

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
CAROL DAVILA
BUCUREȘTI

TEZĂ DE DOCTORAT

CONTRIBUȚII PRIVIND INFLUENȚA UNOR MOLECULE BIOLOGIC
ACTIVE ASUPRA BIOCHIMISMULUI ȚESUTULUI RENAL

REZUMAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,
Prof. univ. dr. Niculina Mitrea

DOCTORAND,
Corneliu Damaschin

București
2008

ABREVIERI

AA – acid arahidonic	MPO - mieloperoxidaza
ABC - ATP-binding cassette transporters	MPT - porii mitocondriali de tranziție a permeabilității
ACE - enzima de conversie a AT	MRP – multidrug resistance protein
ADO - Adenozina	MTX - metotrexat
AE1 - anion exchanger	MXR - Multixenobiotic Resistance
AINS - antiinflamatoare nonsteroidiene	NAG - N-acetyl-β-D-glucosaminidase
Am-B – amfotericina B	NBC1 - sodium-bicarbonate co-transporter
AMG - aminoglicozide	NF-kB - Nuclear factor-kappa B
ANF - 4 amino-1.8-naftalimid	NF-AT - nuclear factor of activated T cells
ASAT - aspartat aminotransferaza	NHE - sodium - hydrogen exchanger
AT - angiotensina	NKCC2 - natrium, kalium, chloride channel-2
ATP - adenosine triphosphate	NO – oxid nitric
BSEP -Bile Salt Export Proteins	NOS – nitric oxid sintaza
cdk - kinaza dependente de ciclina	NTCP - Na ⁺ -taurocholate-cotransporting peptide
COX-2 - Cyclooxygenase 2	OAT - organic anion transporter
CPDG2 - carboxipeptidaza - G2	OCT - organic cation transporter
CREB - cAMP-regulatory element binding protein	P-gp – glicoproteina P
CsA – ciclosporina A	PARP - poly ADP-ribose polymerase
CYP - Cytochrome P	PCLN-1 - paracellin-1
DHFR dihidrofolat-reductazei	PGE – prostaglandina E
EPO - eritropoietina	PI – iodura de propidiu
EDCF - factorul contractil derivat din endoteliu	PKC – protein kinaza C
Fas - Apoptosis Stimulating Fragment	PKD1 - polycystic kidney disease
FGF – fibroblast growth factor	Rfc – reduced folate carrier
FITC - fluoroisothiocyanat	RFG – rata filtrării glomerulare
β-Gal - β-Galactozidaza	ROS - Reactive oxygen species
GSH - Glutation redus	SCE - sister chromatid exchanges
GSSG – Glutation oxidat	SOD - Superoxide Dismutase
HSP – heat shock protein	SRA – sistem renina angiotensina
IGF - insulin – like growth factor	TNF - tumor necrosis factor
IL-2 – interleukin - 2	TGF – transforming growth factor
IR - insuficiență renală	TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling
L-Arg - L-arginina	TxA2 - tromboxan A2
LDL – low density lipoprotein	VEGF -vascular endothelial growth factor
LT - leucotriena	
MDA- malonaldehidă	
MDR - Multidrug Resistance	
MEC – matrix extracelular	

