje hiperbarične oksigenacije kao terapijskog modaliteta tokom ili nakon ishemijske povrede može se pratiti unazad sve do pionirskih studija *Georga Smitha* (Smith, 1964; Smith i Lawson, 1963; Smith i sar., 1961). Zapravo, *Smith* je prvi izvestio o očuvanju električne aktivnosti moždanog korteksa u prisustvu hiperbarične oksigenacije u eksperimentalnom modelu cerebralne ishemije. Takođe, u *in vivo* modelu srčane ishemijsko/reperfuzijske povrede kod pasa, pokazano je značajno smanjenje mortaliteta, sprečavanjem pojave ventrikularne fibrilacije kod životinja koje su udisale kiseonik pod pritiskom od 2 apsolutne atmosfere (ATA), u poređenju sa grupama koje su udisale sobni vazduh ili kiseonik od 1 ATA. Mnoštvo narednih eksperimentalnih studija dalje je potvrdilo neuroprotektivne efekte hiperbarične oksigenacije na životinjskim modelima nakon okluzije srednje cerebralne arterije (Hentia i sar., 2017).

Studije koje su ispitivale efekte hiperbarične oksigenacije u eksperimentalnim traumatskim oštećenjima mozga pokazale su različite potencijalne mehanizame kojima bi u osnovi mogli biti objašnjeni neuroprotektivnih efekti ovakvog terapijskog postupka. Ove studije sugerišu različite ćelijske i molekularne mehanizame, kao i signalnalne puteve, koji deluju paralelno ili zajedno, doprinoseći oporavku povređenog moždanog tkiva. Navedeni mehanizmi uključuju: ublažavanje sekundarne povrede, povećanje oksigenacije tkiva, smanjenje neurodegenerativnih procesa, smanjenje apoptoze, regulaciju oksidativnog/antioksidativnog statusa, smanjenje oksidativnog stresa, smanjenje reaktivne glioze i formiranja ožiljnog tkiva, smanjenje zapaljenskog procesa, poboljšanje plastičnosti neurona, te promociju sinaptogeneze, neurogeneze i angiogeneze (Drenjančević, 2018).

U ishemijsko/reperfuzijskom oštećenju moždanog tkiva, olakšavajući isporuku kiseonika, hiperbarična oksigenacija poboljšava cerebralnu cirkulaciju, smanjuje cerebralni edem, deluje antiinflamatorno, te smanjuje stepen nekrotičnih promena pospešujući ćelijsko preživljavanje i obnavljanje mitohondrijske oksidativne fosforilacije (Sanchez, 2013).

Mada su pozitivni efekti hiperbarične oksigenacije kao terapijskog modaliteta u ishemijsko/reperfuzijskoj povredi u dosadašnjim studijama poprilično dobro dokumentovani, upotreba hiperbarične oksigenacije kao pretretmana i preventivnog postupka ostaje i dalje poprilična nepoznanica u naučnoj literaturi. U studijama koje su usledile, pokazan je koristan efekat pretretmana hiperbaričnom oksigenacijom u eksperimentalnom modelu fokalne moždane ishemije,

a sam efekat je pokazivao i doznu zavisnost. Takođe, kao potencijalni mehanizam ovakvog korisnog dejstva pretpostavljena je, između ostalog, povećana genska ekspresija i enzimaska aktivnost katalaze, važnog antioksidativnog enzima (Hentia i sar., 2017).

Uzimajući sve činjenice u obzir, eksperimentalni dokazi sugerišu na korisno dejstvo preventivnog tretmana hiperbaričnom oksigenacijom u ishemijsko/reperfuzijskoj povredi. Sa druge strane, primenu ovakvog specifičnog tretmana trebalo bi bolje definisati i istražiti u pogledu doziranja, kao i potencijalnih uticaja specifičnih komorbiditeta prisutnih kod tretiranih pacijenata. Za razliku od klasičnih farmakoloških vidova prevencije i lečenja čini se da hiperbarična oksigenacija pokazuje izvesne prednosti, pre svega jer nudi specifičan rezervoar kiseonika koji može potrajati i do nekoliko časova i biti od velikog značaja u slučaju iznenadne ishemije i hipoksije, poboljšavajući endotelnu funkciju i smanjujući lokalni edem i zapaljenje. Takođe, od velikog je značaja i činjenica da kiseonik do ćelija ne dospeva samo putem krvi, već i difuzijom iz intersticijuma, u kome dostiže visoku koncentraciju tokom tretmana hiperbaričnom oksigenacijom, pružajući veću raspoloživost u poređenju sa bilo kojim farmakološkim sredstvom. Štaviše, niska cena i beznačajni neželjeni događaji čine hiperbaričnu oksigenaciju potencijalno važnom strategijom u prevenciji i lečenju ishemijsko/reperfuzijskih povreda (Hantia i sar., 2017).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita dejstvo preventivnog tretmana hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom, pojedinačno i u kombinaciji, kod spontano hipertenzivnih pacova sa postishemijskim akutnim bubrežnim oštećenjem na:

1. sistemske hemodinamske parametre (srednji arterijski pritisak, srčanu frekvenciju, udarni volumen srca i ukupni periferni vaskularni otpor),
2. bubrežne hemodinamske parametre (bubrežni protok krvi i bubrežni vaskularni otpor),
3. bubrežnu funkciju, i to: određivanjem koncentracije u plazmi i klirensa kreatinina, uree i fosfata,
4. lipidni profil, određivanjem koncentracija triglicerida, ukupnog holesterola, LDL holesterola i HDL holesterola u plazmi
5. parametre oksidativnog stresa (lipidnu peroksidaciju u plazmi, određivanjem reaktivnih jedinjenja tiobarbiturne kiseline (TBARS) i antioksidativne zaštite, određivanjem aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid dismutaze, katalaze, glutation reduktaze i glutation peroksidaze u eritrocitima,
6. vrednosti proteina bubrežnog oštećenja - 1 (KIM - 1) u plazmi,
7. strukturu bubrežnog tkiva pomoću histopatološke analize,
8. imunohistohemijsku ekspresiju 4-hidroksinonenala (4 - HNE), lipokalina povezanog sa neutrofilnom želatinazom (NGAL) i hem oksigenaze – 1 (HO - 1) u bubrežnom tkivu

3. MATERIJAL I METODE

Za potrebe ovog eksperimenta korišćeni su mužjaci spontano hipertenzivnih pacova (engl. *spontaneously hypertensive rats*, SHR), odgajani na Institutu za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu, starosti 24 nedelje i prosečne težine oko 300 grama. Životinje su čuvane u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (konstantna temperatura 22 ± 10 °C, vlažnost $65 \pm 1\%$, 12h ciklus svetlo/tama) i hranjene standardnom hranom za laboratorijske pacove (Veterinarski zavod Subotica, Srbija) sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Eksperimentalni protokol odobrila je Etička komisija za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Srbija (broj 323-07-07783/2020-05/5), kao i Etička komisija Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, Srbija (broj 323-07-02569/2018-05/2), u skladu sa nacionalnim Zakonom o dobrobiti životinja ("Službeni glasnik" br. 41/09).

3.1 Eksperimentalni dizajn

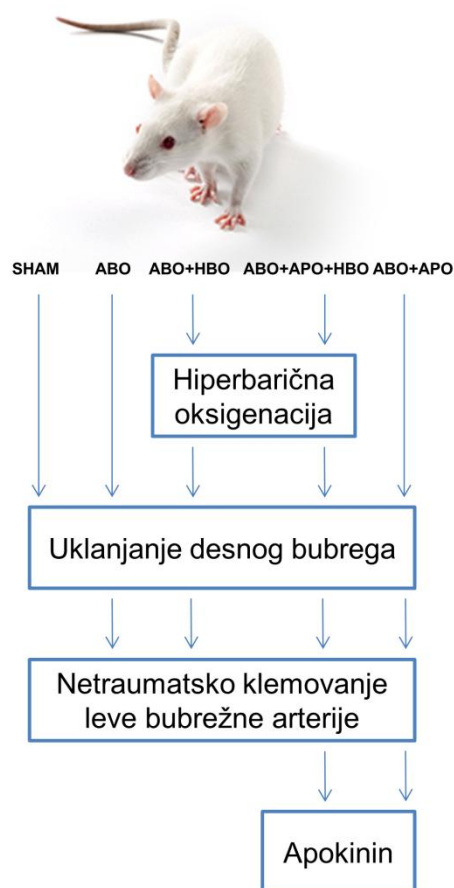
Pre razvrstavanja životinja u eksperimentalne grupe, hipertenzija je potvrđena indirektnim merenjima krvnog pritiska na uređaju *Physiograph Four* (Narco Bio Systems INC, Hjuston, SAD). Nakon toga, životinje su slučajnim odabirom podeljene u 5 eksperimentalnih grupa: lažno operisane životinje (SHAM, n=9), grupa životinja kod kojih je izazvano postishemijsko akutno bubrežno oštećenje (ABO, n=11), životinje koje su nakon izazvanog postishemijskog ABO tretirane apokininom (ABO+APO, n=11), grupa životinja koje su bile izložene tretmanima hiperbarične oksigenacije, od kojih je poslednji bio 12 h pre izazivanja ishemijskog ABO (ABO+HBO, n=14) i grupa životinja koje su nakon tretmana hiperbaričnom oksigenacijom tretirane apokininom 5 minuta pre reperfuzije u eksperimentalnom modelu ishemijskog ABO (ABO+APO+HBO, n=11).

Životinje koje su podvrgnute tretmanu hiperbarične oksigenacije, stavljane su u komoru posebno prilagođenu eksperimentalnim uslovima (*Holywell Neopren*, Beograd, Srbija), Slika 7, gde su izlagane 100% kiseoniku prema sledećem protokolu: 10 minuta spore kompresije, izlaganje vrednostima od 2,0 apsolutne atmosfere (ATA) tokom 60 minuta i 10 minuta spore dekompresije, dva puta dnevno, u razmaku od 12 sati, tokom perioda od dva dana. Ovaj protokol odgovara tretmanu hiperbarične oksigenacije koji se standardno primenjuje u kliničkim uslovima u Centru za hiperbaričnu medicinu u Beogradu (Brkic i sar., 2007) i u skladu je sa preporukama odgovarajućih internacionalnih organizacija (Weaver, 2014). Svako izlaganje se odigravalo u isto vreme u cilju isključivanja mogućih varijacija uslovljenih promenama biološkog ritma. Nakon tretmana hiperbaričnom oksigenacijom, životinjama je merena telesna temperatura, a 12 sati nakon poslednjeg tretmana hiperbaričnom oksigenacijom, životinjama je izazivano ABO.



Slika 7. Komora za hiperbaričnu oksigenaciju posebno prilagođena za rad sa eksperimentalnim životinjama (*Holywell Neopren*, Beograd, Srbija)

Pre hirurških zahvata, pacovi su anestetizirani ubrizgavanjem natrijum pentobarbitala (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), u dozi od 35 mg/kg telesne mase, intraperitonealno. Nakon laparatomije, koja je urađena abdominalnom incizijom, ABO je izazivano uklanjanjem desnog bubrega i okluzijom leve bubrežne arterije netraumatskom klemom u trajanju od 45 minuta (Ivanov i sar., 2014). U grupi lažno operisanih životinja izvođen je istovetan hirurški zahvat, ali bez okluzije leve bubrežne arterije. Inhibitor NADPH oksidaze, apokinin (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), primenjivan je kao bolus injekcija (50 μ L), 5 minuta pre uklanjanja kleme, u dozi od 40 mg/kg telesne mase, intravenski, polietilenskim kateterom plasiranim u femoralnu venu. Životinje bez tretmana apokininom, kontrolno su dobijale bolus injekciju fiziološkog rastvora (50 μ L) intravenski. Nakon izvedenog hirurškog postupka izazivanja ABO, trbušna incizija je zatvarana šavom, a životinje su tretirane analgetikom ketoprofenom (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD) u dozi 5 mg/kg telesne mase, potkožno. Nakon toga životinje su stavljane u metaboličke kaveze na 24 sata, uz slobodan pristup hrani i vodi, radi sakupljanja 24 časovnog urina.



Slika 8. Šematski prikaz eksperimentalnog protokola.

3.2 Hemodinamska merenja

Svi hemodinamski parametri su mereni na anesteziranim životinjama (35 mg/kg telesne mase natrijum pentobarbitala, *Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD, intraperitonealno). Vrednosti srednjeg arterijskog pritiska (engl. *Mean Arterial Pressure*, MAP) su merene pre izvođenja operativnih zahvata i 24 časa nakon reperfuzije, dok su ostali hemodinamski parametri mereni 24 časa nakon reperfuzije. Merenje sistemskih hemodinamskih parametara vršeno je direktnom metodom, pomoću katetera koji je plasiran u femoralnu arteriju (*PE-50, Clay-Adams Parsippany*, Njujork, SAD) i preko elektro-mehaničkog pretvarača, povezanog za uređaj *9800TCR Cardiomax III-TCR* (Kolumbus, SAD). Nakon plasiranja katetera, životinje su ostavljane da se odmore od hirurškog zahvata 20 minuta, a nakon toga registrovan im je MAP (mmHg) i srčana frekvencija (engl. *Heart rate*, HR, otkucaj/min) na gore pomenutom uređaju. Minutni volumen srca (engl. *Cardiac output*, CO) je određivan termodilucionom metodom. Polietilenskim katetrom (*PE-50, Clay-Adams Parsippany*, Njujork, SAD), ispunjenim fiziološkim rastvorom sa heparinom, kanulisana je desna jugularna vena, dok je u levu karotidnu arteriju ubačen termo-senzor za merenje

temperature tela, dok se drugi termo-senzor nalazio u posudi sa hladnim fiziološkim rastvorom, koji je ujedno korišćen i za infuziju preko jugularne vene. Oba senzora su bila povezana sa *9800TCR Cardiomax III-TCR* (Njujork, SAD) uređajem, na kom je očitana vrednost CO (ml/min/kg). Ukupni periferni vaskularni otpor (engl. *Total peripheral vascular resistance*, TPVR) izračunavan je iz vrednosti srednjeg arterijskog pritiska (u trenutku merenja minutnog volumena srca) i minutnog volumena srca, prema sledećoj formuli:

$$\text{TPVR (mmHg x min x kg/ml)} = \text{MAP} / \text{CO}.$$

Za merenje protoka krvi kroz bubrežno vaskularno korito (engl. *Renal blood flow*, RBF), leva bubrežna arterija je pažljivo preparisana. Ultrazvučna sonda unutrašnjeg dijametra od 1 mm (1 RB) je stavljana oko arterije i povezana sa registratorom protoka (*Transonic System Inc.*, Itaka, SAD). Vaskularni otpor kroz bubrežnu arteriju (engl. *Renal vascular resistance*, RVR), je izračunavan deljenjem srednjeg arterijskog pritiska u trenutku merenja protoka, sa odgovarajućim protokom kroz krvni sud. RBF je izražavan u ml/min/kg telesne mase, RVR u mmHg x min x kg/ml.

3.3 Sakupljanje uzoraka

Nakon hemodinamskih merenja, uzimani se uzorci krvi (punkcijom trbušne aorte) i sakupljani u epruvete koje sadrže litijum-heparin (*Sigma-Aldrich*, Sent Luis, SAD) za dalju analizu. Sakupljena krv centrifugirana je 20 minuta na 4000 obrtaja (*Heraeus Megafuge 1.0 R*, *Heraeus*, Hanau, Nemačka) u cilju odvajanja plazme. Dobijeni uzorak plazme čuvan je na -20 °C do momenta analize. Istaloženi eritrociti su resuspendovani i još tri puta isprani fiziološkim rastvorom uz centrifugiranje, u trajanju od 10 minuta na 2000 obrtaja po minuti, a zatim zamrznuti na -80 °C.

Nakon uzimanja uzoraka krvi, životinje su žrtvovane primenom visoke doze pentobarbitala (*Sigma-Aldrich*, Sent Luis, SAD). Za određivanje strukturnih promena i imunohistohemijsku analizu, bubrežno tkivo je uzeto odmah nakon žrtvovanja i zatim pripremljeno za histološko ispitivanje.

3.4 Parametri bubrežne funkcije

Parametri bubrežne funkcije: kreatinin, urea i fosfati određivali su se iz plazme i urina, pomoću automatskog analizatora *COBAS INTEGRA 400 plus* (*Hoffmann-La Roche*, Bazel, Švajcarska) uz korišćenje komercijalnih kitova: koncentracija kreatinina – spektrofotometrijskom metodom za plazmu i urin (*CREJC* i *CREJU* test kasete za plazmu i urin, *Roche Diagnostics*, Nemačka); koncentracija uree - spektrofotometrijskom metodom za plazmu i urin (*UREL* i *URELU*

test kasete za plazmu i urin, *Roche Diagnostics*, Nemačka); koncentracija fosfata - spektrofotometrijskom metodom za plazmu i urin (PHOS2 i PHOS2U test kasete za plazmu i urin, *Roche Diagnostics*, Nemačka).

Za izračunavanje klirensa kreatinina, uree i fosfata korišćen je volumen izlučenog urina tokom 24 h (V), a koji je normiran u odnosu na telesnu masu životinja i izražen kao diureza u $\mu\text{l}/\text{min}/\text{kg}$. Klirensi, izraženi kao $\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$, izračunavani su iz standardne formule:

$$C = U \times V / P$$

C – klirens supstance; V – volumen izlučenog urina tokom 24 h; U – koncentracija supstance u urinu, P – koncentracija supstance u plazmi.

3.5. Lipidni profil

Parametri lipidnog profila: holesterol, LDL (engl. *low density lipoprotein*) holesterol, HDL (engl. *high density lipoprotein*) holesterol i trigliceridi) iz plazme, mereni su pomoću automatskog analizatora *COBAS INTEGRA 400 plus* (*Hoffmann-La Roche*, Bazel, Švajcarska) uz korišćenje standardnih komercijalnih kitova: koncentracija ukupnog holesterola - kolorimetrijskom metodom (*CHOL2* test kasete, *Roche Diagnostics*, Nemačka); koncentracija HDL holesterola - kolorimetrijskom metodom (*HDL_3* test kasete, *Roche Diagnostics*, Nemačka); koncentracija triglicerida - kolorimetrijskom metodom (*TRIGL* test kasete, *Roche Diagnostics*, Nemačka) i koncentracija LDL holesterola – enzimskom kolorimetrijskom metodom (*LDL_C* test kasete, *Roche Diagnostics*, Nemačka).

3.6 Određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Da bi se utvrdio stepen oksidativnog stresa preko intenziteta lipidne peroksidacije, određivana je koncentracija reaktivnih jedinjenja tiobarbituricne kiseline (engl. *Thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) u plazmi. Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima: katalaze (engl. *catalase*, CAT), superoksid dismutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD), glutation-reduktaze (engl. *glutathione reductase*, GR) i glutation-peroksidaze (*glutathione peroxidase*, GSH-Px) određivala se spektrofotometrijski. Merenja apsorbance su vršena na spektrofotometru *Ultraspec 3000 pro UV/Visible* (*Amersham Biosciences Corp.*, Nju Jork, SAD).

3.6.1 Određivanje stepena lipidne peroksidacije

U cilju određivanja stepena lipidne peroksidacije merena je koncentracija TBARS u plazmi (Ohkawa i sar., 1979). U adekvatno pripremljene uzorke plazme dodavana je trihlorsirćetna kiselina (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), a zatim su uzorci inkubirani na ledu 10 minuta, nakon čega su centrifugirani 5 minuta na 15000 obrtaja po minuti. Nakon centrifugiranja, u supernatant je dodavana tiobarbiturna kiselina (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), uzorci su promućkani i nakon toga inkubirani na 100°C u vodenom kupalu tokom 15 minuta. Nakon inkubacije, uzorci su stavljani na mikroploču, a absorbance su očitavane na 540 nm. Koncentracija TBARS-a je izračunavana po sledećoj formuli i izražavana u nmol/ml plazme:

$$C = (A-B) \times 0,012 \times R \times 1000$$

A - apsorbanca uzorka; B - apsorbanca slepe probe; R – razblaženje.

3.6.2 Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima

Uzorci eritrocita su lizirani dejonizovanom hladnom vodom (zapreminski odnos eritrociti:voda 1:6), a pripremljeni lizat je sledećih 30 minuta stajao na ledu. Za potrebe određivanja aktivnosti enzima antioksidativne zaštite, najpre je u lizatima određivan sadržaj hemoglobina. Zatim je, u zavisnosti od analize, lizat razblaživan, i u njemu je određivana aktivnost enzima antioksidativne zaštite: CAT, SOD, GR i GSH-Px.