CUPRINS

ABREVIERI

INTRODUCERE

NIVELUL CUNOAȘTERII PRIVIND NEFROTOXICITATEA ȘI NEFROPATIILE INDUSE DE MEDICAMENTE

Capitolul 1. ASPECTE ESENȚIALE ALE FIZIOLOGIEI RENALE

1.1. Homeostazia

1.1.1. Filtrarea glomerulară

1.1.2. Reabsorbția tubulară

1.1.3. Secreția tubulară

1.1.4. Transportorii membranari renali

1.1.5. Balanța acido-bazică

1.2. Secreția de hormoni

1.2.1 Eritropoietina

1.2.2. Urodilatina

1.2.3. Renina

1.2.4. Calcitriolul

1.2.5. Eicosanoidale

1.2.6. Kininele

1.2.7. Endotelina

Capitolul 2. ACTUALITĂȚI PRIVIND NEFROPATIILE

2.1. Nefropatia diabetică

2.2. Nefropatia hipertensivă

2.3. Nefropatia de reflux

2.4. Nefropatia ereditară

2.5. Nefropatia determinată de alți factori

Capitolul 3. NEFROTOXICITATEA ȘI MEDICAMENTELE

3.1. Semnificația clinică a insuficienței renale acute cauzate de medicamente

3.2. Agenți exogeni și endogeni care induc nefropatii

3.3. Mecanisme nefrotoxice

3.3.1. Diminuarea ratei filtrării glomerulare

3.3.2. Apoptoza și necroza

3.3.3. Biotransformarea substanțelor toxice în celulele renale

3.3.4. Peroxidarea lipidelor și leziunile celulei renale

3.3.5. Alterarea funcției mitocondriale

CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 4. OBIECTIVELE STUDIULUI EXPERIMENTAL. MATERIALE ȘI METODE.

4.1. Introducere

- 4.2. Medicamente utilizate și proprietățile lor biologice
 - 4.2.1. Structura și proprietățile ciclosporinei A
 - 4.2.2. Structura și proprietățile metotrexatului
 - 4.2.3. Structura și proprietățile aciclovirului
- 4.3. Materiale și metode de lucru
 - 4.3.1. Materiale biologice
 - 4.3.1.1. Animale de experiență: șobolani (*Rattus Norvegicus*) rasa Wistar
 - 4.3.1.2. Obținerea de culturi celulare renale de șobolan
 - 4.3.2. Metode de lucru
 - 4.3.2.1. Dozarea creatininei și ureei
 - 4.3.2.2. Dozarea în ser a sodiului, potasiului, calciului și magneziului
 - 4.3.2.3. Evaluarea indexului apoptotic în țesutul renal prin tehnica imunohistochimică TUNEL
 - 4.3.2.4. Urmărirea prin microscopie optică și electronică modificărilor structurale și ultrastructurale ale țesutului renal de șobolan
 - 4.3.2.5. Evaluarea citotoxicității în culturi de celule renale
 - 4.3.2.6. Determinarea nivelului intracelular al glutatationului redus
 - 4.3.2.7. Determinarea activității superoxid-dismutazei în culturi de celule renale
 - 4.3.2.8. Determinarea monoxidului de azot (NO)
 - 4.3.2.9. Determinarea activității β -galactozidazei în culturi de celule renale
 - 4.3.2.10. Metoda statistică de prelucrare a rezultatelor
- Capitolul 5. STUDIUL EXPERIMENTAL „*IN VIVO*” PRIVIND INFLUENȚA TRATAMENTULUI CU CICLOSPORINĂ, METOTREXAT ȘI ACICLOVIR ASUPRA NIVELULUI SERIC AL CREATININEI ȘI UREEI
- Capitolul 6. EFECTUL CICLOSPORINEI, METOTREXATULUI ȘI ACICLOVIRULUI ASUPRA NIVELULUI RATEI FILTRĂRII GLOMERULARE ȘI ASUPRA TRANSPORTULUI TUBULAR AL IONILOR LA ANIMALE DE EXPERIENȚĂ
 - 6.1. Dinamica filtrării glomerulare sub influența ciclosporinei, metotrexatului și aciclovirului
 - 6.2. Dinamica ionilor de Na^+ și K^+ sub influența tratamentului cu ciclosporină, metotrexat și aciclovir
 - 6.3. Dinamica ionilor de Ca^{2+} și Mg^{2+} sub influența tratamentului cu ciclosporină, metotrexat și aciclovir
- Capitolul 7. STUDII HISTOLOGICE PRIVIND MODIFICĂRILE INDUSE DE TRATAMENTUL CU CICLOSPORINĂ, METOTREXAT ȘI ACICLOVIR ÎN ȚESUTULUL RENAL DE ȘOBOLAN
 - 7.1. Evaluarea indexului apoptotic în țesutul renal
 - 7.2. Identificarea modificărilor structurale și ultrastructurale ale țesutului renal
- Capitolul 8. STUDII EFECTUATE PE CULTURI DE CELULE RENALE DE ȘOBOLAN EXPUSE LA CICLOSPORINĂ, METOTREXAT ȘI ACICLOVIR