3.6.2.1 Određivanje sadržaja hemoglobina u eritrocitima

Određivanje sadržaja hemoglobina (Hb) u lizatu krvi vršeno je po već opisanoj metodi (Drabkin i Austin, 1935). U 5 ml Drabkinovog reagensa (Mol, Beograd, Srbija) dodato je 20 µl liziranih eritocita. Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta, u mraku, na sobnoj temperaturi, spektrofotometrijski je merena apsorbanca na talasnoj dužini 545 nm. Sadržaj hemoglobina (g/100 ml) proračunavan je prema sledećoj jednačini formuli:

$$C(\text{Hb}) = \text{apsorbanca uzorka} \times 36,77$$

3.6.2.2 Određivanje aktivnosti katalaze

Za određivanje aktivnosti CAT u lizatu krvi korišćena je metoda koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju brzine redukcije vodonik peroksida u prisustvu CAT na talasnoj dužini 230 nm, a na kojoj vodonik peroksid ima apsorpcioni pik (Beutler, 1982). Za potrebe ove

metode korišćen je *TRIS/EDTA* pufer (*Serva*, Hajdelberg, Nemačka). Rastvor vodonik peroksida pravljen je razblaživanjem 30% vodenog rastvora vodonik peroksida (*Centrohem*, Stara Pazova, Srbija) tako da je apsorbance od 230 nm podešavana na vrednost 0,860. Merenje apsorbance vršeno je u kvarcnim kivetama dodavanjem 50 μ l pufera, uzorka u zapremini potrebnoj da promena apsorbance bude 0,03 – 0,06 min^{-1} i 1 ml rastvora vodonik peroksida. Promena apsorbance praćena je na svakih 30 sekundi u periodu od 3 minuta. Aktivnost CAT, izražena u KU/ g Hb izračunavana je iz sledeće formule: $\text{CAT} = (\Delta A - \Delta K) V / (\epsilon l C V_u)$

ΔA - promena apsorbance uzorka; ΔK - promena apsorbance kontrole; V - ukupna zapremina; ϵ - ekstinkcioni koeficijent; l - dužina optičkog puta; C - koncentracija hemoglobina; V_u - zapremina uzorka

3.6.2.3 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost SOD određivana je indirektnom metodom, koja se zasniva na smanjenju brzine redukcije citohroma c (*Misra i sar.*, 1972.). Uz neprestano mešanje, u prethodno dobijeni uzorak lizata eritrocita dodato je 1 ml etanola (*Zorka Pharma*, Šabac, Srbija) i 0,6 ml hloroforma (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD). Nakon toga uzorci su centrifugirani 15 minuta na 3000 obrtaja u minuti. Nakon centrifugiranja, odvajan je supernatant u kome je određivana aktivnost enzima. Za određivanje aktivnosti SOD korišćeni su Na_2CO_3 / EDTA (*ICN Biochemicals*, Klivlend, SAD) pufer i adrenalin (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD) koji je rastvaran u 0,1 M HCl (*Zorka Pharma*, Šabac, Srbija). U staklenu kivetu sipan je pufer, uzorak u zapremini potrebnoj da redukuje linearni deo krive autooksidacije adrenalina za 30-40% i adrenalin u zapremini potrebnoj da promena absorbance merene na 480 nm bude u rasponu od 0,020 – 0,022 min^{-1} . Aktivnost SOD izražena je u U/g Hb, a izračunata je prema sledećoj formuli: $\text{SOD} = (\Delta A - \Delta K)V/(\epsilon l C V_u)$

ΔA - promena apsorbance uzorka; ΔK - promena apsorbance kontrole; V - ukupna zapremina; ϵ - ekstinkcioni koeficijent; l - dužina optičkog puta; C - koncentracija hemoglobina; V_u - zapremina uzorka

3.6.2.4 Određivanje aktivnosti glutathion-reduktaze

Određivanje aktivnosti GR rađeno je po metodi koja se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, do koje dolazi u reakciji redukcije GSSG (*Andersen i sar.*, 1997).



NADPH - nikotinamid adenine dinukleotid; GSSG - oksidovani glutation; GSH – glutation; NADP⁺ - oksidovana forma NADPH

U kvarenu kivetu sipano je 0,6 ml fosfatnog pufera (0,5 M), 0,1 ml GSSG, 0,1 ml 2 mM GSSG (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), 0,1 ml 50 mM EDTA (*ICN Biochemicals*, Klivlend, SAD), 0,1 ml 2 mM NADPH (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), 0,1 ml uzorka i 3 ml vode. Praćena je promena apsorbance u toku 3 minuta, na 340 nm, a aktivnost enzima, izražena u U/g Hb izračunavana pomoću jednačine: $GR = (\Delta A - \Delta K)V/(\epsilon l C V_u)$

ΔA - promena apsorbance uzorka; ΔK - promena apsorbance kontrole; V - ukupna zapremina; ϵ - ekstinkcioni koeficijent; l - dužina optičkog puta; C - koncentracija hemoglobina; V_u - zapremina uzorka

3.6.2.5 Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze

Aktivnost GSH-Px određivana je po metodi (Andersen i sar., 1997) koja se zasniva na sledećoj reakciji:



GSH – glutation; GSSG - oksidovani glutation, GSH-Px – glutation peroksidaza, GR – glutation reduktaza.

Ovom indirektnom metodom praćena je potrošnja NADPH, odnosno oksidacija NADPH u prisustvu GR, praćenjem promene apsorbance 340 nm. U kvarenu kivetu dodato je 1,6 ml vode, 0,3 ml 1 mM rastvora GSH (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), 0,6 ml 0,2 mM rastvora NADPH (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), 0,3ml 0,5 M fosfatnog pufera, 0,1 ml 0,03 M t-butilhidroperoksida (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), 50 μ l Drapkinovog reagensa (Mol, Beograd, Srbija) i oko 50 μ l uzorka. Reakcija je otpočinjana dodavanjem 5 μ l GR (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, SAD), uporedo su rađeni kontrolni uzorci u kojima su sipani svi reagensi osim uzorka, na temperaturi 37°C.

Praćena je promena apsorbance u toku 150 sekundi na talasnoj dužini od 340 nm. Aktivnost GSH-Px, izražena u U/g Hb, izračunavana je na sledeći način: $GSH-Px = (\Delta A - \Delta K)V/(\epsilon l C V_u)$

ΔA - promena apsorbance uzorka; ΔK - promena apsorbance kontrole; V - ukupna zapremina; ϵ - ekstinkcioni koeficijent; l - dužina optičkog puta; C - koncentracija hemoglobina; V_u - zapremina uzorka

3.7 Određivanje KIM-1 u plazmi

Kvantitativno određivanje KIM-1 proteina u plazmi vršeno je korišćenjem komercijalnog enzimskog imuno - vezujućeg testa (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) (*Sandwich ELISA*, R&D Systems, Mineapolis, SAD). Opseg vrednosti za određivanje KIM-1 bio je 7,8 – 500,00 pg/mL, a pri izvođenju testa u potpunosti su praćena uputstva i preporuke proizvođača.

3.8 Histopatološka analiza

Radi posmatranja strukturnih promena u tkivu bubrega pod svetlosnim mikroskopom, uziman je uzorak bubrežnog tkiva i fiksiran u 10% puferovanom rastvoru formalina. Nakon dehidracije uzetog bubrežnog tkiva u alkoholu, uzorak je ugrađivan u parafinski blok, sečen na isečke debljine 5 µm i bojen hematoksilin eozinom (HE) i perjodnom kiselinom – Šifovovim reagenom (engl. *periodic acid-Schiff*, PAS). Histološke mikroskopske preparate su analizirala dva patologa (nezavisno jedan od drugog), koja nisu bila upoznata sa eksperimentalnim protokolom. Histološka analiza se vršila prema stepenu strukturnog oštećenja, pri čemu su se semikvantitativno ocenjivali sledeći parametri: 1) morfološke promene u ćelijama bubrežnih tubula procenjivale su se na skali od 0 do 4 (0 – normalne tubulske ćelije, 1 – gubitak luminalne membrane ili četkastog pokrova tubulskih ćelija, 2 – bubrenje ćelije praćeno vakuolizacijom citoplazme, 3 – odvajanje ćelija od bazalne membrane tubula, 4 – kao u prethodnom slučaju uz potpuni gubitak epitelnih tubulskih ćelija); 2) dilatacija tubula i prisustvo intraluminalnih PAS pozitivnih cilindara ocenjivalo se na skali od 0 do 3 (0 – bez dilatacije tubula/bez PAS pozitivnih cilindara, 1 – do 10% dilatiranih tubula/PAS pozitivnih cilindara, 2 – do 30% dilatiranih tubula/PAS pozitivnih cilindara, 3 – više od 30% dilatiranih tubula/PAS pozitivnih cilindara). Dobijeni zbir posmatranih promena predstavljao je histopatološki skor za svaku posmatranu grupu i koristio se za statističko poređenje između grupa.

3.9. Imunohistohemijska analiza

Imunohistohemijska analiza vršena je na parafinskim presecima tkiva bubrega, debljine 4 µm, prethodno fiksiranim u 10% formalinu. Na isečcima je prvo vršena deparafinizacija i rehidratacija, nakon čega je vršeno demaskiranje antigena u citratnom puferu (pH 6,0) u mikrotalasnoj rerni. U imunohistohemijskom protokolu korišćene su komponente *Novolink™ Polymer Detection System* (Leica Biosystems, Veclar, Nemačka). Isecci su zatim inkubirani na sobnoj temperaturi tokom 60 minuta sa primarnim antitelom: 4-HNE (1:100, *Anti-4*

Hydroxynonenal, Abcam, ab46545, Kembridž, UK), NGAL (15 µg/ml, *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin/Lipocalin-2*, R&D Systems, AF1757, Mineapolis, SAD), HO-1 (1:100, *Heme Oxygenase 1/HMOX1/HSP32*, Novus Biologicals, NBP1-31341, Litlton, SAD). Sekundarna antitela za 4-HNE i HO-1 su aplikovana iz komercijalnog *Novolink™ Polymer Detection System* (Leica Biosystems, Veclar, Nemačka) kita, dok primarno NGAL antitelo inkubirano sa IgG (H+L) sekundarnim antitelom (1:1000, *Novus Biologicals*, NBP1-74829, Litlton, SAD). Za vizuelizaciju antigen – antitelo reakcije korišćen je 3,3'-diaminobenzidin (DAB) za 4HNE i NGAL (braon promene), dok je 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) korišćen za HO-1 antitelo (crvene promene). Preparati su analizirani na optičkom mikroskopu BX53 sa DP12-CCD kamerom (Olympus, Hamburg, Nemačka).

Za imunohistohemijske skorove 4-HNE i NGAL, posmatran je intenzitet i obim ekspresije u bubrežnim strukturama, a navedeni parametri su semikvantitativno skorovani: intenzitet ekspresije, na skali od 0 do 3 (0 – bez ekspresije, 1 – slaba ekspresija, 2 – umerena ekspresija, 3 – jaka ekspresija); obim ekspresije, takođe na skali od 0 do 3 (0 – bez ekspresije, 1 – fokalna ekspresija, 2 – fokalna do difuzna ekspresija, 3 – difuzna ekspresija). Za imunohistohemijski skor HO-1, usled prisustva drugačijeg obrasca ekspresije, semikvantitativna analiza je vršena na skali od 1 od 6, a skorovanje je odrađeno na sledeći način: 1 – difuzna ekspresija slabog intenziteta na apikalnoj površini proksimalnih tubulskih ćelija, 2 – difuzna ekspresija umerenog intenziteta na apikalnoj površini proksimalnih tubulskih ćelija, 3 – difuzna ekspresija slabog intenziteta u citoplazmi i na apikalnoj površini proksimalnih tubulskih ćelija, 4 – difuzna ekspresija umerenog intenziteta u citoplazmi i na apikalnoj površini proksimalnih tubulskih ćelija, 5 – difuzna ekspresija umerenog intenziteta u citoplazmi proksimalnih tubulskih epitelnih ćelija 6 – difuzna ekspresija jakog intenziteta u citoplazmi proksimalnih tubulskih epitelnih ćelija. Za svaki od navedenih parametara (4-HNE, NGAL i HO-1) suma skorovanih promena predstavljala je imunohistohemijski skor, koji je poređen među grupama.

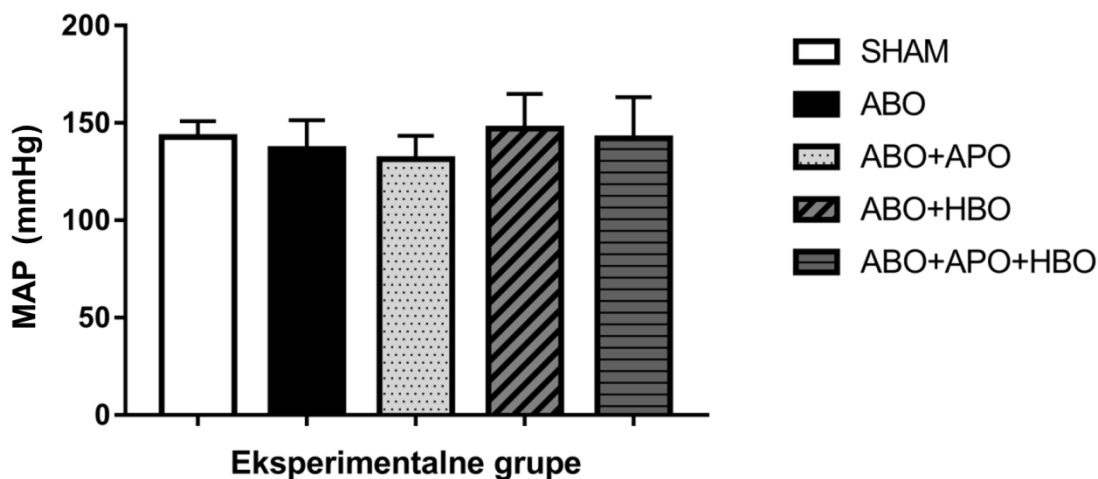
3.10 Statistička analiza

Svi podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). Za poređenje dobijenih vrednosti koristio se Studentov T-test za nezavisne uzorke (pri poređenju SHAM grupe sa ABO grupom) i jednofaktorska analiza varijanse ANOVA sa odgovarajućim post - hoc Dunetovim testom (pri poređenju ABO, ABO+APO, ABO+HBO i ABO+APO+HBO grupa). Za statističku značajnost uzimala se vrednost $p < 0,05$. Za izvođenje statističkih testova koristio se odgovarajući kompjuterski program (*GraphPad Prism for Windows, Version 7.0, GraphPad Software, La Džola, SAD*).

4. REZULTATI

4.1 Hemodinamski parametri

Pre izvođenja operativnih zahvata, vrednosti srednjeg arterijskog pritiska se nisu statistički značajno razlikovale između eksperimentalnih grupa, a vrednosti su prikazane na grafikonu 1.



Grafikon 1. Vrednosti srednjeg arterijskog pritiska pre operativnih zahvata u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=9), ABO (n=11), ABO+APO (n=11), ABO+HBO (n=14), ABO+APO+HBO (n=11); MAP – srednji arterijski pritisak

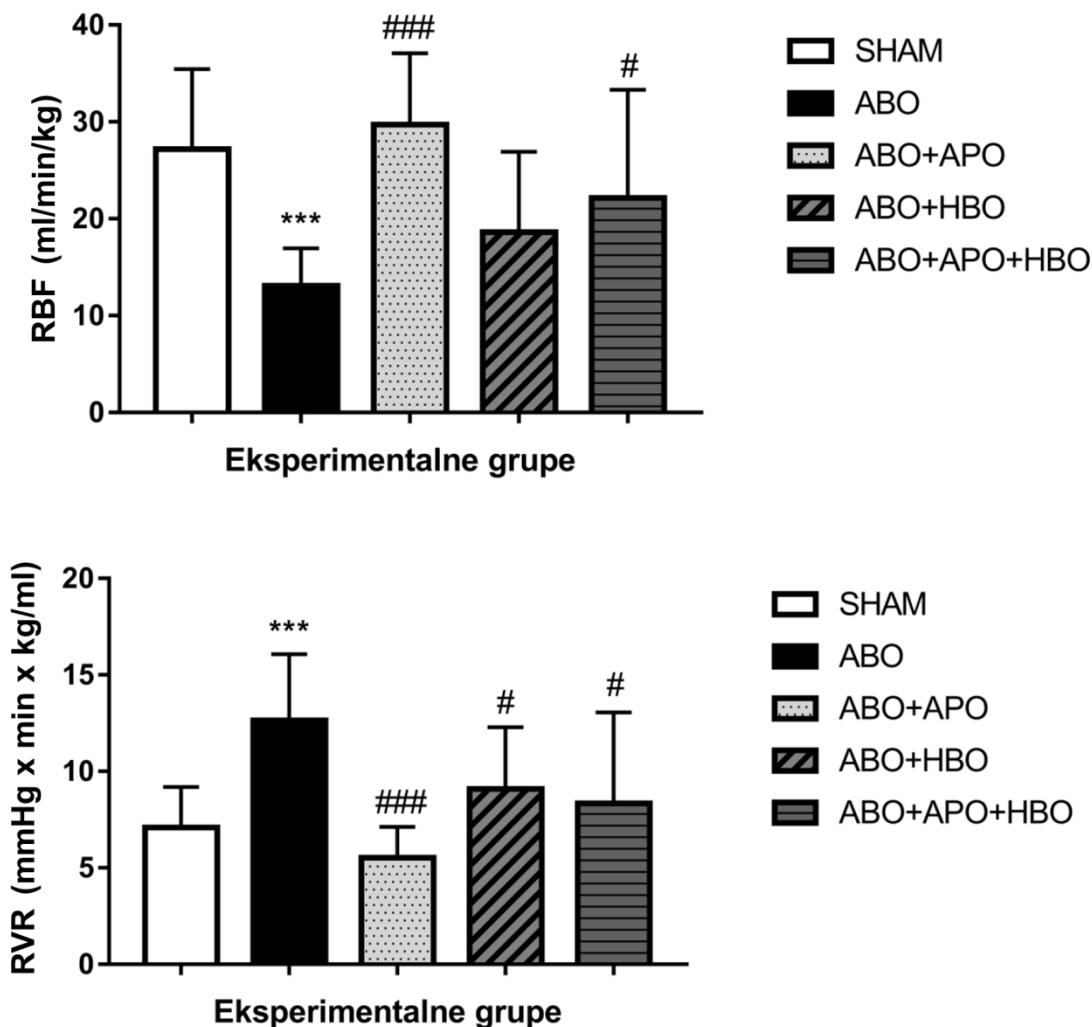
Sa druge strane, 24 sata nakon reperfuzije, vrednosti srednjeg arterijskog pritiska su bile statistički značajno niže u ABO grupi u poređenju sa lažno operisanim pacovima ($p < 0,001$), dok statistički značajne razlike nisu pronađene u grupama gde je vršen predtretman hiperbaričnom oksigenacijom i tretman apokininom, bilo samostalno ili u kombinaciji, u poređenju sa ABO grupom. Posmatrajući ostale sistemske hemodinamske parametre, u ABO grupi, srčana frekvenca je bila značajno snižena u poređenju sa SHAM grupom ($p < 0,05$), dok u vrednostima ukupnog perifernog vaskularnog otpora i minutnog volumena srca nisu pronađene statistički značajne razlike između ove dve eksperimentalne grupe. Tretman apokininom dovodio je do statistički značajnog pada ukupnog perifernog vaskularnog otpora ($p < 0,05$), dok na vrednosti srčane frekvence i minutnog volumena srca nije imao uticaja u poređenju sa ABO grupom. U grupama koje su izlagane hiperbaričnoj oksigenaciji, bilo samostalno ili u kombinaciji sa apokininom, ukupni periferni otpor je u odnosu na ABO grupu bio takođe statistički značajno redukovan ($p < 0,05$). Vrednosti sistemskih hemodinamskih parametara, 24 časa nakon reperfuzije prikazane su u tabeli 1.

Tabela 2. Sistemski hemodinamski parametri, 24 časa nakon reperfuzije.