- 8.1. Evidențierea citotoxicității induse de ciclosporină, metotrexat și aciclovir în culturi de celule renale
- 8.2. Dinamica unor biomarkeri ai stresului oxidativ în culturi de celule renale sub influența ciclosporinei, metotrexatului și aciclovirului
- 8.3. Evidențierea β -galactozidazei asociată senescentei celulare și evaluarea indexului mitotic sub influența ciclosporinei, metotrexatului și aciclovirului
- 8.4. Influența unor molecule biologice active asupra senescentei replicative induse de ciclosporină, metotrexat și aciclovir

CONCLUZII GENERALE

BIBLIOGRAFIE

Introducere

O serie de medicamente nemodificate sau metabolizate se elimină din organism prin rinichi care devine unul dintre cele mai vulnerabile organe la medicamente. Cele mai multe medicamente au un potențial nefrototoxic, iar unele dintre acestea pot cauza diferite modele lezionale.

Rinichiul posedă unele trăsături care permit nefrotoxinelor să se acumuleze în țesutul renal. Tubul proximal al rinichiului prezintă o arie mare pentru legarea nefrotoxinelor și pentru transportul lor în epiteliul renal. Reabsorbția filtratului glomerular crește progresiv concentrația intraluminală a nefrotoxinelor, în timp ce transportul specific din rinichi poate determina toxicitate specifică locală.

Efectele medicamentelor sunt rezultatul unor modificări celulare și moleculare induse direct sau indirect. Celulele răspund rapid la medicamente printr-o paletă variată de procese celulare (secreție, apoptoză, senescență, transformare celulară, diviziune celulară). Răspunsul celulelor la un medicament diferă de la un tip celular la altul și implică o serie de molecule care realizează transducția semnalului. O cale de semnalizare activată interferează cu alte căi din rețeaua de semnalizare și, implicit, cu diferite căi metabolice. Afectarea funcției celulare va conduce la disfuncția țesutului respectiv.

Aproape toate medicamentele, dacă nu chiar toate, au efecte adverse nedorite. Acest fapt invocă necesitatea studiului mecanismelor care stau la baza citotoxicității lor în alte țesuturi decât acelea care sunt țintite.

Înțelegerea mecanismului nefrototoxic al medicamentelor va permite în viitor formularea unor strategii terapeutice care să țintească, pe de o parte, organul țintă și, pe de altă parte, să diminueze efectele secundare.

Dat fiind faptul că rinichiul este o țintă pentru majoritatea medicamentelor, ne-am propus să realizăm un studiu comparativ asupra efectelor ciclosporinei A (CsA), metotrexatului (MTX) și aciclovirului (ACV), medicamente cu mecanisme de acțiune diferite, asupra funcțiilor renale și, de asemenea, efectul unor substanțe cu proprietăți anti-oxidante asupra parametrilor biochimici și morfologici, modificați de către acestea. Înțelegerea mecanismului nefrototoxic va conduce inevitabil la noi strategii terapeutice prin care efectele adverse ale medicamentelor să poată fi inhibitate sau anihilate.

Cuvinte cheie: uree, creatinină, rata filtrării glomerulare, apoptoză, transportul ionilor de Na, K, Ca și Mg, culturi de celule renale, specii reactive de oxigen, glutatión, activitatea superoxid-dismutazei, activitatea beta-galactozidazei.

NIVELUL CUNOAȘTERII PRIVIND NEFROPATIILE ȘI NEFROTOXICITATEA INDUSE DE MEDICAMENTE

Capitolul 1 – ASPECTE ESENȚIALE ALE FIZIOLOGIEI RENALE

Sunt prezentate pe larg mecanismele care controlează filtrarea glomerulară (autoreglarea, mecanismul miogenic, mecanismul feedback tubulo-glomerular), transportorii membranari specifici epiteliului renal, implicați în reabsorbția și secreția unor ioni anorganici și organici. De asemenea, în acest capitol am realizat o amplă analiză a funcției endocrine a rinichiului (secreție de eritropoietină, urodilatină, renină, calcitriol, prostaglandine, kinine, endotelina) și a căilor care semnalizează secreția acestor hormoni și mecanismul molecular prin care își exercită rolul vasodilatator sau vasoconstrictor. O atenție deosebită a fost acordată sintezei PGE₂ (prostaglandina E₂) în rinichi și acțiunii sale asupra transcripției genelor pentru Na, K-ATP-ază, prin căi mediate de Ca²⁺ și AMPc, și asupra eliberării reninei din aparatul juxtaglomerular.

Capitolul 2 – ACTUALITĂȚI PRIVIND NEFROPATIILE

Acest capitol se axează pe descrierea formelor de nefropatie (nefropatia diabetică, hipertensivă, de reflux, ereditară și determinată de alți factori) și a unor factori cu rol în evoluția bolii. Astfel, deficiența NO are un rol important în nefropatia diabetică, iar producția crescută a NO constituie un mediator în dezvoltarea nefropatiei de reflux. Activarea factorului TGFβ (*beta transforming growth factor*) și expresia crescută a M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) au implicații în dezvoltarea nefropatiei diabetice, respectiv, a nefropatiei de reflux. Nivelul urinar crescut al VEGF (*vascular endothelial growth factor*) este un indicator al nefropatiei de reflux.

De asemenea, sunt prezentate principalele modificări morfologice, vasculare și biochimice ce caracterizează diferitele forme de nefropatie. Îngroșări glomerulare și leziuni nodulare sunt cele mai frecvente modificări în nefropatia diabetică, glomeruloscleoza segmentală caracterizează nefropatia hipertensivă, iar expansiunea și hiper celularitatea mesangiumului, precum și prezența de granule mari sunt semnalate în nefropatia de reflux. În nefropatia indusă de calculii renali apare fibroza, depozite dense, lamelate în tubii urinari, înconjurate de celule gigante polinucleate.

În capitolul 3 – NEFROTOXICITATEA ȘI MEDICAMENTELE

Sunt descrise principalele grupe de medicamente (antibiotice, agenți chemoterapeutici, imunosupresori, vasoactivi și metale grele) cu efect nefrototoxic precum și mecanismele prin care acestea induc nefrotoxicitatea. Un accent deosebit a fost pus pe răspunsurile celulelor nefrotice la diferite medicamente (fig. 3-1). Aceste răspunsuri includ: apoptoza și necroza,

peroxidarea membranelor celulare și disfuncția mitocondrială ca urmare a scăderii producției de ATP. Disfuncția mitocondrială este marcată de mișcarea anormală a ionilor care conduce la distrugerea homeostaziei mediului intern.

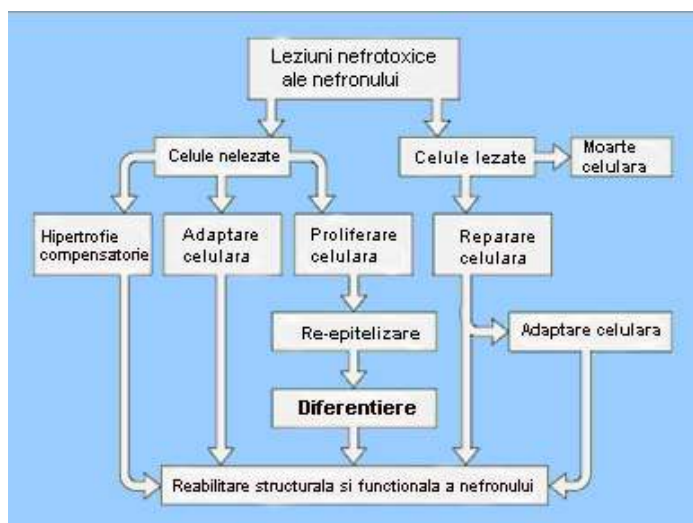


Fig. 3-1 Răspunsul nefronului la un agent nefrotic.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 4 – **OBIECTIVELE STUDIULUI EXPERIMENTAL. MATERIALE ȘI METODE**

Acest capitol este consacrat cercetării originale, având ca obiective studiul mecanismului nefrotic indus de ciclosporina A (CsA), metotrexat (MTX) și aciclovir (ACV) și al răspunsului celulelor renale cultivate și al efectelor unor molecule biologice active asupra unor procese celulare renale mediate de cele trei medicamente.

Am ales pentru studiu aceste medicamente pentru că CsA este un imunosupresor de succes în tratamentul transplantului de rinichi, MTX are o largă întrebuințare în oncologia clinică, dermatologie și transplant de organe, iar ACV a fost foarte puțin studiat la nivel renal.