	SHAM	ABO	ABO+APO	ABO+HBO	ABO+APO+HBO
	(n=9)§	(n=11)	(n=11)§	(n=14)§	(n=7)
MAP (mmHg)	133,11±14,90	102,18±15,28***	91,45±18,46	97,71±20,06	102,29±18,06
HR (otkucaj/min)	435,33±17,77	366,91±92,27*	387,55±27,15	343,43±73,82	397,29±19,13
TPVR (mmHg x min x kg/ml)	0,51±0,24	0,57±0,36	0,33±0,12 [#]	0,36±0,08 [#]	0,32±0,06 [#]
CO (ml/min/kg)	414,75±146,20	394,32±146,00	444,72±121,90	400,09±98,72	470,41±43,51

MAP - srednji arterijski pritisak, HR - srčana frekvencija, TPVR – ukupni periferni vaskularni otpor, CO – minutni volumen srca, n – broj životinja. § za TPVR i CO, SHAM n = 8, ABO+APO n = 10, ABO+HBO n = 12, *p<0,05; ***p<0,001 u poređenju sa SHAM grupom; #p<0,05 u poređenju sa ABO grupom

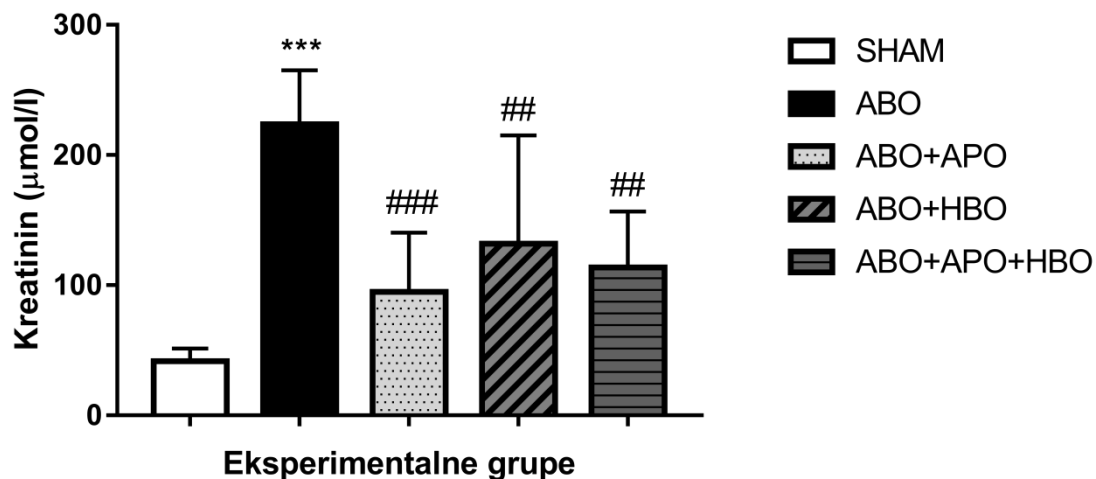
Za razliku od sistemskih hemodinamskih parametara, ABO je statistički značajno redukovalo protok krvi kroz bubrežnu arteriju (p<0,001) i povećalo vaskularni otpor protoka krvi kroz isti krvni sud (p<0,001) u poređenju sa lažno operisanim pacovima. U odnosu na ABO grupu, tretman apokininom je statistički značajno snižavao stepen bubrežnog vaskularnog otpora (p<0,001) i poboljšavao bubrežni protok krvi (p<0,001). U grupama koje su tretirane hiperbaričnom oksigenacijom, udruženo sa apokininom (bubrežni protok krvi - p<0,05; bubrežni vaskularni otpor - p<0,05) ili samostalno (bubrežni vaskularni otpor- p<0,05) su takođe uočena značajna poboljšanja bubrežne hemodinamike, u poređenju sa ABO grupom (Grafikon 2).



Grafikon 2. Bubrežni hemodinamski parametri 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=9), ABO (za BPK n=11, za BVO n=9), ABO+APO (n=11), ABO+HBO (n=13), ABO+APO+HBO (n=9). , RBF – protok krvi kroz renalnu arteriju, RVR – vaskularni otpor protoku krvi kroz renalnu arteriju; ***p<0,001 u poređenju sa SHAM grupom; ###p<0,001, #p<0,05 u poređenju sa ABO grupom.

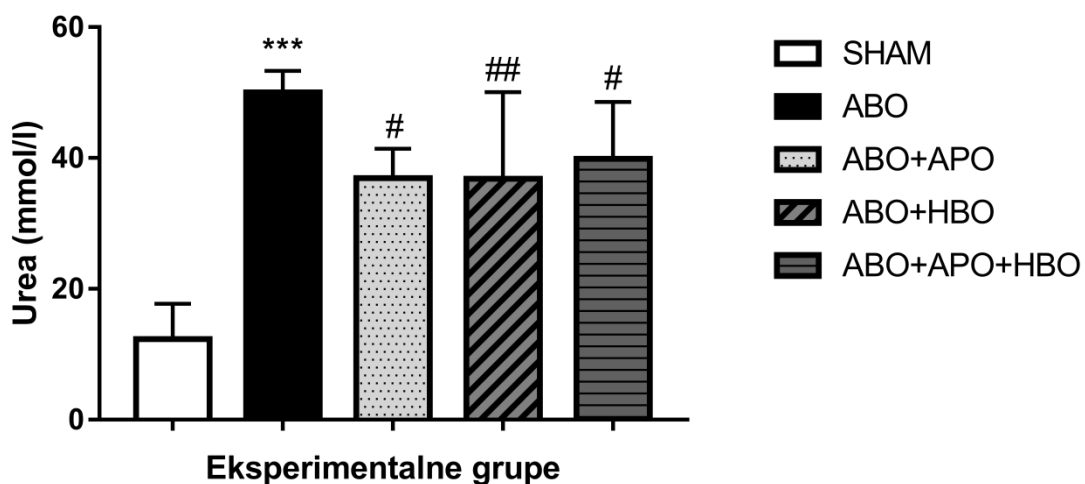
4.2 Parametri bubrežne funkcije

Vrednosti kreatinina u plazmi su statistički značajno porasle nakon izazivanja ABO (p<0,001). Tretman apokininom dovodio je do statistički značajnog pada vrednosti kreatinina (p<0,001). Takođe, u grupama preventivno izloženim hiperbaričoj oksigenaciji, bilo samostalno (p<0,01), ili udruženo sa tretmanom apokininom (p<0,01) vrednosti kreatinina su bile statistički značajno niže u poređenju sa ABO grupom (Grafikon 3).



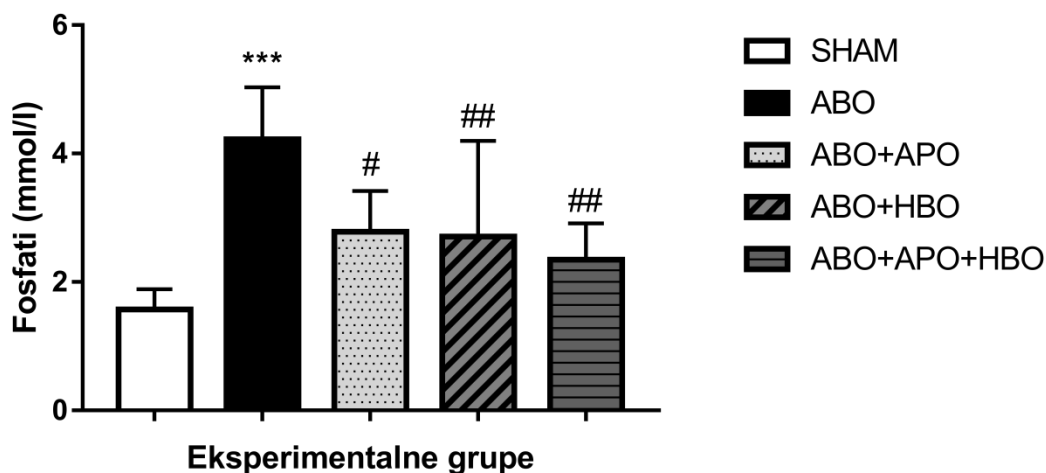
Grafikon 3. Vrednosti kreatinina u plazmi 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=9), ABO+APO (n=11), ABO+HBO (n=14), ABO+APO+HBO (n=9). ***p<0,001 u poređenju sa SHAM grupom; ###p<0,001, ##p<0,01 u poređenju sa ABO grupom.

Vrednosti uree bile su statistički značajno veće u ABO grupi, u poređenju sa SHAM grupom (p<0,001). U tretiranim grupama (ABO+APO, p<0,05; ABO+HBO, p<0,01; ABO+APO+HBO, p<0,05) plazmatske koncentracije uree su statistički značajno opadale u odnosu na ABO grupu (Grafikon 4).



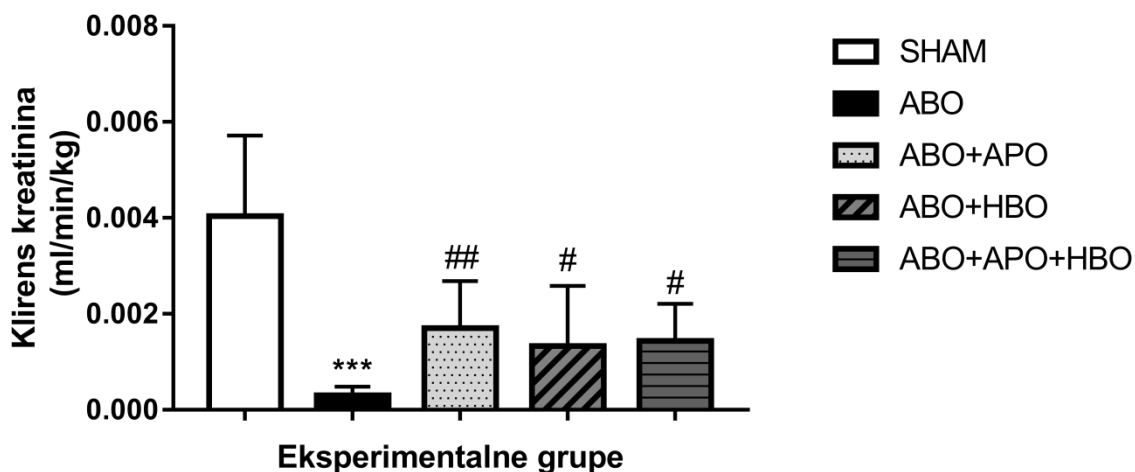
Grafikon 4. Vrednosti uree u plazmi 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=9), ABO+APO (n=9), ABO+HBO (n=14), ABO+APO+HBO (n=9). ***p<0,001 u poređenju sa SHAM grupom; ##p<0,01, #p<0,05 u poređenju sa ABO grupom.

Slično prethodnim parametrima, vrednosti fosfata su bile statistički značajno veće u ABO grupi, u poređenju sa SHAM grupom ($p < 0,001$), dok je statistički značajno smanjenje vrednosti fosfata u plazmi u odnosu na ABO grupu pronađeno u ABO+APO ($p < 0,05$), ABO+HBO ($p < 0,01$) i ABO+APO+HBO ($p < 0,01$) grupama (Grafikon 5).



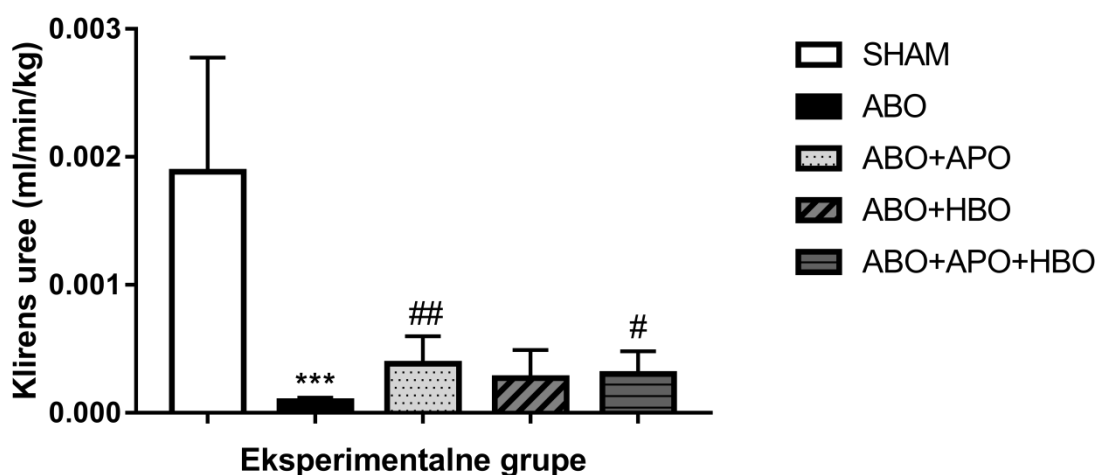
Grafikon 5. Vrednosti fosfata u plazmi 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=8), ABO+APO (n=11), ABO+HBO (n=14), ABO+APO+HBO (n=9). *** $p < 0,001$ u poređenju sa SHAM grupom; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ u poređenju sa ABO grupom.

U skladu sa koncentracijom kreatinina u plazmi, vrednost klirensa kreatinina je statistički značajno opadala u ABO grupi ($p < 0,001$) u poređenju sa lažno operisanim pacovima. U tretiranim grupama: ABO+APO ($p < 0,01$), ABO+HBO ($p < 0,05$) i ABO+APO+HBO ($p < 0,001$) uočen je statistički značajan porast vrednosti klirensa kreatinina u odnosu na ABO grupu (Grafikon 6).



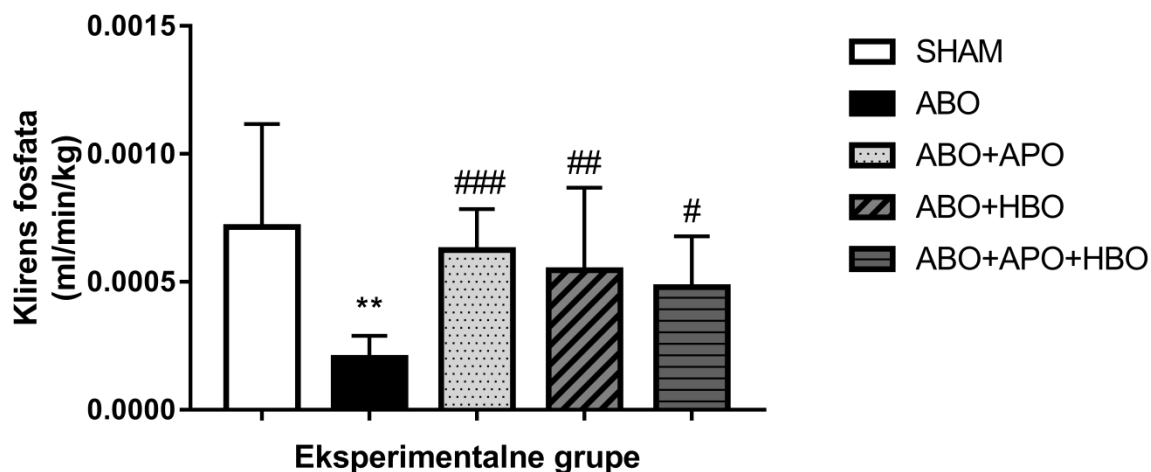
Grafikon 6. Vrednosti klirensa kreatinina 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=9), ABO+APO (n=10), ABO+HBO (n=12), ABO+APO+HBO (n=9). ***p<0,001 u poređenju sa SHAM grupom; ##p<0,01, #p<0,05 u poređenju sa ABO grupom.

U ABO grupi klirens uree je bio statistički značajno niži u poređenju sa SHAM grupom. U grupama tretiranim apokininom, bilo samostalno (p<0,01), ili sinergistički sa hiperbaričnom oksigenacijom (p<0,05) vrednosti klirensa su bile statistički značajno veće u poređenju sa ABO grupom. Statistički značajno povećanje nije uočeno u ABO+HBO grupi (Grafikon 7).



Grafikon 7. Vrednosti klirensa uree 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=9), ABO+APO (n=10), ABO+HBO (n=12), ABO+APO+HBO (n=9). ***p<0,001 u poređenju sa SHAM grupom; ##p<0,01, #p<0,05 u poređenju sa ABO grupom.

Nakon izazivanja ABO klirens fosfata je bio statistički značajno niži u odnosu na SHAM grupu (p<0,01). Tretman apokininom, bilo samostalno (p<0,001) ili u kombinaciji sa hiperbaričnom oksigenacijom (p<0,05) dovodio je do statistički značajnog povećanja vrednosti klirensa fosfata u odnosu na ABO grupu. Takođe, statistički značajno povećanje uočeno je i u grupi sa pretretmanom hiperbaričnom oksigenacijom (p<0,01), (Grafikon 8).



Grafikon 8. Vrednosti klirensa fosfata 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=8), ABO+APO (n=10), ABO+HBO (n=11), ABO+APO+HBO (n=9). ** $p < 0,01$ u poređenju sa SHAM grupom; ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ u poređenju sa ABO grupom.

4.3 Lipidni profil

Uzimajući u obzir parametre lipidnog profila (trigliceridi, ukupni holesterol, LDL holesterol i HDL holesterol, Tabela 3), vrednosti ukupnog holesterola ($p < 0,01$) i LDL holesterola ($p < 0,01$) bile su statistički značajno veće nakon izazivanja ABO, dok statistički značajne promene nisu uočene u vrednostima triglicerida i HDL holesterola u poređenju sa lažno operisanim životinjama. Vrednosti HDL holesterola su u tretiranim grupama bile statistički značajno veće (ABO+APO, $p < 0,01$; ABO+HBO, $p < 0,01$, ABO+APO+HBO, $p < 0,01$) u poređenju sa ABO grupom. Vrednosti ukupnog holesterola, triglicerida i LDL holesterola u tretiranim grupama nisu se značajno menjale u odnosu na ABO grupu.

Tabela 3. Koncentracije ukupnog holesterola, triglicerida, LDL holesterola i HDL holesterola u plazmi, 24 časa nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama.

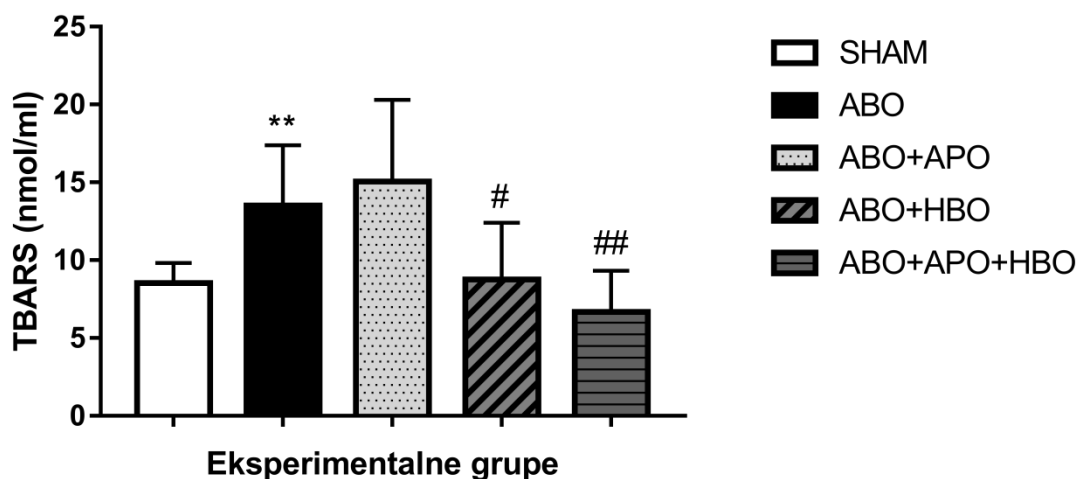
	SHAM (n=7)	ABO (n=8)	ABO+APO (n=7)	ABO+HBO (n=14)	ABO+APO+HBO (n=9)
Holesterol (mmol/l)	1,15±0,17	1,49±0,22**	1,48±0,16	1,51±0,26	1,39±0,16
Trigliceridi (mmol/l)	1,10±1,03	1,15±0,61	2,19±1,68	2,06±1,13	1,82±0,96
LDL holesterol (mmol/l)	0,27±0,08	0,44±0,08**	0,46±0,12	0,47±0,12	0,41±0,08
HDL holesterol (mmol/l)	0,45±0,26	0,54±0,16	0,78±0,12 ^{##}	0,75±0,09 ^{##}	0,79±0,16 ^{##}

**p<0,01 u poređenju sa SHAM grupom; ##p<0,01 u poređenju sa ABO grupom

4.4 Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

4.4.1 Lipidna peroksidacija

Nivoi TBARS u plazmi, kao markera lipidne peroksidacije, prikazani su na grafikonu 9. U ABO grupi postojalo je statistički značajno povećanje ($p<0,01$) nivoa TBARS, u poređenju sa SHAM grupom. Sa druge strane, u poređenju sa ABO grupom statistički značajno smanjenje je uočeno u grupama sa preventivnim tretmanom hiperbaričnom oksigenacijom, bilo samostalno ($p<0,05$), ili u kombinaciji sa tretmanom apokininom ($p<0,01$). Statistički značajne razlike nisu pronađene između ABO i ABO+APO grupa (Grafikon 9).

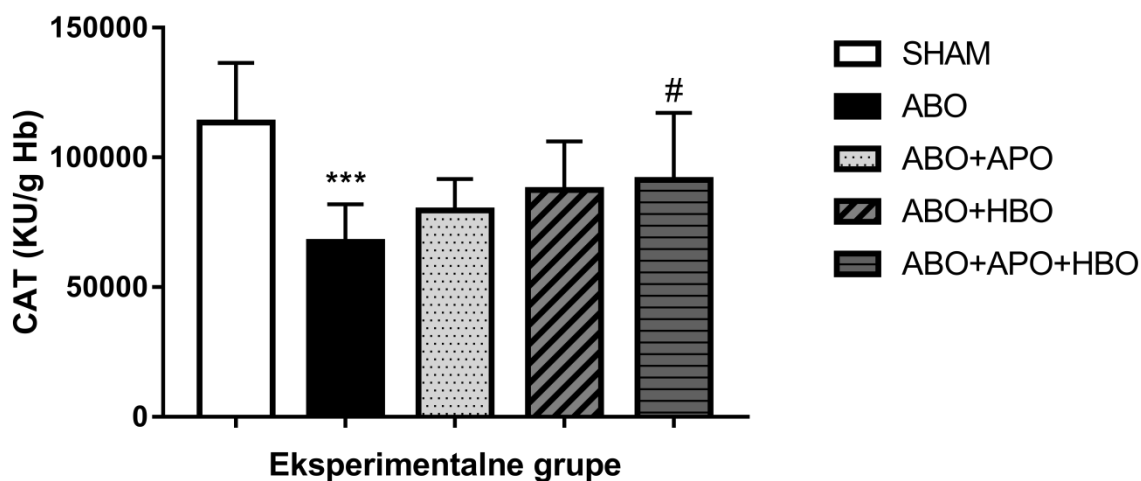


Grafikon 9. Koncentracija TBARS-a 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=8), ABO+APO (n=7), ABO+HBO (n=11), ABO+APO+HBO (n=8). , TBARS – reaktivna jedinjenja tiobarbiturine kiseline; **p<0,001 u poređenju sa SHAM grupom, ##p<0,01, #p<0,05 u poređenju sa ABO grupom.

4.4.2 Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima

4.4.2.1 Aktivnost katalaze

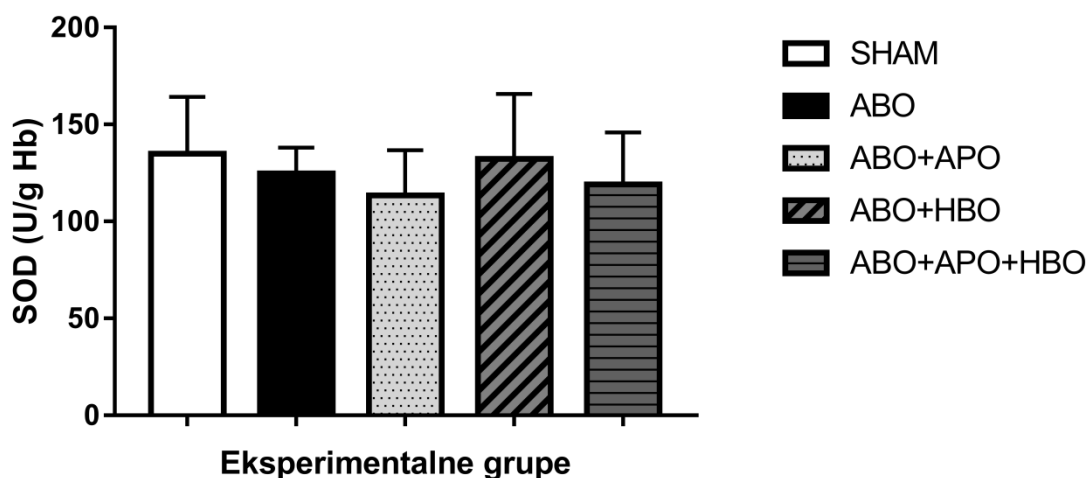
Aktivnost CAT statistički je značajno opadala nakon izazivanja ABO (p<0,001). Sinergističko delovanje hiperbarične oksigenacije i tretmana apokininom dovelo je do statistički značajnog porasta aktivnosti ovog enzima (p<0,05). Samostalni tretmani nisu imali značajnog uticaja na aktivnost CAT (Grafikon 10).



Grafikon 10. Aktivnost katalaze u eritrocitima 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=8), ABO+APO (n=8), ABO+HBO (n=8), ABO+APO+HBO (n=8). , CAT – katalaza; ***p<0,001 u poređenju sa SHAM grupom, #p<0,05 u poređenju sa ABO grupom.

4.4.2.2 Aktivnost superoksid dismutaze

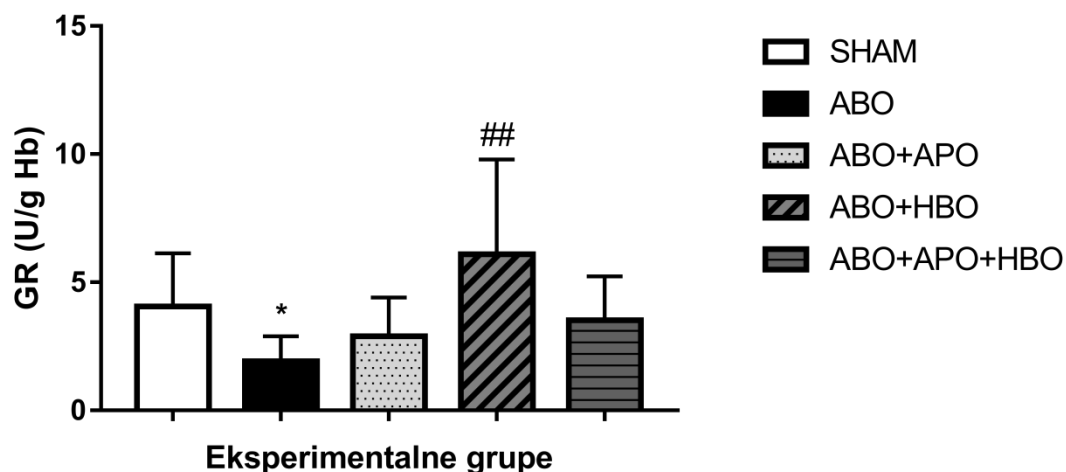
U aktivnosti SOD nisu pronađene statistički značajne razlike između grupa (Grafikon 11).



Grafikon 11. Aktivnost superoksid dismutaze u eritrocitima 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=8), ABO+APO (n=8), ABO+HBO (n=8), ABO+APO+HBO (n=8). , SOD – superoksid dismutaza

4.4.2.3 Aktivnost glutacion-reduktaze

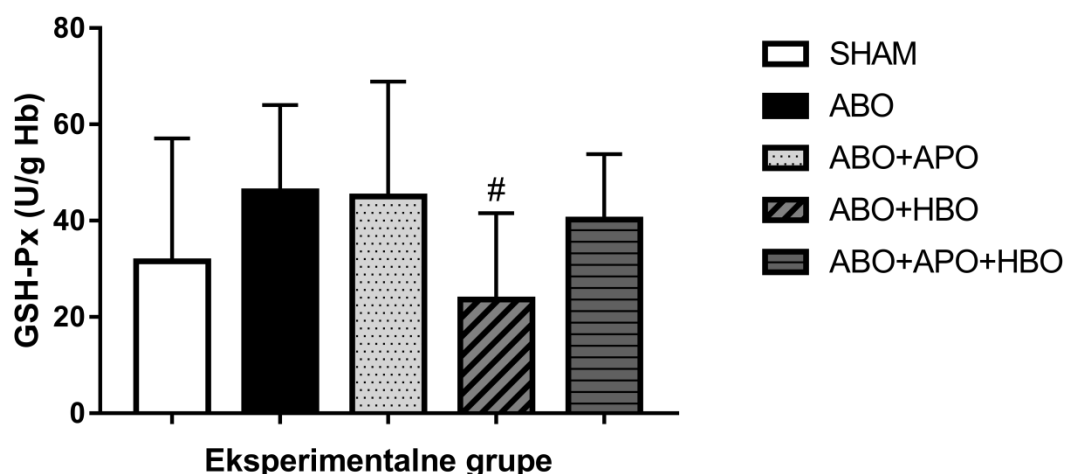
U ABO grupi, aktivnost GR bila je statistički značajno niža u poređenju sa SHAM grupom (p<0,05), dok je u poređenju sa ABO grupom, povećana aktivnost enzima bila izražena u ABO+HBO grupi (p<0,01). U ABO+APO i ABO+APO+HBO grupama nisu pronađene statistički značajne razlike u poređenju sa ABO grupom (Grafikon 12).



Grafikon 12. Aktivnost glutation-reduktaze u eritrocitima 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=8), ABO+APO (n=8), ABO+HBO (n=8), ABO+APO+HBO (n=8). , GR – glutation-reduktaza; *p<0,05 u poređenju sa SHAM grupom, ##p<0,01 u poređenju sa ABO grupom.

4.4.2.4 Aktivnost glutation-peroksidaze

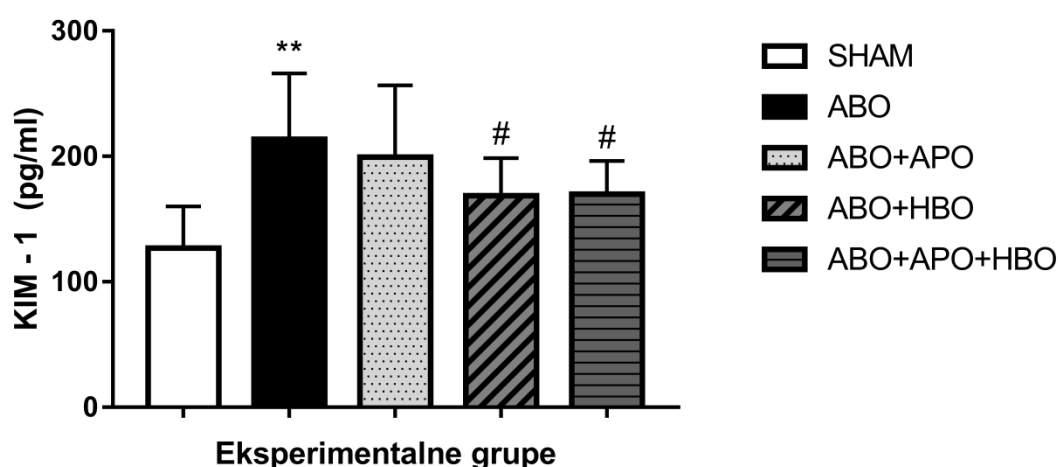
Aktivnost GSH-Px nije se bitnije razlikovala među grupama, sem u ABO+HBO grupi, gde je uočena statistički značajna smanjena aktivnost ovog enzima u odnosu na ABO grupu (p<0,05, Grafikon 13).



Grafikon 13. Aktivnost glutation-peroksidaze u eritrocitima 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=8), ABO+APO (n=8), ABO+HBO (n=8), ABO+APO+HBO (n=8). , GSH-Px – glutation-peroksidaza; #p<0,05 u poređenju sa ABO grupom.

4.5 Vrednosti KIM-1 u plazmi

Vrednost KIM-1 u plazmi statistički je značajno bila veća u ABO grupi u poređenju sa SHAM grupom ($p < 0,05$). U grupama koje su tretirane hiperbaričnom oksigenacijom, bilo samostalno ($p < 0,05$), ili u kombinaciji sa apokininom ($p < 0,05$), uočen je statistički značajan pad vrednosti ovog markera u odnosu na ABO grupu. Sa druge strane u grupi gde je vršen isključivo tretman apokininom nisu uočene statistički značajne razlike u odnosu na ABO grupu (Grafikon 14).

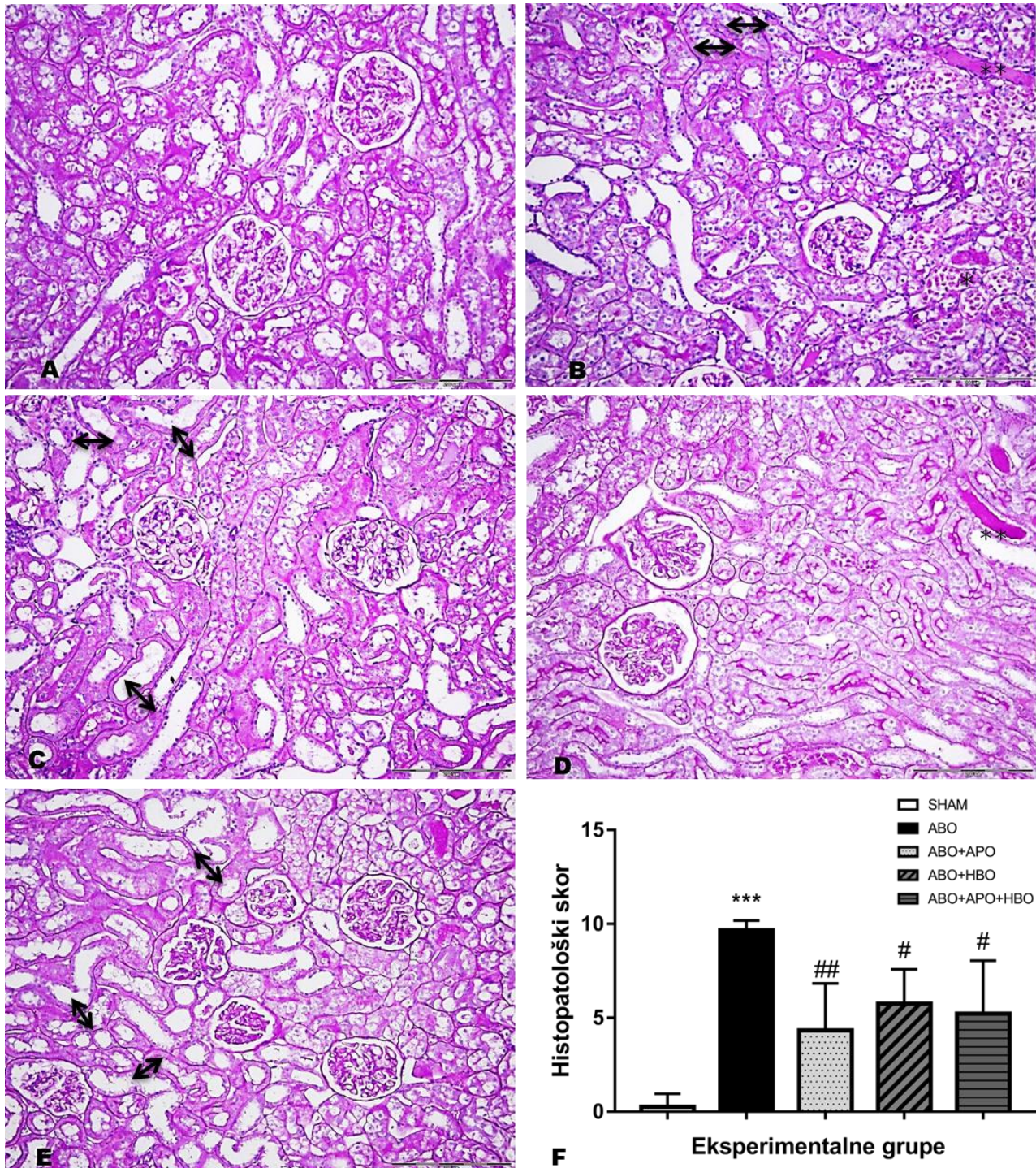


Grafikon 14. Vrednosti KIM – 1 u plazmi 24 sata nakon reperfuzije u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=7), ABO (n=9), ABO+APO (n=11), ABO+HBO (n=13), ABO+APO+HBO (n=11); KIM-1 – protein bubrežnog oštećenja -1, engl. *kidney injury molecule – 1*; * $p < 0,05$ u poređenju sa SHAM grupom, # $p < 0,05$ u poređenju sa ABO grupom.

4.6 Histopatološke promene

Histološkom analizom morfoloških promena tkiva bubrega ustanovljeno je postojanje značajnih razlika između eksperimentalnih grupa životinja. Kod lažno operisanih pacova uočen je normalan izgled glomerula, intersticijuma, tubula i krvnih sudova sa retkim uzorcima gde je primećen manji broj PAS pozitivnih cilindara u lumenu tubula (Slika 9A). U grupi životinja gde je izazivano eksperimentalno ABO uočene su značajne morfološke promene: nekroza tubulskih epitelnih ćelija, dilatacija pojedinih segmenata proksimalnih i distalnih tubula, u najvećem broju slučajeva sa gubitkom četkastog pokrova. Najizrazitije promene su uočene u kortiko-medularnoj zoni sa širokim poljima nekroze tubula i velikim brojem PAS pozitivnih cilindara u sabirnim kanalicima (Slika 9B). U tretiranim grupama (ABO+APO, ABO+HBO, ABO+APO+HBO) nivo

morfološkog oštećenja je bio značajno manji u poređenju sa bubrežima životinja sa ABO. Uočen je manji stepen dilatacije i nekroze tubula u kortiko-medularnoj zoni, sa manjim brojem PAS pozitivnih cilindara (Slika 9C,D,E). Takođe, zbir histopatoloških promena (Slika 9F) bio je statistički značajno veći u ABO grupi, u poređenju sa SHAM grupom ($p < 0,001$). U tretiranim grupama, ovaj skor je bio statistički značajno manji u poređenju sa ABO grupom (ABO prema ABO+APO, $p < 0,01$; ABO prema ABO+HBO, $p < 0,05$; ABO prema ABO+APO+HBO, $p < 0,05$).



Slika 9. Morfološke promene reprezentativnih uzoraka bubreaga u različitim eksperimentalnim grupama (PAS bojenje, x 20 uveličanje): normalna morfologija bubrežnog tkiva sa normalnim

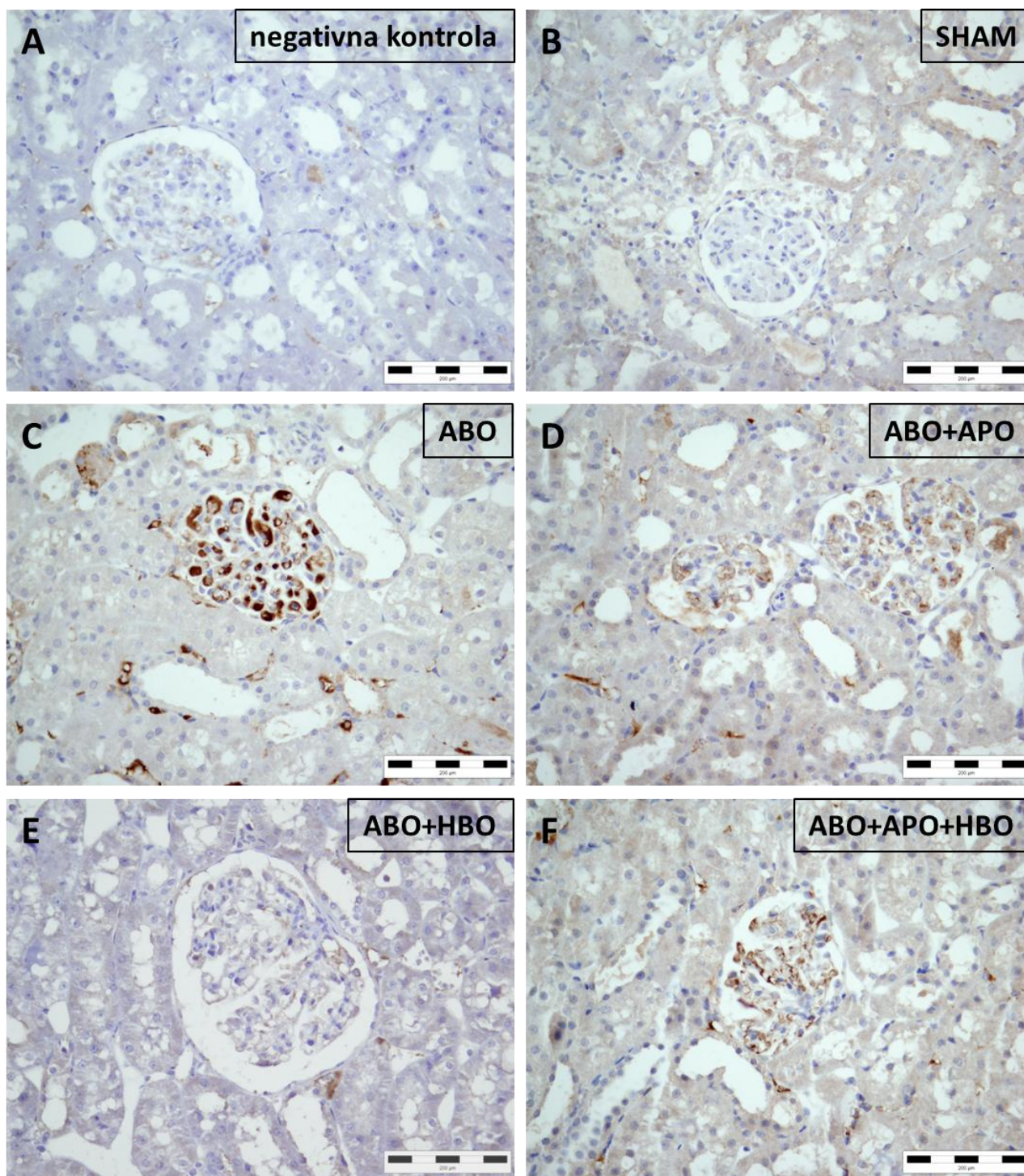
izgledom glomerula, intersticijuma i tubula kod lažno operisanih pacova (n=8) (9A); dilatacija proksimalnih tubula (strelice), nekroza tubulskih epitelnih ćelija (*) i PAS pozitivni cilindri (**) u ABO grupi (n=6) (9B); nekroza tubula umerenog intenziteta, manji stepen dilatacije tubula i manji broj PAS pozitivnih cilindara u ABO+APO (n=6) (9C), ABO+HBO (n=8) (9D), ABO+APO+HBO (n=9) (9E) grupama i histopatološki skor kao zbir prisutnih morfoloških promena (9F); *** $p < 0,001$ u poređenju sa SHAM grupom, ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ u poređenju sa ABO grupom.