Studiul experimental s-a desfășurat în mai multe etape:

- Studii *in vivo* la animale de experiență privind dinamica unor parametri sanguini și urinari (creatinină, uree, sodiu, potasiu, calciu și magneziu) în urma tratamentului i.p. timp de 7, 14 și 21 de zile cu diferite concentrații de ciclosporină A, metotrexat și aciclovir;
- Determinarea nivelului ratei filtrării glomerulare și a transportului tubular al ionilor sub influența celor trei medicamente;
- Urmărirea pe secțiuni histologice din țesutul renal de șobolan a prezenței unor modificări structurale și ultrastructurale precum și dinamica indexului apoptotic

după tratamentul cu cele trei medicamente, folosind tehnici de microscopie optică și electronică, și tehnica imunohistochimică TUNEL;

- Studii *in vitro* pe culturi de celule renale de șobolan privind gradul de citotoxicitate indus de cele trei medicamente, inducerea stresului oxidativ după tratamentul cu cele trei medicamente, inducerea senescenței replicative de către cele trei medicamente, precum și evaluarea indexului mitotic după tratament.
- Influența unor molecule biologice active (arginina, prostaglandina E₂, α-tocoferolul, 4-amino-1,8-naftilamid) în revenirea la normal a parametrilor biochimici și histologici modificați după tratamentul cu ciclosporină, metotrexat și aciclovir.

În subcapitolul – Medicamente utilizate și proprietățile lor biologice – sunt prezentate structura chimică și mecanismul de acțiune specific celulelor țintă.

Concentrațiile agenților medicamentoși și a biomoleculelor utilizate au fost următoarele:

- Ciclosporina A (CsA) (Sigma, C3662) - concentrații folosite: 10, 50 și 100 mg/kg greutate corp /zi și 25, 50 și 100 μg/mL mediu de cultură;
- Metotrexat (MTX) (Sigma, M9929) - concentrații folosite: 0.1, 0.5 și 1.5 mg/kg greutate corp/zi și 10, 20, 50 μg/mL mediu de cultură;
- Aciclovir (ACV) (Sigma, A4669)- concentrații folosite: 25, 50 și 100 mg/kg greutate corp/zi și 25, 50 și 100 μg/mL mediu de cultură
- L-Arginina (L-Arg) (Sigma, A5006) - concentrații folosite: 100 μg/kg greutate corp /zi și 100 μg/mL mediu de cultură;
- Prostaglandina E₂ (PGE₂) (Sigma, P4172) - concentrații folosite: 10 μg/kg greutate corp /zi;
- 4 amino-1.8-naftalimid (ANF) (Chemos GmbH, 131403) - concentrații folosite: 10 μg/mL mediu de cultură;
- Vitamina E (Sigma, T3634) - concentrații folosite: 100 μg/mL mediu de cultură.

Ciclosporina A (CsA) este un oligopeptid ciclic nonribozomal, alcătuit din 11 aminoacizi, cu un aminoacid caracteristic în poziția C9, derivat din metil-serină. CsA are formula chimică C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂, iar greutatea moleculară 1202,61. Structura are toate legăturile peptidice în forma trans, nu conține elemente regulate de structură secundară și nici legături de hidrogen intramoleculare și expune în exterior toate grupările polare.

În citoplasmă, CsA se leagă la o ciclofilină (CpN) formând complexul csA-CpN care inhibă activitatea calcineurin-fosfatazei (CaN). Inhibiția CaN împiedică defosforilarea factorului nuclear NF-ATc și, prin aceasta, transportul lui în nucleu și legarea lui la componenta nucleară, NF-ATn (fig. 4-2). Această etapă este esențială pentru reglarea pozitivă a ARNm pentru diferite citokine, în particular pentru IL-2 care este necesară proliferării și maturării limfocitelor T.