4.7 Imunohistohemijska ekspresija 4-HNE, NGAL i HO-1

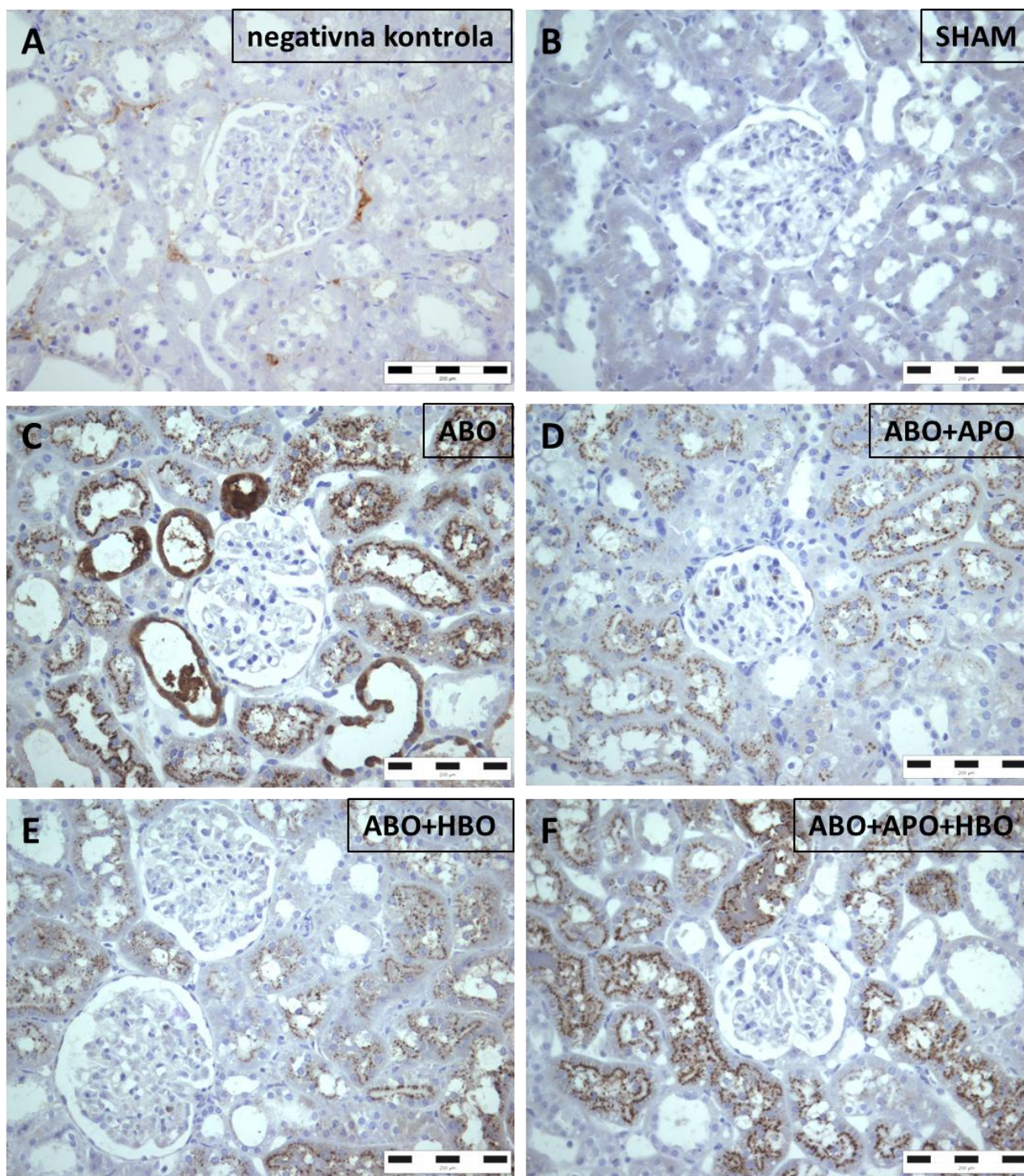
Kod lažno operisanih pacova nije pronađena imunohistohemijska ekspresija 4-HNE (Slika 10B). Sa druge strane, nakon izazivanja ABO, pronađena je izražena i obilna glomerulska ekspresija 4-HNE koja je bila prisutna i u intersticijumu (Slika 10C). Svi tretmani (ABO+APO, ABO+HBO, ABO+APO+HBO) značajno su smanjivali ekspresiju 4-HNE, kako u glomerulima, tako i u intersticijumu, sa najizrazitijim poboljšanjem u ABO+HBO grupi (Slika 10D,E,F).

Slično, NGAL ekspresija nije uočena kod lažno operisanih pacova (Slika 11B). ABO je dovelo do izražene i raširene ekspresije u tubulskim epitelnim ćelijama sa finim zrnastim izgledom na apikalnoj površini ćelija, zahvatajući čitavu cirkumferenciju tubulskog preseka. Ovakav obrazac ekspresije NGAL pronađen je u svim tubulima, uključujući i one bez morfoloških dokaza oštećenja. NGAL je primećen u epitelnim ćelijama naizgled proširenih tubula (morfološki supstrat ABO) (Slika 11C). Tretman apokininom (Slika 11D), pretretman sa HBO (Slika 11E), kao i njihova kombinacija (Slika 11F) smanjili su ekspresiju NGAL i sprečili njegovu difuznu i intenzivnu ekspresiju u dilatiranim tubulima, uz očuvanu, ali u blažem obliku fino zrnastu ekspresiju na luminalnom delu tubulskih epitelnih ćelija.

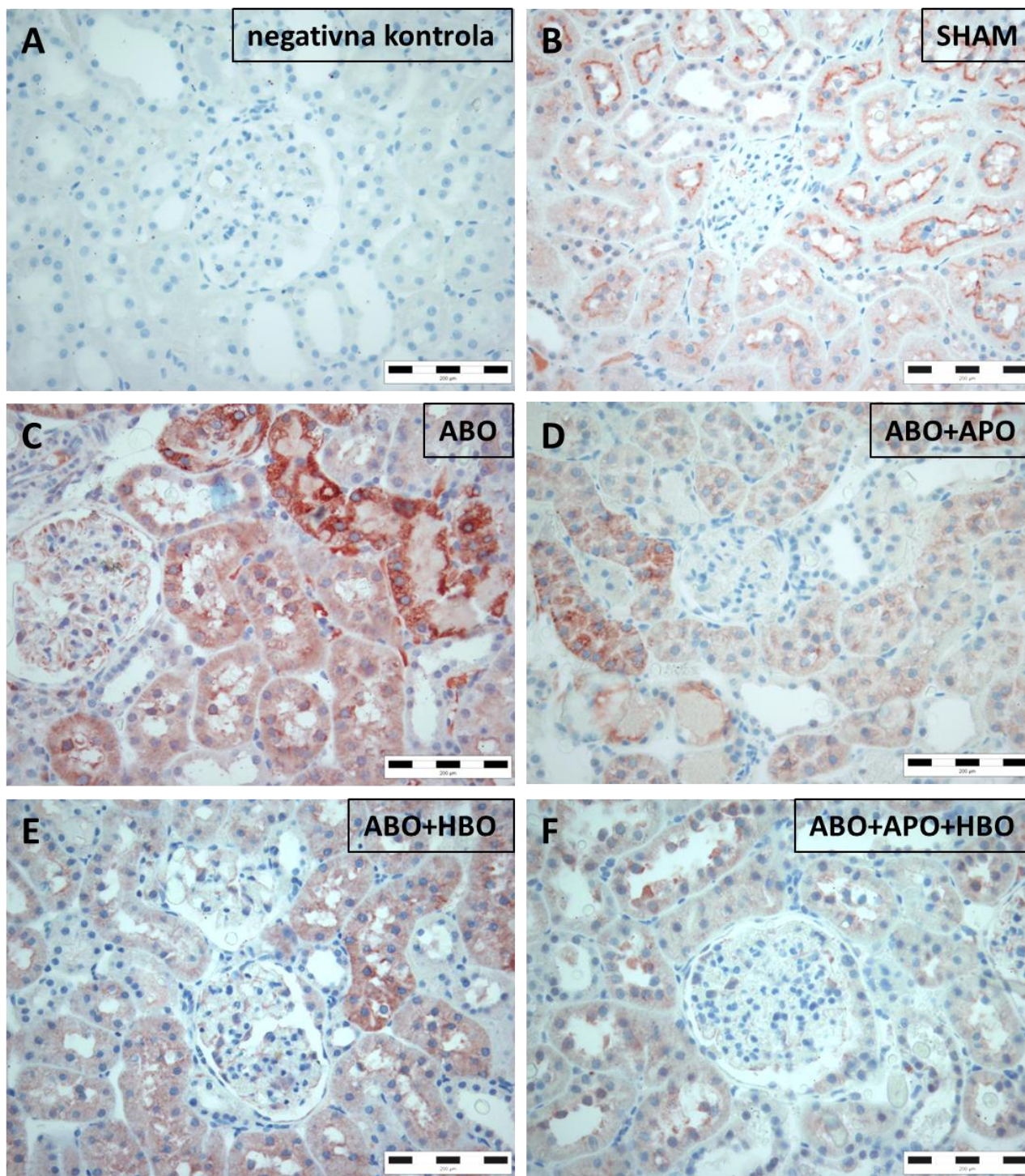
U SHAM grupi je pronađena difuzna ekspresija HO-1, slabog do umerenog intenziteta na apikalnoj površini proksimalnih tubulskih ćelija (Slika 12B). U ABO grupi (Slika 12C), obrazac ekspresije je bio različit, sa umerenom do jakom i difuznom ekspresijom u citoplazmi proksimalnih tubulskih epitelnih ćelija. U poređenju sa ABO grupom, u grupama ABO+APO (Slika 12D), ABO+HBO (Slika 12E) i ABO+APO+HBO (Slika 12F) intenzitet ekspresije HO-1 bio je difuzan, ali sa slabim intenzitetom u citoplazmi proksimalnih tubulskih epitelnih ćelija i obnovljenom ekspresijom na apikalnoj površini proksimalnih tubulskih ćelija, slično obrascu ekspresije koji je prethodno uočen u SHAM grupi.



Slika 10. Imunohistohemijska ekspresija 4-HNE u reprezentativnim uzorcima tkiva bubrega u različitim eksperimentalnim grupama (x 40 uveličanje): negativna kontrola (A), SHAM (B), ABO (C), ABO+APO (D), ABO+HBO (E), ABO+APO+HBO (F); 4-HNE – 4 - hidroksinonenal.



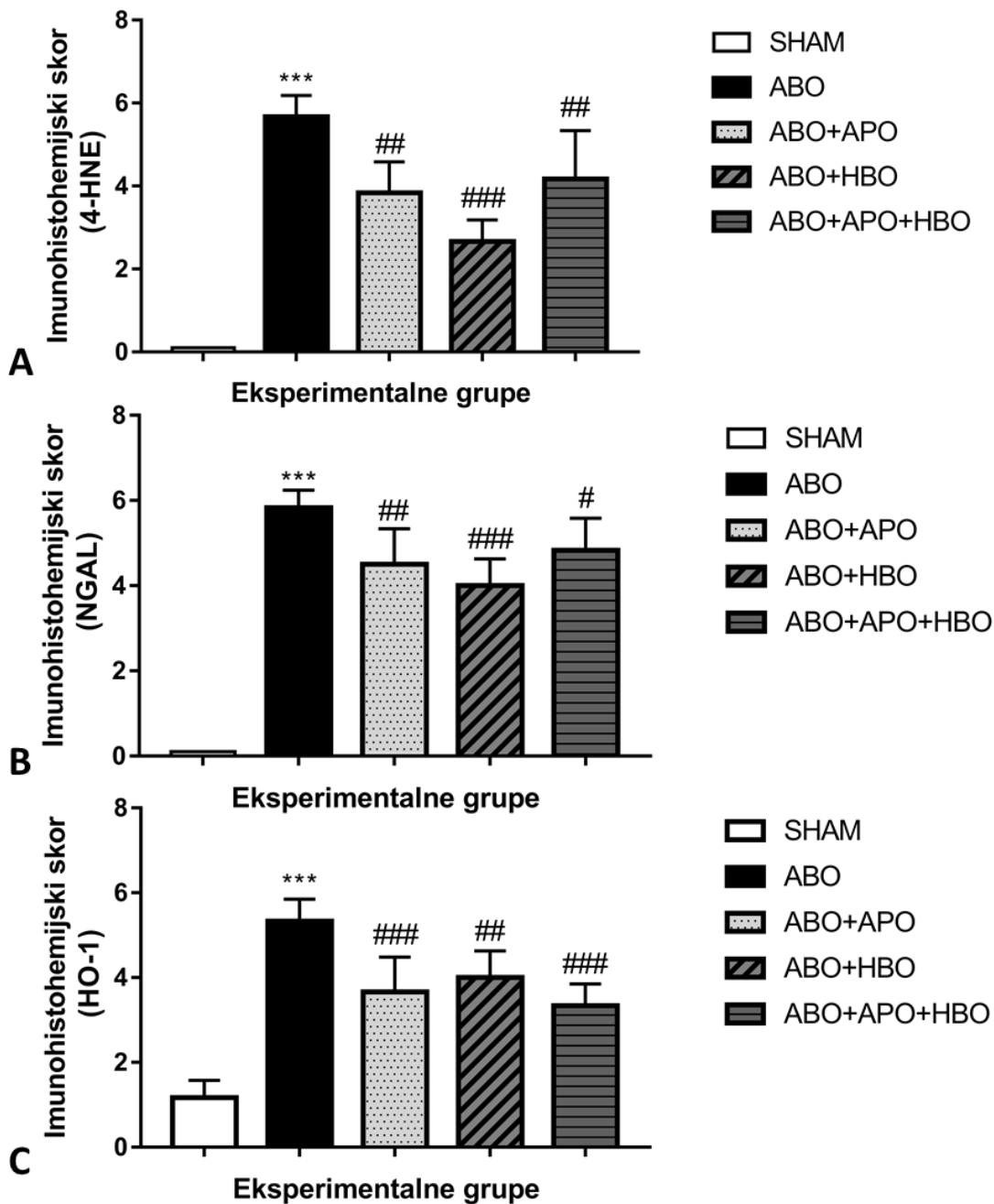
Slika 11. Imunohistohemijska ekspresija NGAL u reprezentativnim uzorcima tkiva bubrega u različitim eksperimentalnim grupama (x 40 uveličanje): negativna kontrola (A), SHAM (B), ABO (C), ABO+APO (D), ABO+HBO (E), ABO+APO+HBO (F); NGAL - lipokalin povezan sa neutrofilnom želatinazom.



Slika 12. Imunohistohemijska ekspresija HO-1 u reprezentativnim uzorcima tkiva bubrega u različitim eksperimentalnim grupama (x 40 uveličanje): negativna kontrola (A), SHAM (B), ABO (C), ABO+APO (D), ABO+HBO (E), ABO+APO+HBO (F); HO-1 - hem oksigenaza – 1.

Imunohistohemijski skorovi ekspresije 4-HNE, NGAL i HO-1, kao semikvantitativni pokazatelji, bili su statistički značajno veći u ABO grupi u poređenju sa SHAM kontrolom (4-HNE, $p < 0,001$; NGAL, $p < 0,001$; HO-1, $p < 0,001$). U poređenju sa ABO grupom, imunohistohemijski

skorovi svakog od posmatranih parametara bili su statistički značajno niži u tretiranim grupama: ABO+ APO (4-HNE, $p<0,01$; NGAL, $p<0,01$; HO-1, $p<0,001$), ABO+HBO (4-HNE, $p<0,001$; NGAL, $p<0,001$; HO-1, $p<0,01$) i ABO+APO+HBO (4-HNE, $p<0,01$; NGAL, $p<0,05$; HO-1, $p<0,001$) (Grafikon 15).



Grafikon 15. Imunohistohemijski skorovi 4-HNE (A), NGAL (B) i HO-1 (C) u različitim eksperimentalnim grupama: SHAM (n=6), ABO (n=6), ABO+APO (n=6), ABO+HBO (n=6), ABO+APO+HBO (n=6); 4-HNE - 4-hidroksinonenal, NGAL - lipokalin povezan sa neutrofilnom želatinazom, HO-1 - hem oksigenaza - 1; *** $p<0,001$ u poređenju sa SHAM grupom, ### $p<0,001$; ## $p<0,01$; # $p<0,05$ u poređenju sa ABO grupom.

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji, po prvi put je pokazano da tretman hiperbaričnom oksigenacijom i apokinin, primenjeni samostalno ili u kombinaciji povoljno utiču na ishemijsko/reperfuzijsko ABO, izazivano kod sponatno hipertenzivnih pacova.

Hipertenzija, kao i postishemijsko ABO, su stanja koja su praćena pojačanim stvaranjem RKV i oksidativnim stresom (Paravicini i Touyz, 2008). U postishemijskom ABO dolazi do povećanja lipidne peroksidacije u plazmi (Ivanov i sar., 2014; Miloradovic i sar., 2014), što je pokazano i u ovom istraživanju, sa posledičnim smanjenjem aktivnosti katalaze i glutathion reduktaze u eritrocitima nakon izazivanja ABO. Ovakav pad aktivnosti enzima antioksidativne zaštite bi se mogao objasniti njihovom preopterećenošću tokom uklanjanja novonastalih RKV nastalih usled ishemije (Tanriverdi i sar., 2017). U ovoj studiji, tretman hiperbaričnom oksigenacijom, pojedinačno ili primenjen sinergistički sa apokininom, smanjivao je lipidnu peroksidaciju u plazmi u odnosu na vrednosti dobijene nakon izazivanja ABO. Terapijska osnova za preventivni tretman hiperbaričnom oksigenacijom leži u činjenici da hiperbarična oksigenacija značajno povećava parcijalni pritisak kiseonika u različitim tkivima, što ujedno može povećati i produkciju RKV. Sa druge strane, povećana produkcija RKV je važan podsticaj za aktivaciju antioksidativnih enzima, što se može smatrati blagodetnim efektom hiperbarične oksigenacije, primenjene kao vid preventivnog tretmana (Sureda i sar., 2009; Labrpuche i sar., 1999). U skladu sa tim, u ovoj studiji je primećeno značajno poboljšanje aktivnosti katalaze u grupi sa kombinovanim tretmanom hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom. Takođe u grupi sa izolovanim tretmanom hiperbaričnom oksigenacijom, uočena je tendencija porasta aktivnosti katalaze, kao i stvarni porast aktivnosti glutathion reduktaze u eritrocitima. Međutim, čini se da trajanje i način izlaganja hiperbaričnoj oksigenaciji igraju važnu ulogu u indukciji enzima antioksidativne zaštite, jer je "pseudohipoksija" koja nastaje u periodu između dva izlaganja presudan faktor za njihovu aktivaciju (Drenjancevic i sar., 2013; Mihaljevic i sar., 2018). U prethodno objavljenim studijama, preventivni tretman hiperbaričnom oksigenacijom imao je povoljan efekat kod ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja u različitim tkivima, pri čemu je uočeno da hiperbarična oksigenacija povećava toleranciju na ishemiju u mozgu, jetri, kičmenoj moždini i srcu (Chen i sar., 1998; Kim i sar., 2001; Nie i sar., 2006; Li i sar., 2008). U navedenim patološkim uslovima aktivnost katalaze može biti presudna za zaštitni efekat protiv oksidativnog stresa. U studiji *Morena* i sar. pokazano je da su intenzivno obojene katalaza - imunoreaktivne ćelije odgovarale neuronima koji su bili otporniji na ishemijsko/reperfuzijsko oštećenje, dok su slabije obojene ćelije bile podložnije oštećenju (Moreno i sar., 1995). *Kim* i sar. su pokazali da pretretman hiperbaričnom

oksigenacijom indukuje katalazu i smanjuje obim infarkta u ishemičnom miokardu pacova (Kim i sar., 2001). U slučaju preventivno primenjenog tretmana hiperbaričnom oksigenacijom postavljaju se dva ključna pitanja: koja od dve komponente hiperbarične oksigenacije (hiperoksija ili hiperbaričnost) povećava otpornost na ishemijsko/reperfuzijsko oštećenje i kojim mehanizmima se ta tolerancija postiže? U eksperimentalnom modelu ishemije kičmene moždine kod zečeva, pretretman hiperbaričnom oksigenacijom (2,5 ATA, 100% O₂) indukovao je znatno poboljšanje u pogledu histopatologije i motoričke funkcije kičmene moždine, dok sa druge strane, samo hiperbarični tretman (2,5 ATA, 21% O₂) nije dovodio do značajnog poboljšanja. Takođe, u istim eksperimentima izlaganje 100% kiseoniku od 1 ATA je rezultiralo boljim histopatološkim ishodom u poređenju sa kontrolnom grupom, što ide u prilog tome da je za blagotvorno dejstvo hiperbarične oksigenacije hiperoksija krucijalna komponenta (Dong i sar., 2002). U drugoj sličnoj studiji, gde je korišćen istovetan eksperimentalni model, pretretman hiperbaričnom oksigenacijom značajno je povećavao aktivnost superoksid dismutaze i katalaze, dok je aplikacija inhibitora katalaze značajno umanjivala povoljan porast ovog antioksidativnog enzima. Autori su zaključili da tretman hiperbaričnom oksigenacijom povećava formiranje RKV, koje potom pokreću signalne puteve zaslužne za povećanu ekspresiju antioksidativnih enzima, a koji u ishemijsko/reperfuzijskom oštećenju imaju značajnu zaštitnu ulogu (Nie i sar., 2006).

Za razliku od tretmana hiperbaričnom oksigenacijom, tretman apokininom, primenjen samostalno, nije uticao na nivoe lipidne peroksidacije u plazmi, kao ni na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima. Uprkos činjenici da se apokinin tradicionalno koristi kao inhibitor NADPH oksidaze, da bi bio efikasan, mora biti preveden pomoću enzima mijeloperoksidaze u aktivni dimer (Simons i sar., 1990). Studija rađena na kulturi ćelija, pokazala je da apokinin ne inhibira NADPH oksidazu u vaskularnim ćelijama, koje konstitutivno ne sadrže mijeloperoksidazu, što delimično može objasniti izostanak smanjenja lipidne peroksidacije kod tretiranih životinja u ovom istraživanju. Suprotno tome, studije sugerišu da apokinin može biti efikasno sredstvo za inaktivaciju NADPH oksidaze u bubrežnom tkivu, što značajno smanjuje bubrežnu lipidnu peroksidaciju (Tian i sar., 2008). Takođe, druge studije sugerišu da je apokinin ima značajnu ulogu "sakupljača" slobodnih radikala u vaskularnim ćelijama (Stefanska i Pawliczak, 2008). *Simplicio* i sar. su pokazali da apokinin povećava aktivnost katalaze u plazmi, što sugeriše da ova supstanca, sistemski posmatrano, ostvaruje prevashodno svoju antioksidativnu ulogu pojačanom neutralizacijom slobodnih radikala (Simplicio i sar., 2017). Takođe, *Lapperre* i sar. su pokazali da apokinin delom ispoljava svoja antioksidativna svojstva tako što povećava sintezu glutaciona (Lapperre i sar., 1999). U ovom istraživanju uočena je tendencija porasta aktivnosti eritrocitne katalaze i glutation reduktaze nakon aplikacije apokinina, ali bez statistički značajne

razlike u odnosu na kontrolnu grupu sa ABO, što se delom podudara sa rezultatima prethodno navedenih studija.

ABO nije uticalo na eritrocitnu aktivnost superoksid dismutaze i glutacion peroksidaze, a promene nisu uočene ni u tretiranim grupama u odnosu na ABO grupu, sem izolovanog smanjenja glutacion peroksidaze u grupi podvrgnutoj pretretmanu hiperbaričnom oksigenacijom. Ovakvi rezultati mogu biti objašnjeni činjenicom da u hipertenziji dolazi do poremećaja glutacionom posredovane antioksidativne zaštite. Pokazano je da se glutacion peroksidaza može inaktivirati u uslovima pojačanog oksidativnog stresa, kao što je hipertenzija, a da je ta inaktivacija posredovana superoksidnim radikalima (Rybka i sar., 2011). Takođe, enzim superoksid dismutaza može biti inaktiviran modifikacijom aktivnog mesta enzima usled pojačane proizvodnje RKV, pri čemu značajnu ulogu ima vodonik peroksid (Tokuda i sar., 1993). Naši rezultati su takođe u skladu sa prethodnim studijama rađenim na istovetnom eksperimentalnom modelu i u istom eksperimentalnom okruženju (Ivanov i sar., 2014).

U bubrežnom tkivu, oksidativni stres je procenjivan na osnovu imunohistohemijske ekspresije 4 – HNE, koji predstavlja aldehidni proizvod lipidne peroksidacije i može da posluži kao biomarker oksidativnog stresa u različitim patološkim stanjima (Breitzig i sar., 2016; Schaur i sar., 2015). 4 – HNE je sposoban da remeti funkciju različitih enzima i signalnih puteva, a u sprečavanju njegovog nakupljanja u bubregu i njegovoj detoksikaciji su uključeni različiti antioksidativni mehanizmi (Petras i sar., 1999). U ovoj studiji smo po prvi put pokazali da se 4 - HNE može koristiti kao marker oksidativnog stresa u postishemijskom ABO, izazvanom kod spontano hipertenzivnih pacova. Takođe, naši rezultati ukazuju da je primenjeni tretman hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom, samostalno, ili udruženom imao protektivno dejstvo u postishemijskom ABO, smanjujući ekspresiju 4 – HNE, a samim tim i smanjujući stepen oksidativnog stresa u bubrežnom tkivu. U grupi u kojoj je izazivano ABO, imunohistohemijskom analizom, pokazana je diferencijalna ekspresija 4 - HNE u bubrežnom tkivu. Ekspresija je bila izražena u glomerulima i intersticijumu, a nije uočena u proksimalnim i distalnim tubulima. Ovakav, na prvi pogled, iznenađujući rezultat može se objasniti različitim kapacitetima razgradnje 4 - HNE od strane glomerulskih, mezangijumskih i tubulskih ćelija. *Petras* i sar. su u eksperimentima na primarnim kulturama mezangijumskih i tubulskih ćelija pokazali da su mezangijumske ćelije podložnije toksičnim efektima 4 - HNE. Oni su zapravo pokazali da je stepen degradacije 4 - HNE uporediv u oba tipa ćelija, nakon egzogenog dodavanja 4 – HNE u rasponu koncentracija od 1 do 10 $\mu\text{mol/L}$. Međutim, nakon egzogenog dodavanja 4 – HNE u koncentraciji od 100 $\mu\text{mol/L}$, uočen je drastično niži kapacitet za razgradnju ovog jedinjenja u mezangijalnim ćelijama u poređenju sa tubulskim ćelijama (*Petras* i sar., 1999). Dakle, može se pretpostaviti da niska sposobnost mezangijumskih ćelija da razgrade 4 - HNE predstavlja važan uslov za toksičnost RKV u

postishemijskom ABO, a njegova smanjena ekspresija u glomerulima i intersticijumu nakon tretmana hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom potencijalni dokaz njihovog protektivnog dejstva.

RKV imaju direktne efekte na vazoreaktivnost bubrežnih krvnih sudova, a sa povećanjem RKV dolazi i do povećanja vaskularnog otpora u bubrežnoj arteriji (Welch i sar., 2001). Sa druge strane, NADPH oksidaza, zajedno sa mitohondrijima, glavni je proizvođač RKV, naročito u njihovom bubrežnom ishemijsko/reperfuzijskom oštećenju (Sachse i Wolf, 2007; Pieczenik i Neustadt, 2007; Nistala i sar., 2008). U bubrežnom tkivu, NADPH oksidaza se eksprimira u krvnim sudovima bubrega, glomerulima, makuli denzi, distalnom tubulu, debelom ascedentnom kraku Henleove petlje i u sabirnim kanalićima (Chabrashvili i sar., 2002). Superoksidni anjon, primarno stvoren aktivnošću NADPH oksidaze u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama, uzrokuje vazokonstrikciju i povećava bazalni tonus u medularnoj cirkulaciji miševa (Zou i sar, 2002). U postishemijskom ABO, tokom početne faze inflamacije, glomerularni mezangijum reaguje stvaranjem superoksidnog anjona i vodonik - peroksida, uglavnom posredstvom NADPH oksidaze (Ratliff i sar, 2016). Oba stanja, hipertenzija i postishemijsko ABO, praćena su povišenim nivoima cirkulišućeg angiotenzina II i aldosterona (Shibata i sar., 2007), koji su u stanju da indukuju stvaranje RKV u mezangijalnim ćelijama (Sachse i Wolf, 2007; Lee i sar., 2003). Ovako nastali, povećani nivoi RKV predstavljaju stimulus za novo stvaranje angiotenzina II u podocitima i mezangijumskim ćelijama, koji pozitivnom spregom promovišu dalje stvaranje RKV (Yadav i sar., 2010; Lodha i sar., 2002; Bhaskaran i sar., 2003). S druge strane, i NADPH oksidaza može biti stimulirana pomoću angiotenzina II, (Hattori i sar, 2005) stimulacijom angiotenzinskih receptora tipa 1, odnosno mineralokortikoidnih receptora (Hua i sar., 2012). Ivanov i sar. su u svojoj studiji pokazali da je u kombinovanom modelu hipertenzije i postishemijskog ABO, oksidativno oštećenje bubrega snažno posredovano angiotenzinom II (Ivanov i sar., 2014). Uzimajući u obzir prethodno izrečeno, možemo pretpostaviti da su povećani nivoi oksidativnog stresa, uz povećanje angiotenzina II, veoma važni faktori koji utiču na bubrežnu hemodinamiku, pre svega na povećanje vaskularnog otpora i smanjenje protoka krvi u bubrežnoj arteriji.

U našoj studiji dolazilo je do statistički značajnog pada protoka krvi i porasta vaskularnog otpora u bubrežnoj arteriji nakon izazivanja ABO, a bubrežni hemodinamski parametri su bili značajno poboljšani nakon aplikacije apokinina. Kao što je već napomenuto u prethodnom izlaganju, iako je apokinin tradicionalno poznat kao inhibitor NADPH oksidaze (Park i sar., 2004), studije ukazuju da ova supstanca ne inhibira NADPH oksidazu prisutnu u vaskularnim ćelijama, već da na nivou krvnih sudova pre ima indirektnu antioksidativnu ulogu, a da je apokininom posredovana direktna inhibicija NADPH oksidaze moguća u ćelijama koje sadrže mijeloperoksidazu, kao što su leukociti (Heumuller i sar., 2008). Imunski odgovor na akutno

bubrežno oštećenje u reperfuzionoj fazi, važan je faktor koji doprinosi daljem oštećenju bubrega i smanjenoj bubrežnoj funkciji (Kinsey i Okusa, 2012), a nakupljeni leukociti predstavljaju dodatni izvor RKV (Kelly i sar., 1996; Li i sar., 2007; Tadagavadi i sar., 2010). Stoga, možemo pretpostaviti da upravo apokinin, inhibicijom leukocitarne NADPH oksidaze smanjuje stvaranje RKV, a samim tim i angiotenzina II, te na taj način poboljšava vaskularni otpor i protok krvi kroz bubrežnu arteriju. Takođe, *Schuter* i sar. su pokazali da je apokinin sposoban da izazove vazodilataciju inhibicijom Rho kinaze, što bi mogao da bude i dodatni mehanizam za objašnjenje povoljnog dejstva apokinina na bubrežnu hemodinamiku (Schluter i sar., 2008).

Takođe, slični, povoljni efekti na bubrežne hemodinamske parametre dobijeni su u našoj studiji i nakon preventivnog tretmana hiperbaričnom oksigenacijom, a naši rezultati su u skladu sa rezultatima *Rubinsteina* i sar., koji su pokazali da tretman hiperbaričnom oksigenacijom prouzrokuje bubrežnu vazodilataciju (Rubinstein i sar., 2009). *Klemetti* i sar. su pokazali da kod pacova kratkoročni tretman hiperbaričnom oksigenacijom može biti korišćen u cilju poboljšanja protoka krvi u tkivima koja zarastaju (Klemetti i sar., 2005). Eksperimentalne studije ukazuju na protektivne efekte hiperbarične oksigenacije, korišćene kao preventivni tretman u ishemijsko/reperfuzijskom oštećenju. Ovako korišćen tretman omogućava tkivima svojevrsan rezervoar kiseonika, koji može potrajati i više časova i imati važnu ulogu u slučaju iznenadne tkivne hipoksije ili ishemije. Pored toga što kiseonik biva isporučen ćelijama putem krvi, on biva isporučen i difuzijom iz intersticijuma, gde tokom tretmana hiperbaričnom oksigenacijom dostiže izuzetno visoke koncentracije. U endotelnim ćelijama, tretman hiperbaričnom oksigenacijom dovodi do poboljšanja njihove funkcije i smanjuje lokalnu inflamaciju i edem (Hentia i sar., 2018). Takođe, kako RKV dovode do povećanja vaskularnog otpora u bubrežnoj arteriji, može se pretpostaviti da tretman hiperbaričnom oksigenacijom poboljšava antioksidativnu zaštitu i smanjuje nivoe oksidativnog stresa (Li i sar., 2008; Welch i sar., 2001), a samim tim poboljšava i bubrežnu hemodinamiku.

Uzimajući u obzir sistemske hemodinamske parametre, merene u ovoj studiji, ABO je dovelo do značajnog pada srednjeg arterijskog pritiska i srčane frekvence. *Bowmera* i sar. sugerišu da uremija utiče na smanjenje senzitivnosti α_1 adrenergičkih receptora, što uzrokuje pad navedenih parametara nakon izazivanja ABO (Bowmer i sar., 1983). Ovakvo objašnjenje korelira sa visokim sistemskim vrednostima uree, uočenim i u našoj studiji. U tretiranim grupama dolazilo je do značajnog pada ukupnog vaskularnog perifernog otpora u odnosu na ABO grupu, bez promena u vrednostima srednjeg arterijskog pritiska i srčane frekvence. *Rubinstein* i sar. su pokazali da u eksperimentalnom modelu ishemijsko/reperfuzijskog ABO, tretman hiperbaričnom oksigenacijom ne utiče na vrednosti srednjeg arterijskog pritiska (Rubinstein i sar., 2009). Sa druge strane, smanjene vrednosti ukupnog vaskularnog perifernog otpora u tretiranim grupama mogle bi biti

objašnjene smanjenim stvaranjem RKV. U normotenzivnim uslovima, krvni pritisak je striktno regulisan različitim endogenim vazodilatatorima i vazokonstriktorima i ne zavisi u bitnijoj meri od vaskularnog formiranja superoksidnog anjona. Sa druge strane, u hipertenziji, dolazi do povećane produkcije RKV od strane vaskularnih ćelija, koji dalje dovodi do endotelne disfunkcije posredovane oksidativnim stresom (Baumer i sar., 2007). U eksperimentalnoj hipertenziji, apokinin povoljno utiče na funkcionalne i strukturne promene i prevenira ili čak i redukuje porast krvnog pritiska. Dodatno, potencijalni mehanizam kojim apokinin ispoljava ovakvo dejstvo uključuje povećanu ekspresiju i aktivnost NO (Baumer i sar., 2007; Viridis i sar., 2016)

Nakon ishemijsko/reperfuzijskog bubrežnog oštećenja u eksperimentalnim grupama dolazilo je do statistički značajnog povećanja koncentracija kreatinina, uree i fosfata u plazmi, uz proporcionalan pad klirensa pomenutih jedinjenja, dok je tretman hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom, samostalno i udruženo dovodio do značajnih poboljšanja ovih parametara. Ovakvi rezultati su u skladu sa prethodno prikazanim rezultatima bubrežnih hemodinamskih parametara u našoj studiji. Tokom ishemijsko/reperfuzijskog ABO, kao rezultat smanjenja GFR, ujedno se smanjuje i sposobnost bubrega da filtrira kreatinin i neproteinske završne produkte (Ivanov i sar., 2014). Štaviše, nivoi uree i mokraćne kiseline takođe bivaju povišeni, sa često prisutnom i hiperfosfatemijom (Rubinger i sar., 2005; Perrone i sar., 1992). U ishemijsko/reperfuzijskom ABO, reperfuzijska faza predstavlja trenutak kada dolazi do znatnog oštećenja bubrežnog tkiva. Početni događaj tokom reperfuzije je nagli porast proizvodnje superoksidnog anjona u mitohondrijima, koji se oslobađa unutar ćelije, a koji je glavni pokretač štetnih efekata koji slede nakon reperfuzije (Zweier i sar., 1987; Chouchani i sar., 2016). Takođe, fazu reperfuzije prati i izraziti inflamatorni odgovor, uglavnom posredovan neutrofilnim granulocitima koji su u stanju da stvaraju dodatne količine RKV nakon svoje aktivacije, a enzim NADPH oksidaza predstavlja glavni izvor njihove produkcije (Friedewald i Rabb, 2004; Belambri i sar., 2018). Različite studije ukazuju da bi apokinin na osnovu svog antioksidativnog i antiinflamatornog dejstva mogao doprineti poboljšanju bubrežne funkcije (Muhamed i Mubarak, 2011; Kim i sar., 2012). Uzrokujući inhibiciju leukocitarne NADPH oksidaze, apokinin poboljšava bubrežnu funkciju, pre svega smanjenjem nivoa oksidativnog stresa. Pored toga, apokinin sprečava preteranu potrošnju ATP – a tokom ishemije, koja posledično dovodi do hipoksijskog oštećenja ćelije, apoptoze ili nekroze (Muhamed i Mubarak, 2011). Takođe, apokinin pokazuje i antiinflamatorna svojstva, te dovodi do smanjenja leukocitarne infiltracije i stvaranja proinflamatornih citokina, kao što su TNF- α , Il-1 β i Il-6 (Kim i sar., 2012). Altintas i sar. su pokazali protektivne efekte apokinina na bubrežnu funkciju nakon ishemijsko/reperfuzijskog ABO kod normotenzivnih *Wistar* albino pacova (Altintas i sar., 2013), a sličan efekat pronađen je i u drugim eksperimentalnim modelima, praćenim poremećajem bubrežne funkcije, kao što je gentamicinom uzrokovana nefropatija (Abdelrahman, 2018). Slično, i u

grupama sa tretmanom hiperbaričnom oksigenacijom, pronađeni su povoljni efekti na parametre bubrežne funkcije. Pored antioksidativnog efekta, tretman hiperbaričnom oksigenacijom bi mogao da deluje i antiinflamatorno, te da dvojako smanjuje stepen bubrežnog oštećenja. Brojne studije sugerišu da hiperbarična oksigenacija ima antiinflamatorno dejstvo, te da smanjuje infiltraciju neutrofilnih granulocita inhibicijom njihove adhezije za endotelne ćelije (Thom i sar., 1997; Kalns i sar., 2002; Buras i sar., 2000). Rezultati dobijeni u ovoj studiji saglasni su sa rezultatima He i sar. koji su koristili istovetan protokol pretretmana hiperbaričnom oksigenacijom u eksperimentalnom modelu postishemijskog ABO na normotenzivnim *Sprague-Dawley* pacovima (He i sar., 2011).

U proceni bubrežne funkcije, uobičajeno korišćeni parametri su klirensi kreatinina i uree, kao i njihove koncentracije u plazmi (Buonafine i sar., 2018). Međutim, brojne studije opisuju nove, rane markere ABO, kao što su KIM – 1 i NGAL, čije oslobađanje nastupa ubrzo nakon oštećenja tubula (Krzeminska i sar., 2016; Gagneux-Brunon i sar., 2012; Vaidya i sar., 2008).

Od svog otkrića KIM – 1 je korišćen kao specifičan i selektivan biomarker bubrežnog oštećenja kako u eksperimentalnim animalnim modelima, tako i u kliničkim istraživanjima. Selektivna ekspresija ovog biomarkera na oštećenim proksimalnim tubulskim ćelijama predstavlja siguran podsticaj za njegovu upotrebu, upravo iz razloga što njegovi nivoi strogo koreliraju sa ekspresijom u bubrežnom tkivu (Vaidya i sar., 2006). Vrednosti KIM – 1 mogu biti određivane kako u urinu, tako i u plazmi, jer bubrežno oštećenje rezultira najpre otpuštanjem KIM – 1 u intersticijum, usled gubitka tubulske epitelne ćelijske membrane i/ili tesnih spojeva između vitalnih ćelija što dovodi do povratne redifuzije tubulskog sadržaja, a samim tim i ovog biomarkera nazad u cirkulaciju (Sabbisetti i sar., 2014; Vaidya i sar., 2006). U našoj studiji postishemijsko ABO dovelo je do značajnog porasta plazmatskih koncentracija KIM – 1 u poređenju sa grupom lažno operisanih životinja, dok je tretman hiperbaričnom oksigenacijom, samostalno ili sinergistički sa apokinom, znatno smanjivao nivoe ovog biomarkera. U grupi tretiranoj isključivo apokinom, vrednosti KIM – 1 bile su manje, ali bez statističke značajnosti.