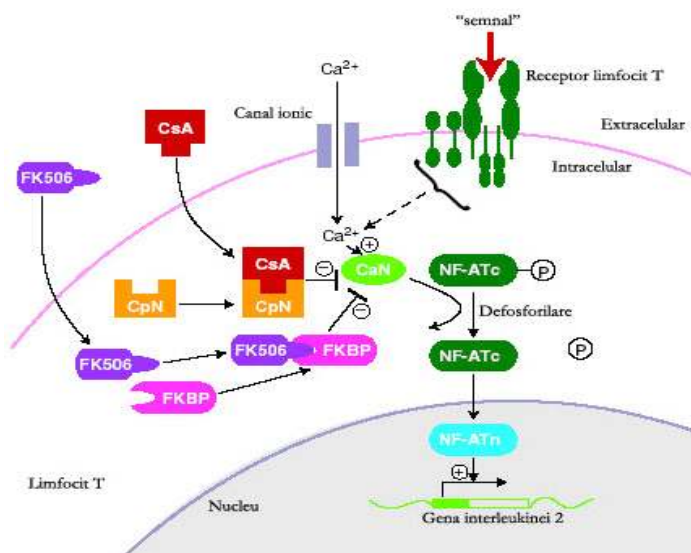


Fig. 4-2 Mecanismul de acțiune al CsA și FK506 în limfocitele Th.

Legendă: CaN-calcineurin-fosfatazei, CpN-ciclofilină, FKBP65- proteina de legare a FK506, NF-AT-nuclear factor of activated T cells

Metotrexatul (MTX) este un derivat al acidului folic ($C_{20}H_{22}N_8O_5$).

MTX interferează cu diviziunea celulară și cu metabolismul acidului folic.

În ce privește mecanismul de acțiune, MTX acționează ca un antifolat. Ținta majoră a MTX este dihidrofolat reductaza pe care o inhibă, dar MTX inhibă, de asemenea, sinteza ribonucleotidelor purinice, (reacție catalizată de 5-amino-4-imidazol-carboxamid-ribozid-5'-monofosfat transformilaza și timidat sintetaza) cât și aceea a dezoxiribonucleotidelor (fig. 4-4) Metotrexatul (MTX) este un derivat al acidului folic ($C_{20}H_{22}N_8O_5$).

MTX interferează cu diviziunea celulară și cu metabolismul acidului folic.

În ce privește mecanismul de acțiune, MTX acționează ca un antifolat. Ținta majoră a MTX este dihidrofolat reductaza pe care o inhibă, dar MTX inhibă, de asemenea, sinteza ribonucleotidelor purinice, (reacție catalizată de 5-amino-4-imidazol-carboxamid-ribozid-5'-monofosfat transformilaza și timidat sintetaza) cât și aceea a dezoxiribonucleotidelor (fig. 4-4).

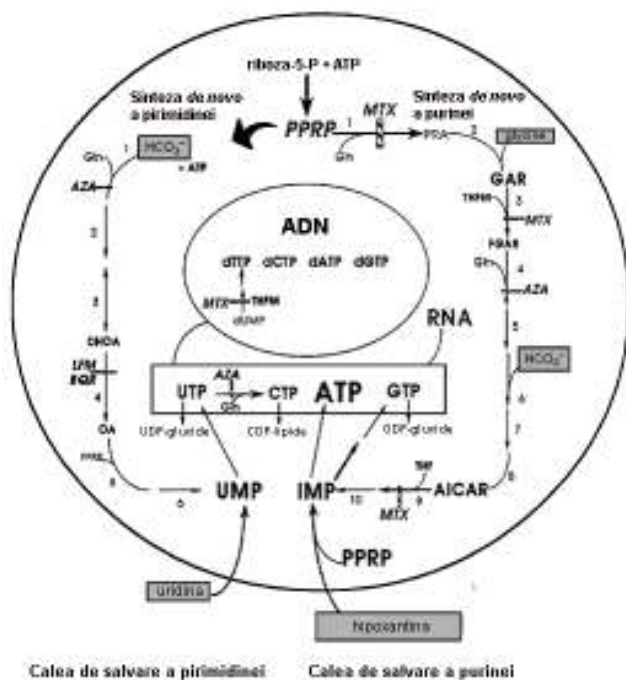


Fig. 4-4 Mecanismul de acțiune a MTX.

Aciclovirul (acyclovir) este un analog al guaninei (2-amino-9(2-hydroxyethoxymethyl)- 3H-purin-6) ($C_8H_{11}N_5O_3$).

Aciclovirul diferă de alți analogi ai bazelor azotate, el conținând doar o structură nucleozidică parțială (pentoza este substituită de un lanț deschis).

Mecanismul de acțiune al aciclovirului se realizează în două etape: 1) odată intrat în celulele infectate cu HSV, aciclovirul este convertit selectiv în monofosfat de către timidin-kinaza virală care este mult mai eficientă decât timidin-kinaza celulară. Aciclovir-monofosfat este fosforilat în forma activă, aciclovir-trifosfat, de către kinazele celulare (fig. 4-6). Aciclovir-trifosfat se încorporează în ADN-ul viral în timpul replicării acestuia, acționând ca un terminator de lanț, deoarece nu are gruparea 3'-OH terminală. Așadar, aciclovir-trifosfat intră în competiție cu 2-dezoxiguanozin trifosfat (dGTP) ca substrat pentru ADN-polimeraza virală pe care o inhibă, inhibând, astfel, replicarea ADN viral. Forma monofosfat a aciclovirului se încorporează în ADN viral, rezultând în terminarea lanțului.

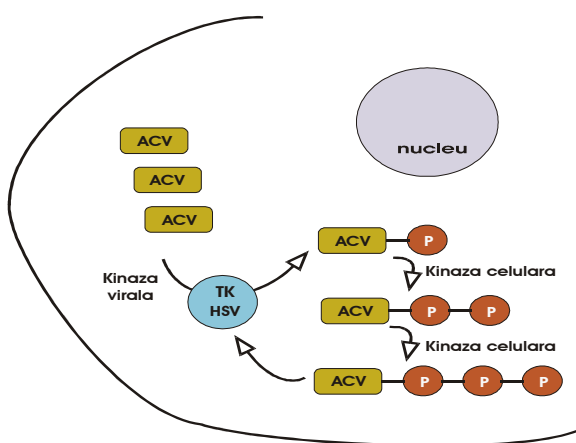


Fig. 4-6 Mecanismul de acțiune al aciclovirului.

Ca material biologic am folosit pentru experimentele *in vivo*, șobolani albi, rasa Wistar, (8-9 luni și 180-200g),

iar pentru experimentele *in vitro* culturi de celule renale de șobolan.

Determinările efectuate *in vivo* și *in vitro* au fost următoarele:

- Dozarea a creatininei și ureei serice și creatininei urinare
- Dozarea în ser a sodiului, potasiului, calciului și magneziului
- Evaluarea indexului apoptotic în țesutul renal prin tehnica imunohistochimică TUNEL
- Urmărirea modificărilor structurale și ultrastructurale ale țesutului renal prin microscopie optică și electronică
- Evaluarea citotoxicității în culturi de celule renale prin urmărirea indicelui de viabilitate celulară

Determinarea unor biomarkeri ai stresului oxidativ:

- Determinarea nivelului intracelular al glutationului redus și oxidat
- Determinarea activității superoxid-dismutazei în culturi de celule renale
- Determinarea monoxidului de azot (NO) – reacția Griess
- Determinarea activității β-galactozidazei (biomarker al senescentei replicative) în culturi de celule renale
- Metodă statistică de prelucrare a rezultatelor

Capitolul 5 – STUDIUL EXPERIMENTAL „*IN VIVO*” PRIVIND INFLUENȚA TRATAMENTULUI CU CICLOSPORINĂ, METOTREXAT ȘI ACICLOVIR ASUPRA NIVELULUI SERIC AL CREATININEI ȘI UREEI

În acest capitol a urmărit dinamica nivelului seric al ureei și creatininei la șobolani expuși la diferite concentrații de CsA, MTX și ACV, precum și influența hidratării folosită ca pre-tratament și a L-Arg și PGE₂ asupra celor doi parametri biochimici.

Tratamentul șobolanilor cu CsA, MTX și ACV a fost urmat de creșterea nivelului seric al creatininei și ureei. Nivelurile serice ale celor doi parametri reprezintă media valorilor individuale din loturile de șobolani.

În toate experimentele efectuate, nivelurile creatininei și ureei au crescut într-o manieră dependentă de concentrație și de timpul de tratament, iar hidratarea șobolanilor, folosită ca pre-tratament a influențat pozitiv cei doi parametri biochimici investigați.