Imunohistohemijskom analizom ekspresije NGAL u bubrežnom tkivu, pokazali smo povećanu ekspresiju u proksimalnim tubulima životinja nakon izazivanja ABO. Takođe, u grupama tretiranim hiperbaričnom oksigenacijom i apokinom, tubulska ekspresija ovog biomarkera bila je znatno manja, što ukazuje na blagotvorni efektat ovih tretmana na tok postishemijskog ABO. Mada precizna funkcija NGAL još uvek nije u potpunosti razjašnjena, sve je više dokaza koji ukazuju na mnogobrojne druge uloge pored dobro ustanovljene uloge biomarkera bubrežnog oštećenja (Buonafine i sar., 2018). Postoje indicije da NGAL povećava ekspresiju endogenih antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza i HO - 1 (Roudkenar i sar., 2011; Bahmani i sar., 2010). Takođe studije ukazuju i na hemotoksičnu ulogu ovog biomarkera, kao i ulogu faktora rasta u procesima diferencijacije i proliferacije ćelije (Buonafine i sar., 2018). U ishemijsko/reperfuzijskom

ABO, NGAL pokazuje protektivna svojstva (Mishra i sar., 2004; Mori i sar., 2005), pre svega u vezivanju i neutralizaciji gvožđa, koje se osloboda u velikim količinama tokom bubrežne ishemije i koje je sposobno da izaziva oksidativni stres i dalje produbljuje bubrežno oštećenje (Goetz i sar., 2002; Bao i sar., 2010; Choi i sar., 2017; Sponsel i sar., 1996).

HO - 1 je enzim sa dobro utvrđenim citoprotektivnim efektima. Isti stimuli indukuju ekspresiju i NGAL i HO-1. Roudkenar i sar. su pokazali da iako NGAL može direktno da utiče na ekspresiju HO - 1, on vrši svoju citoprotektivnu ulogu nezavisno od HO - 1 i čak efikasnije štiti ćelije od oksidativnog stresa (Roudkenar i sar., 2001).

U fiziološkim uslovima, HO - 1 se ne ekspresira u tkivu bubrega, osim u tubulima, gde je nivo ekspresije nizak (Morimoto i sar., 2001). U našoj studiji, kod lažno operisanih pacova, pronađena je difuzna, ali slaba do umerena ekspresija na apikalnoj površini proksimalnih tubulskih ćelija, što se može objasniti činjenicom da su korišćeni spontano hipertenzivni pacovi, te da je sama hipertenzija stanje koje je praćeno povećanim nivoima oksidativnog stresa (Paravicini i sar., 2008). Bubrežna ekspresija HO - 1 regulisana je različitim etiološkim faktorima, a do povećane ekspresije dolazi usled dejstva brojnih stresogenih činilaca, uključujući oksidativni stres, hipoksiju, toksine, teške metale i dr (Morimoto i sar., 2001). U ABO grupi, ekspresija je bila takođe difuzna, ali umerenog do jakog intenziteta u citoplazmi proksimalnih tubulskih epitelnih ćelija, što je u skladu sa činjenicom da je postishemijsko ABO praćeno hipoksijom i oksidativnim stresom (Tanaka i sar., 2014; Ruiz i sar., 2013). Ćelije proksimalnih tubula pokazuju najveći kapacitet za pojačanu ekspresiju HO - 1 u bubrezima (Grundwald i sar., 2021). Istovremeno, pokazalo se da su proksimalne tubulske ćelije posebno osetljive na oksidativni stres u *in vitro* uslovima (Morimoto i sar., 2001). Naši rezultati su u saglasnosti sa studijama koje ukazuju da u glomerulima ne dolazi do ekspresije HO - 1 (Otterbein i sar., 2003). U ishemijsko/reperfuzijskom ABO povećana ekspresija HO - 1 ima protektivne efekte na bubrežno tkivo, posredovane različitim mehanizmima. Pre svega, HO - 1 katalizuje razgradnju hema na bilirubin, ugljen monoksid i gvožđe (Abraham i Kappas, 2008). Hem je funkcionalna komponenta nekoliko različitih unutarćelijskih i vanćelijskih proteina, koji učestvuju u ćelijskom metabolizmu (Bolisetty i sar., 2017), ali sa porastom koncentracije, hem je snažan prooksidans i štetan stimulus koji pojačava tkivno oksidativno oštećenje. U isto vreme, hem je snažan induktor HO - 1 (Otterbein i sar., 2017), koja pokazuje antioksidativnu i citoprotektivnu ulogu u ćeliji (Abraham i Kappas, 2008). Tokom ishemijske povrede, proteini koji sadrže hem, a koji su prisutni u ćelijama, se destabilizuju, što dovodi do značajnog povećanja slobodnog hema (Bolisetty i sar., 2017), i posledične indukcije HO - 1. Kako je hem lipofilan, on lako prolazi kroz membranu ćelija i organela i uzrokuje peroksidaciju lipida i oksidativni stres. Sa druge strane, ugljen monoksid i žučni pigmenti smanjuju stepen oksidativnog stresa inhibicijom NADPH oksidaze (Bolisetty i sar., 2017; Lanone i sar., 2005; Matsumoto i sar., 2006). Ugljen

monoksid takođe pospešuje aktivnost antioksidativne zaštite, a gvožđe nastalo kao produkt razgradnje hema biva vezano od strane feritina i onemogućeno za stvaranje novih RKV (Bolisetty i sar., 2017). U tretiranim grupama pokazana je difuzna ekspresija HO – 1 u proksimalnim tubulima bubrega, smanjenog intenziteta u citoplazmi i slabog do umerenog intenziteta na apikalnoj površini proksimalnih tubulskih ćelija, što je slično obrascu ekspresije koji je prethodno uočen u grupi lažno operisanih pacova. Kako je u tretiranim grupama došlo do smanjene ekspresije 4 – HNE i NGAL, možemo pretpostaviti da usled manjeg nivoa tkivnog oštećenja, odnosno smanjenog oksidativnog stresa, dolazi i do manje indukcije HO – 1. Ipak, u studiji u kojoj je ispitivan uticaj istovetnog pretretmana hiperbaričnom oksigenacijom na postishemijsko ABO i kvantitativno merena aktivnost HO – 1 u bubrežnom tkivu kod normotenzivnih pacova, pokazan je značajan porast aktivnosti ovog enzima (He i sar., 2011). Takođe, postoje dokazi da apokinin može da indukuje ekspresiju HO – 1 u bubrežnom tkivu (Bhatt i sar., 2017).

Uzimajući u obzir parametre lipidnog profila koji su određivani u ovoj studiji, vrednosti ukupnog holesterola i LDL holesterola bile su značajno veće nakon izazivanja ABO. Studije ukazuju da je ABO praćen poremećajima metabolizma lipida (Gupta i sar., 1994), a naši rezultati su suglasni sa ranijim studijama rađenim na istovetnom eksperimentalnom modelu, gde je nakon izazivanja ABO dolazilo do povećanja vrednosti LDL holesterola (Ivanov i sar., 2014). Nakon tretmana hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom, samostalno ili udruženo, dolazilo je do porasta vrednosti HDL holesterola. Poznato je da povećane serumske vrednosti HDL holesterola imaju antiinflamatorna i antioksidativna svojstva, te da deluju kardioprotektivno i poboljšavaju funkciju endotela, dok sa druge strane niske vrednosti HDL holesterola predstavljaju nezavisni faktor rizika za razvoj ABO (Zhou i sar., 2020). Takođe, studije su pokazale da osobe koje imaju veće vrednosti HDL holesterola, čak i kada razviju ABO, pokazuju blaži oblik bubrežnog oštećenja (Smith i sar., 2017). Iako trenutno nisu izučeni precizni mehanizmi, i druge studije ukazuju da je tretman hiperbaričnom oksigenacijom (Kahraman i Yaman, 2021), odnosno apokininom (Wang i sar., 2019) sposoban da poveća vrednosti HDL holesterola. Za razliku od navedenih parametara lipidnog profila, u vrednostima triglicerida nisu uočene statistički značajne razlike između grupa.

Histološka analiza predstavlja najbolji metod za utvrđivanje morfoloških promena bubrežnog tkiva. ABO je praćeno različitim morfološkim promenama u bubrežima, koje uključuju: gubitak četkastog pokrova proksimalnih tubulskih ćelija, njihovu deskvamaciju, fokalnu dilataciju tubula, prisustvo PAS pozitivnih cilindara u lumenu tubula, kao i područja nekroze tubulskih ćelija (Ivanov i sar., 2014), što je uočeno i u ovoj studiji u uzorcima bubrega pacova sa ishemijsko/reperfuzijskim ABO. Naši rezultati jasno ukazuju da tretman apokininom smanjuje stepen morfološkog oštećenja bubrežnog tkiva, pa se može govoriti o njegovom potencijalno protektivnom dejstvu u postishemijskom ABO. U bubrežima pacova tretiranih apokininom uočen je

manji stepen oštećenja tubulskih epitelnih ćelija, kao i manji stepen dilatacije tubula i prisustva PAS pozitivnih cilindara u njihovom lumenu. Naši rezultati ne odstupaju od rezultata *Altintas* i sar. koji su u takođe pokazali protektivne efekte apokinina u postishemijskom ABO na bubrege *Wistar* normotenzivnih pacova (*Altintas* i sar., 2013). Slično poboljšanje uočeno je i u grupama tretiranim hiperbaričnom oksigenacijom, kao i kombinovanim tretmanom. Brojne studije ukazuju na značajan protektivni efekat hiperbarične oksigenacije u ishemijsko/reperfuzijskom ABO (*Rubinstein* i sar., 2009; *He* i sar., 2011), sa značajnim poboljšanjem bubrežne morfologije nakon tretmana (*Rubinstein* i sar., 2009). Ovakav histološki nalaz, govori u prilog blagotvornom dejstvu preventivnog tretmana hiperbaričnom oksigenacijom, kao i apokininom, bilo da su oni primenjeni samostalno, ili udruženo, a u koheziji je sa prethodno opisanim rezultatima dobijenim u ovom istraživanju.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Preventivni tretman kiseonikom u hiperbaričnim uslovima, pojedinačno i sinergistički sa apokininom, izaziva statistički značajno smanjenje reaktivnih jedinjenja tiobarbiturne kiseline u plazmi, što ukazuje da navedeni tretmani uspešno smanjuju povećane nivoe lipidne peroksidacije u postishemijskom akutnom bubrežnom oštećenju.
2. Smanjenje lipidne peroksidacije u plazmi, praćeno je povećanom aktivnošću enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima, i to katalaze nakon sinergističke primene hiperbarične oksigenacije i apokinina, kao i glutation reduktaze nakon tretmana hiperbaričnom oksigenacijom u odnosu na eksperimentalnu grupu sa postishemijskim akutnim bubrežnim oštećenjem.
3. Imunohistohemijskom analizom pokazana je ekspresija 4 - hidroksinonenala u glomerulima i intersticijumu bubrega, što ukazuje da se 4 - hidroksinonenal može koristiti kao marker oksidativnog stresa u eksperimentalnom modelu postishemijskog bubrežnog oštećenja. S druge strane, primenjeni tretmani, pojedinačno i udruženo, značajno smanjuju ekspresiju 4 - hidroksinonenala i u glomerulima i u intersticijumu bubrega pacova koji su pretrpeli ABO.
4. Tretman apokininom dovodi do statistički značajnog poboljšanja protoka krvi kroz bubrežnu arteriju, koji je praćen statistički značajnim smanjenjem odgovarajućeg vaskularnog otpora, u odnosu na vrednosti tih parametara kod životinja kojima je izazvano postishemijsko akutno bubrežno oštećenje. Takođe, primena hiperbarične oksigenacije, samostalno i u kombinaciji sa apokininom, statistički značajno poboljšava bubrežne hemodinamske parametre u pravcu povećanja protoka krvi i smanjenja vaskularnog otpora renalne arterije.
5. Postishemijsko akutno bubrežno oštećenje izazvano kod spontano hipertenzivnih pacova dovodi do statistički značajnog smanjenja vrednosti srednjeg arterijskog pritiska i srčane frekvencije. Tretman hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom, pojedinačno ili u kombinaciji ne utiče na navedene parametre, dok sa druge strane dovodi do statistički značajnog smanjenja ukupnog perifernog otpora.
6. Tretman hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom, pojedinačno i sinergistički dovodi do poboljšanja bubrežne funkcije. Tretmani statistički značajno smanjuju plazmatske koncentracije kreatinina, uree i fosfata, što je ujedno praćeno značajnim povećanjem klirensa navedenih supstanci u odnosu na grupu kojoj je izazvan eksperimentalni model.
7. Postishemijsko akutno bubrežno oštećenje izaziva značajno povećanje vrednosti ranog markera proteina bubrežnog oštećenja - 1 u plazmi, a primena hiperbarične oksigenacije samostalno i sinergistički sa apokininom značajno smanjuje te vrednosti, što ukazuje na manji stepen oštećenja bubrežnog tkiva.

8. Takođe, primenjeni tretmani, pojedinačno i u kombinaciji, značajno smanjuju i tkivnu ekspresiju ranog markera bubrežnog oštećenja, lipokalina povezanog sa neutrofilnom želatinazom, u odnosu na ekspresiju pokazanu u kontrolnoj grupi životinja sa ABO.
9. Izmenjena tkivna ekspresija citoprotektivnog enzima hem oksigenaze - 1 u postishemijskom akutnom bubrežnom oštećenju, nakon primenjenih tretmana je ispoljavala imunohistohemijski obrazac sličan onome koji je uočen kod lažno operisanih pacova.
10. Povećanje ukupnog holesterola i LDL holesterola izazvano postishemijskim akutnim bubrežnim oštećenjem udruženo je sa statistički značajnim povećanjem HDL holesterola u svim tretiranim grupama.
11. Histopatološki skor, kao pokazatelj stepena strukturnog oštećenja tkiva, značajno je manji kod svih tretiranih grupa. Ovo ukazuje da su strukturne promene, nastale usled oštećenja tkiva ishemijsko/reperfuzijskom povredom, značajno manje kod životinja preventivno tretiranih kiseonikom u hiperbaričnim uslovima, kao i kod životinja koje su sa ili bez tretmana u hiperbaričnoj komori tretirane apokininom.
12. Na osnovu prikazanih rezultata ove studije, može se reći da preventivni tretman hiperbaričnom oksigenacijom i apokininom, primenjen pojedinačno ili u kombinaciji, značajno poboljšava bubrežnu funkciju i strukturu nakon izazvanog ekperimentalnog postishemijskog akutnog bubrežnog oštećenja kod spontano hipertenzivnih pacova. Uzimajući u obzir složenost patogeneze akutnog bubrežnog oštećenja i porast prevalencije hipertenzije širom sveta, ovo istraživanje pruža ohrabrujuće podatke i predstavlja osnovu za planiranje budućih kliničkih studija koje bi imale za cilj ispitivanje dejstva ovih tretmana i u humanoj populaciji i njihovu potencijalnu primenu.

7. LITERATURA

Abdelrahman RS. Protective effect of apocynin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2018;37(1):27–37.

Abraham N, Kappas, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*. 2008;60(1):79-127.

Alge JL, Arthur JM. Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(1):147-55.

Altintas R, Polat A, Vardi N, Oguz F, Beytur A, Sagir M, et al. The protective effects of apocynin on kidney damage caused by renal ischemia/reperfusion. *J Endourol*. 2013;27(5):617–624.

Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1997;43(4):562-568.

Bahmani P, Halabian R, Rouhbakhsh M, Roushandeh AM, Masroori N, Ebrahimi M, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin induces the expression of heme oxygenase-1 and superoxide dismutase 1, 2. *Cell Stress Chaperones*. 2010;15(4):395–403.

Bao G, Clifton M, Hoette TM, Mori K, Deng SX, Qiu A, et al. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat Chem Biol*. 2010;6:602–609.

Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol*. 2012;2(2):1303-1353.

Basta - Jovanović G, Marković - Lipkoviski J. Bubrezi i donji mokraćni putevi. U: Atanacković M, Bacetić D, Basta - Jovanović G, Begić - Janeva A, Boričić I, Brašanac D, et al. *Patologija*. 1. izdanje. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta; 2008. str. 559-599.

Baumer AT, Kruger CA, Falkenberg J, Freyhaus HT, Rosen R, Fink K, et al. The NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin improves endothelial NO/superoxide balance and lowers effectively blood pressure in spontaneously hypertensive rats: comparison to calcium channel blockade. *Clin Exp Hypertens*. 2007;29(5):297–299.

Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM, El-Benna J. NADPH oxidase activation in neutrophils: role of the phosphorylation of its subunits. *Eur J Clin Invest*. 2018;48 Suppl 2:e12951.

Beutler E, editor. *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. 1st ed. New York: Grune and Stratton; 1982.

Bhaskaran M, Reddy K, Radhakrishanan N, Franki N, Ding G, Singhal PC. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284(5):F955-65.

Bhatt NP, Park J, Lee HJ, Kim S, Kwon Y, Chun W. Apocynin protects mesangial cells from lipopolysaccharide-induced inflammation by exerting heme oxygenase 1-mediated monocyte chemoattractant protein-1 suppression. *Int J Mol Med.* 2017;40:1294-1301.

Bojic S, Simić - Ogrizović S, Stojanović M, Petrov - Bojičić I, Palibrk I, Janković R. Novi biomarkeri akutnog oštećenja bubrega kod kritično obolelih. *Serbian Journal of Anesthesia and Intensive Therapy.* 2013;35(1-2):91-95.

Bolisetty S, Zarjou A, Agarwal A. Heme oxygenase 1 as a therapeutic target in acute kidney injury. *Am J Kidney Dis.* 2017;69:531–545.

Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(11):3265-3268.

Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011;121(11):4210-4221.

Bowmer CJ, Nichols AJ, Warren M, Yates MS. Cardiovascular responses in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Br J Pharmacol.* 1983;79(2):471–476.

Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am J Physiol Cell Physiol* 2016;311(4):C537-C543.

Brkic P, Mitrovic A, Rakic M, Grajic M, Jovanovic T. Hyperbaric oxygen therapy of angiopathic changes in patients with inherited gene imbalance. *Srp Arh Celok Lek* 2007;135(11-12):669-671.

Buonafine M, Martinez-Martinez E, Jaisser F. More than a simple biomarker: the role of NGAL in cardiovascular and renal diseases. *Clin Sci (Lond).* 2018;132:909–923.

Buras JA, Stahl GL, Svoboda KK, Reenstra WR. Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(2):C292-302.

Bywaters EG, Beall D. Crush injuries with impairment of renal function. *Br Med J* 1941;1:427-432.

Calvert JW, Cahill J, Zhang JH. Hyperbaric oxygen and cerebral physiology. *Neurol Res* 2007;29(2):132-141.

Cartin-Ceba R, Kashiouris M, Plataki M, Kor DJ, Gajic O, Casey ET. Risk factors for development of acute kidney injury in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Crit Care Res Pract* 2012; 2012:691013.

Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, et al. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 2002;39(2):269-274.

Chen MF, Chen HM, Ueng SW, Shyr MH. Hyperbaric oxygen pretreatment attenuates hepatic reperfusion injury. *Liver* 1998;18(2):110-116.

Choi EK, Jung H, Kwak KH, Yi SJ, Lim JA., Park SH, et al. Inhibition of oxidative stress in renal ischemia-reperfusion injury. *Anesth Analg.* 2017;124:204–213,

Choi HM, Kim SC, Kim MG, Jo SK, Cho WY, Kim HK. Etiology and outcomes of anuria in acute kidney injury: a single center study. *Kidney research and clinical practice* 2015;34(1):13-19.

Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int.* 2008;73:1008–1016.

Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009;53(6):961-973.

Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C, et al. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. *Cell Metab.* 2016;23(2):254-263.

Davies FC, Weldon RP. A contribution to the study of “war nephritis”. *Lancet* 1917;190:118-120.

De Luka S, Lopičić S, Pešić BČ. Čelijske promene i poremećaji. U: Pešić BČ, urednik. *Patofiziologija: mehanizmi poremećaja zdravlja – prvi deo.* 1. izdanje. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta, CIBID; 2015. str. 79-100.

Drabkin D, Austin H. Spectrophotometric studies preparations from washed blood cells. *J Biol Chem* 1935;112:51-65.

Drenjančević I, editor. *Hyperbaric oxygen treatment in research and clinical practice, mechanisms of action in focus.* Rijeka: InTech; 2018.

Drenjancevic I, Kibel A, Kibel D, Seric V, Cosic A. Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats exposed to acute hyperbaric oxygenation. *Undersea Hyperb Med* 2013;40(4):319-328.

Dong H, Xiong L, Zhu Z, Chen S, Hou L, Sakabe T. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induces tolerance against spinal cord ischemia in rabbits. *Anesthesiology* 2002;96:907–912.

Dylewska M, Chomicka I, Malyszko J. Hypertension in patients with acute kidney injury. *Wiad Lek.* 2019;72(11 cz 2):2199-2201.

Eknoyan G, Agodoa L. On improving outcomes and quality of dialysis care, and more. *Am J Kidney Dis* 2002;39:889-891.

Fortuno A, Oliván S, Belouqui O, San Hoze G, Moreno MU, Díez J, et al. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens* 2004;22:2169-2175.

Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004;66(2):486-491.

Funes SC, Ríos M, Fernández-Fierro A, Covian C, Bueno SM, Riedel CA, et al. Naturally Derived Heme-Oxygenase 1 Inducers and Their Therapeutic Application to Immune-Mediated Diseases. *Front Immunol* 2020;11:1467.

Gagneux-Brunon A, Delanaye P, Legrand D, Cavalier E, Mariat C. NGAL, biomarqueur de lésion rénale: point d'étape en 2012. *Néphrol Thér.* 2012;8(7):508–515.

Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, urednici. *Patofiziologija*. 8. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.

Grundwald A, Roumenina LT, Frimat M. Heme oxygenase 1: A defensive mediator in kidney diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):2009.

Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell.* 2002;10:1033–1043.

Gupta KL, Majumdar S, Sakhuja V. Postheparin lipolytic activity in acute and chronic renal failure. *Ren Fail.* 1994;16(5):609-615.

Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62(1):237–244.

Hattori Y, Akimoto K, Gross SS, Hattori S, Kasai K. Angiotensin-II-induced oxidative stress elicits hypoadiponectinaemia in rats. *Diabetologia.* 2005;48(6):1066-1074.

He X, Xu X, Fan M, Chen X, Sun X, Luo G, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen induces tolerance against renal ischemia-reperfusion injury via increased expression of heme oxygenase-1. *J Surg Res.* 2011;170(2):e271–277.

Hentia C, Rizzato A, Camporesi E, Yang Z, Muntean DM, Săndesc D, et al. An overview of protective strategies against ischemia/reperfusion injury: The role of hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain Behav.* 2018;8(5):e00959.

Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schröder K, et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)* 2008;51(2):211-217.

Hougee S, Hartog A, Sanders A, Graus YMF, Hoijer JG, Grassen J, et al. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 2006;531(1-3):264-269.

Hua P, Feng W, Rezonzew G, Chumley P, Jaimes EA. The transcription factor ETS-1 regulates angiotensin II-stimulated fibronectin production in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(11):F1418-429.

Hung CC, Yang SA. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286:552–563.

Huo W, Zhang K, Nie Z, Li Q, Jin F. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury. *Transplant Rev (Orlando)*. 2010;24(3):143-146.

Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1657–1668.

Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001; 38:581-587.

Ivanov M, Mihailovic-Stanojevic N, Grujic Milanovic J, Jovovic D, Markovic-Lipkovski J, Cirovic S, et al. Losartan improved antioxidant defense, renal function and structure of postischemic hypertensive kidney. *PloS one* 2014;9(5):e96353.

Jameson JL, Kasper DL, Longo DL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 20th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2020.

Jost G, Pietsch H, Sommer J, Sandner P, Lengsfeld P, Seidensticker P, et al. Retention of iodine and expression of biomarkers for renal damage in the kidney after application of iodinated contrast media in rats. *Invest Radiol*. 2009;44:114–123.

Kahraman C, Yaman H. Hyperbaric oxygen therapy affects insulin sensitivity/resistance by increasing adiponectin, resistin, and plasminogen activator inhibitor-I in rats. *Turk J Med Sci*. 2021;51(3):1572-1578.

Kalns J, Lane J, Delgado A, Scruggs J, Ayala E, Gutierrez E, et al. Hyperbaric oxygen exposure temporarily reduces Mac-1 mediated functions of human neutrophils. *Immunol Lett*. 2002;83(2):125-131.

Kanagasundaram NS. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Ann Clin Biochem*. 2015;52(Pt 2):193-205.

Kellum JA, Levin N, Bouman C, Lameire N. Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:509-514.

Kelly KJ, Williams WW, Colvin JRB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest.* 1996;97(4):1056–1063.

Kim CH, Choi H, Chun YS, Kim GT, Park JW, Kim MS. Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium. *Pflugers Arch* 2001;442(4):519-525.

Kim SY, Moon KA, Jo HY, Jeong S, Seon SH, Jung E, et al. Anti-inflammatory effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in airway inflammation. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(4):441–448.

Kinsey GR, Okusa MD. Role of leukocytes in the pathogenesis of acute kidney injury. *Crit Care.* 2012;16(2):214.

Krzeminska E, Wyczalkowska-Tomasik A, Korytowska N, Paczek L. Comparison of two methods for determination of NGAL levels in urine: ELISA and CMIA. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(6): 956–960.

Klemetti E, Rico-Vargas S, Mojon P. Short duration hyperbaric oxygen treatment effects blood flow in rats: pilot observations. *Lab Anim.* 2005; 39(1):116–121.

Labrousche S, Javorschi S, Leroy D, Gbikpi-Benissan G, Freyburger G. Influence of hyperbaric oxygen on leukocyte functions and haemostasis in normal volunteer divers. *Thromb Res* 1999;96(4):309-315.

Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet* 2005; 365:417–430.

Lanone S, Bloc S, Foresti R, Almolki A, Taille C, Callebort J, et al. Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. *FASEB J.* 2005;19(13):1890-1892.

Lapperre TS, Jimenez LA, Antonicelli F, Drost EM, Hiemstra PS, Stolk J, et al. Apocynin increases glutathione synthesis and activates AP-1 in alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 1999;443(2):235-239.

Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S241-245.

Li J, Liu W, Ding S, Xu W, Guan Y, Zhang JH, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats. *Brain Res* 2008;1210:223-229.

Li L, Huang L, Sung SS, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol.* 2007;178(9):5899–5911.

Li Z, Wang Y. Effect of NADPH oxidase inhibitor-apocynin on the expression of Src homology-2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) exposed renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Toxicol Rep* 2015;2:1111-1116.

Luchtefeld R, Luo R, Stine K, Alt ML, Chernovitz PA, Smith RE. Dose formulation and analysis of diapocynin. *J Agric Food Chem* 2008; 56(2):301–306.

Lodha S, Dani D, Mehta R, Bhaskaran M, Reddy K, Ding G, et al. Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol Med*. 2002;8(12):830-40.

Makris K, Spanou L. Acute kidney injury: definition, pathophysiology and clinical phenotypes. *Clin Biochem Rev*. 2017;37(2):85–98.

Mathieu D, Marroni A, Kot J. Tenth European consensus conference on hyperbaric medicine: Recommendations for accepted and non-accepted clinical indications and practice of hyperbaric oxygen treatment. *Diving Hyperb Med* 2017;47(1):24-32.

Matsumoto H, Itabe H, Maruyama Y. Carbon monoxide and bilirubin from heme oxygenase-1 suppresses reactive oxygen species generation and plasminogen activator inhibitor-1 induction. *Mol Cell Biochem*. 2006;291:21-28.

Mihaljevic Z, Matic A, Stupin A, Rasic L, Jukic I, Drenjancevic I. Acute hyperbaric oxygenation, contrary to intermittent hyperbaric oxygenation, adversely affects vasorelaxation in healthy Sprague-Dawley rats due to increased oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:7406027.

Miloradovic Z, Ivanov M, Mihailovic-Stanojevic N, Grujic Milanovic J, Jovovic D, Vajic UJ, et al. Acute superoxide radical scavenging reduces blood pressure but does not influence kidney function in hypertensive rats with postischemic kidney injury. *BioMed Res Int* 2014;2014:512619.

Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2534–2543.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247(5):3170-3175.

Mohamed NS, Mubarak HA. Effects of renal ischemia reperfusion on brain, liver & kidney tissues in adult male rats. *Life Sciences*. 2011;8:204–212.

Moreno S, Mugnaini E, Ceru MP. Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. *J Histochem Cytochem* 1995;43(12):1253-1267.

Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, et al. Endo-cytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005; 115:610–621.

Morimoto K, Ohta K, Yachie A, Yang Y, Shimizu M, Goto C, et al. Cytoprotective Role of Heme Oxygenase (HO)-1 in Human Kidney with Various Renal Diseases. *Kidney Int.* 2001;60:1858–1866.

Nešović Ostojić J. Bubrežno oštećenje (insuficijencija). U: Nešović Ostojić J, Radosavljević TS, Pešić BČ, urednici. *Patofiziologija: mehanizmi poremećaja zdravlja – drugi deo.* 1. izdanje. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta, CIBID; 2020. str. 417-434.

Nie H, Xiong L, Lao N, Chen S, Xu N, Zhu Z. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;52:973–982.

Nie S, Tang L, Zhang W, Feng Z, Chen X. Are there modifiable risk factors to improve AKI? *BioMed Res Int.* 2017; 2017:5605634.

Nijboer WN, Schuurs TA, Damman J, van Goor H, Vaidya VS, van der Heide JJ, et al. Kidney injury molecule-1 is an early noninvasive indicator for donor brain death-induced injury prior to kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2009;9:1752–1759.

Nissenson AR. Acute renal failure: definition and pathogenesis. *Kidney Int Suppl* 1998; 66: S7-10.

Nistala R, Whaley-Connell A, Sowers JR. Redox control of renal function and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(12):2047-2089.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.

Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* 2003;24:449–455.

Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F608–F627.

Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol* 2015;12(1):5-23.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care* 2008;31 Suppl 2:S170-180.

Park YM, Park MY, Suh YL, Park JB. NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(3):812–817.

Pavlakou P, Liakopoulos V, Eleftheriadis T, Mitsis M, Dounousi E. Oxidative stress and acute kidney injury in critical illness: pathophysiologic mechanisms-biomarkers-interventions, and future perspectives. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:6193694.

Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Schoenlein P, Dong Z. Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297:F244–F256.

Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem*. 1992;38(10):1933-1953.

Pesce F, Stea ED, Rossini M, Fiorentino M, Piancone F, Infante B. Glomerulonephritis in AKI: from pathogenesis to therapeutic intervention. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:582272.

Petras T, Siems W, Henke W, Jung K, Olbricht CJ, Gwinner W, et al. Metabolic rates of 4-hydroxynonenal in tubular and mesangial cells of the kidney. *Exp Nephrol* 1999; 7:59-62.

Piecznik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol* 2007;83(1):84-92.

Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant mechanisms in renal injury and disease. *Antioxid Redox Signal* 2016;25(3):119-146.

Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 2003;41:1096-1101.

Riganti C, Costamagna C, Bosia A, Ghigo D. The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 212(3):179–187.

Riganti C, Costamagna C, Doublier S, Miraglia E, Polimeni M, Bosia A, et al. The NADPH oxidase inhibitor apocynin induces nitric oxide synthesis via oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;228(3) 277–285.

Rizvi MS, Kashani KB. Biomarkers for early detection of acute kidney injury. *JALM*. 2017;2(3)386–399.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association, *Circulation*. 2012;125(22):e1002.

Roudkenar M, Halabian R, Bahmani P, Roushandeh A, Kuwahara Y, Fukumoto M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a new antioxidant that exerts its cytoprotective effect independent on heme oxygenase-1. *Free Radic Res*. 2011;(45):810–819.

Rubinger D, Wald H, Gimelreich D, Halaihel N, Rogers T, Levi M, et al. Regulation of the renal sodium-dependent phosphawete cotransporter NaPi2 (Npt2) in acute renal failure due to ischemia and reperfusion. *Nephron Physiol*. 2005;100(1):1–12.

Rubinstein I, Abassi Z, Milman F, Ovcharenko E, Coleman R, Winaver J, et al. Hyperbaric oxygen treatment improves GFR in rats with ischaemia/reperfusion renal injury: a possible role for the antioxidant/oxidant balance in the ischaemic kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(2):428–36.

- Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, Vaziri ND. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013;83(6):1029–1041.
- Rybka J, Kupczyk D, Kedziora-Kornatowska K, Motyl J, Czuczejko J, Szewczyk-Golec K, et al. Glutathione-related antioxidant defense system in elderly patients treated for hypertension. *Cardiovasc Toxicol* 2011;11(1):1-9.
- Sabbisetti VS, Waikar SS, Antoine DJ, Smiles A, Wang C, Ravisankar A, et al. Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(10):2177–2186.
- Sachse A, Wolf G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(9):2439-2446.
- Sanchez EC. Mechanisms of action of hyperbaric oxygenation in stroke. *Crit Care Nurs Q* 2013;36(3):290–298.
- Savla SR, Laddha A, Kalkarni YA. Pharmacology of apocynin: a natural acetophenone. *Drug Met Rev* 2021;10:1-21. Online ahead of print.
- Schaur R, Siems W, Bresgen N, Ecker PE. 4-Hydroxy-nonenal – A bioactive lipid peroxidation product. *Biomolecules* 2015;5(4):2247-2337.
- Schluter T, Steinbach AC, Steffen A, Rettig R, Grisk O. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. *Cardiovasc Res.* 2008;80(2):271–279.
- Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, Fujita T. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension.* 2007;49(2):355-364.
- Simons JM, Hart BA, Ip Vai Ching TR, Van Dijk H, Labadie RP. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med* 1990;8(3):251-258.
- Simsek A, Tugcu V, Tasci AI. New biomarkers for the quick detection of acute kidney injury. *ISRN Nephrol.* 2013;2013:394582.
- Simplicio JA, do Vale GT, Gonzaga NA, Leite LN, Hipolito UV, Pereira CA, et al. Reactive oxygen species derived from NAD(P)H oxidase play a role on ethanol-induced hypertension and endothelial dysfunction in rat resistance arteries. *J Physiol Biochem* 2017;73(1):5-16.
- Smith G. Therapeutic application of oxygen at two atmospheres pressure. *Chest* 1964;45(1):15–23.
- Smith G, Lawson DD. The protective effect of inhalation of oxygen at 2 atmospheres absolute pressure in acute coronary arterial occlusion. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:411.

Smith G, Lawson DD, Renfrew S, Ledingham IM, Sharp GR. Preservation of cerebral cortical activity by breathing oxygen at two atmospheres of pressure during cerebral ischemia. *Surg Gynec Obstet* 1961;113:13.

Smith LE, Smith DK, Blume JD, Linton MF, Billings FT. High-density lipoprotein cholesterol concentration and acute kidney injury after cardiac surgery. *J Am Heart Assoc.* 2017; 6(12):e006975.

Sponsel HT, Alfrey AC, Hammond WS, Durr JA, Ray C, Anderson RJ. Effect of iron on renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 1996;50:436–444.

Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflamm* 2008;2008:106507.

Stošič Z, Borota R, urednici. *Osnovi kliničke patofiziologije*. 4. izdanje. Novi Sad: Medicinski fakultet; 2020.

Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41(6):1271-1276.

Tadagavadi RK, Reeves BW. Renal dendritic cells ameliorate nephrotoxic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(1):53–63.

Tanaka S, Tanaka T, Nagaku M. Hypoxia as a key player in the AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307(11):F1187–F1195.

Tanriverdi LH, Parlakpınar H, Ozhan O, Ermis N, Polat A, Vardi N, et al. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin promotes myocardial antioxidant response and prevents isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rats. *Free Radic Res* 2017;51(9-10):772-786.

Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol.* 2009;106(3):988-995.

Tian N, Moore RS, Phillips WE, Lin L, Braddy S, Pryor JS, et al. NADPH oxidase contributes to renal damage and dysfunction in Dahl salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295(6):R1858-865.

Tokuda Y, Uozumi T, Kawasaki T. The superoxide dismutase activities of cerebral tissues, assayed by the chemiluminescence method, in the gerbil focal ischemia/reperfusion and global ischemia models. *Neurochem Int* 1993;23(2):107-114.

Tomsa AM, Alexa AL 2, Junie ML, Rachisan AL, Ciumarnean L. Oxidative stress as a potential target in acute kidney injury. *PeerJ.* 2019;7:e8046.

Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:463–493.

Virdis A, Gesi M, Taddei S. Impact of apocynin on vascular disease in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2016;87:1–5.

Wang Y, Tao J, Jiang M, Yao Y. Apocynin ameliorates diabetic retinopathy in rats: Involvement of TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2019;73:49-56.

Weaver LK. Hyperbaric oxygen therapy indications : the Hyperbaric Oxygen Therapy Committee report. 13th ed. North Palm Beach, Florida: Best Publishing Company; 2014.

Welch WJ, Baumgartl H, Lubbers D, Wilcox CS. Nephron pO₂ and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney Int* 2001;59(1):230-237.

Yadav A, Vallabu S, Arora S, Tandon P, Slahan D, Teichberg S, et al. ANG II promotes autophagy in podocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(2):C488-496.

Zhou Y, Yang HY, Zhang HL, Zhu XJ. High-density lipoprotein cholesterol concentration and acute kidney injury after noncardiac surgery. *BMC Nephrol.* 2020;21:149.

Zou AP, Li N, Cowley AW, Jr. Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension.* 2001;37(2 Pt 2):547-553.

Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury. *Annu Rev Med* 2016;67:293–307.

Žunić S. Poremećaji krvnog pritiska. U: Nešović Ostojić J, Radosavljević TS, Pešić BČ, urednici. *Patofiziologija: mehanizmi poremećaja zdravlja – drugi deo.* 1. izdanje. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta, CIBID; 2020. str. 23-38.

Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(5):1404–1407.

SPISAK SKRAĆENICA

4 – HNE	4 - hidroksinonenal
ABI	akutna bubrežna insuficijencija
ABO	akutno bubrežno oštećenje
ATN	akutna tubulska nekroza
ATP	adenozin trifosfat
CAT	katalaza
CO	ugljen monoksid
CO	minutni volumen srca
EDTA	etilen diamin tetra sirćetna kiselina
ELISA	enzimski imuno – vezujući test
eNOS	entotelna azot-monoksid sintaza
GFR	brzina glomerulske filtracije
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
GSH-Px	glutation peroksidaza
GSSG	oksidovani glutacion
HO	hem oksigenaza
HR	srčana frekvenca
KIM – 1	protein bubrežnog oštećenja – 1
MAP	srednji arterijski pritisak
NADP⁺	oksidovana forma NADPH
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NO	azot monoksid
NF-κB	nuklearni faktor kapa B
NGAL	lipokalin povezan sa neutrofilnom želatinazom
PAS	perjodna kiselina - Šif
RAV	reaktivne azotne vrste
RBF	protok krvi kroz renalnu arteriju
RKV	reaktivne kiseonične vrste
RVR	vaskularni otpor protoku krvi kroz renalnu arteriju
SHR	spontano hipertenzivni pacovi
SOD	superoxid dismutaza

TBARS	reaktivna jedinjenja tiobarbiturne kiseline
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan-hlorid
TVPR	ukupni periferni vaskularni otpor
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta

BIOGRAFIJA AUTORA

Sanjin Kovačević, rođen je 03.05.1989. godine u Sarajevu, Bosna i Hercegovina. Integrisane akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je akademske 2008/2009. godine. Diplomirao je u oktobru 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,00. Nakon završenog lekarskog staža položio je državni ispit u maju 2015. godine i stekao zvanje doktora medicine. Akademske 2015/2016. godine upisao je doktorske akademske studije na smeru Fiziološke nauke na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Jelene Nešović Ostojić. Specijalističke akademske studije na modulu Eksperimentalna fiziologija i patološka fiziologija, upisao je akademske 2017/2018. godine, a završni rad odbranio je u septembru 2019. godine (prosek 9,73). Master akademske studije na smeru Fizička aktivnost, zdravlje i terapija vežbanjem upisao je akademske 2016/2017. godine, a završni rad odbranio je takođe u septembru 2019. godine (prosek 9,80). Dr Sanjin Kovačević izabran je u zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Patološka fiziologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu u novembru 2015. godine, a od novembra 2017. godine zaposlen je u zvanju asistenta na Institutu za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Od 2017. godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije „Ispitivanje antihipertenzivnog i renoprotektivnog potencijala supstanci prirodnog i sintetskog porekla u eksperimentalnim modelima kardiovaskularnih i bubrežnih oboljenja“ pri Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Član je Srpskog lekarskog društva, Društva biofizičara Srbije, Udruženja za kardionefrologiju Srbije, Srpskog društva za kliničku laboratorijsku medicinu i nauku, *European Society of Cardiology – WG on Cellular Biology of the Heart*.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Sanjin Kovačević

Broj indeksa FN-04/15

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

DEJSTVO APOKININA I HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA ISHEMIJSKO/REPERFUZIJSKO
AKUTNO BUBREŽNO OŠTEĆENJE KOD SPONTANO HIPERTENZIVNIH PACOVA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 04.03.2022.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sanjin Kovačević

Broj indeksa FN-04/15

Studijski program Doktorske akademske studije, modul Fiziološke nauke

Naslov rada DEJSTVO APOKININA I HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA ISHEMIJSKO/REPERFUZIJSKO AKUTNO BUBREŽNO OŠTEĆENJE KOD SPONTANO HIPERTENZIVNIH PACOVA

Mentor Prof. dr Jelena Nešović Ostojić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, 04.03.2022.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

DEJSTVO APOKININA I HIPERBARIČNE OKSIGENACIJE NA ISHEMIJSKO/REPERFUZIJSKO AKUTNO BUBREŽNO OŠTEĆENJE KOD SPONTANO HIPERTENZIVNIH PACOVA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

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)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis autora

U Beogradu, 04.03.2022.