Tratamentul cu CsA a determinat creșteri semnificative ($p \leq 0.05$) ale creatininei (fig. 5-1) și ureei la toate concentrațiile și la toți timpii de tratament. Rezultate similare au fost obținute și la șobolanii tratați cu MTX (fig. 5-2).

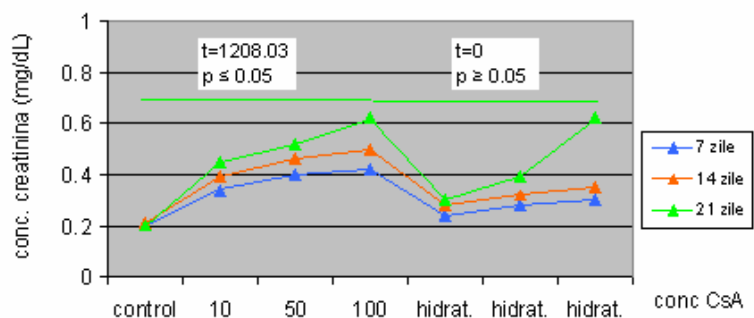


Fig. 5-1 Efectul tratamentului cu CsA și al hidratării pre-tratament a șobolanilor asupra nivelului seric al creatininei.

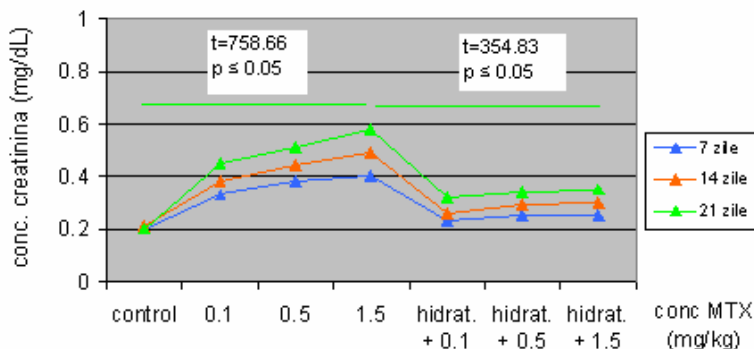


Fig. 5-2 Efectul tratamentului cu MTX și al hidratării pre-tratament a șobolanilor asupra nivelului seric al creatininei

După toate perioadele de tratament cu aciclovir, nivelul seric al creatininei (fig. 5-3) și ureei a înregistrat creșteri semnificative ($p \leq 0.05$) la toate concentrațiile folosite.

Pentru că NO și PGE₂ au efecte vasodilatatoare și pentru că arginina este un precursor al NO și al ornitinei, am urmărit efectul L-argininei (100 μg/kg) și PGE₂ (10 μg/kg) în combinație cu CsA (50 mg/kg), MTX (0.5 mg/kg) și ACV (50 mg/kg) pentru un interval de tratament de 14 zile.

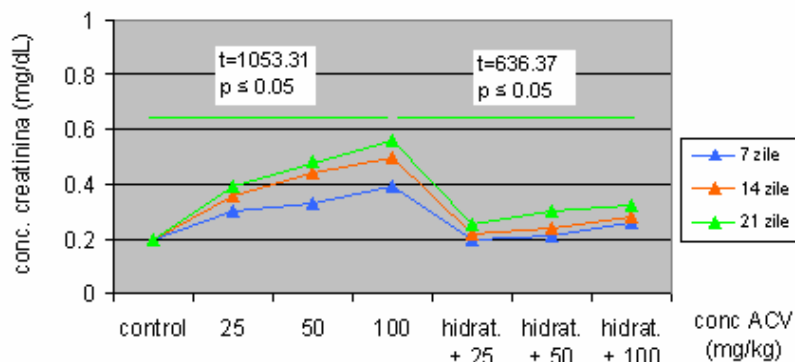


Fig. 5-3 Efectul tratamentului cu ACV și al hidratării pre-tratament a șobolanilor asupra nivelului seric al creatininei.

L-arginina și prostaglandina E_2 asociată tratamentelor cu cei trei agenți medicamentoși folosiți (CsA, MTX și ACV), a determinat scăderea nivelului creatininei și ureei serice.

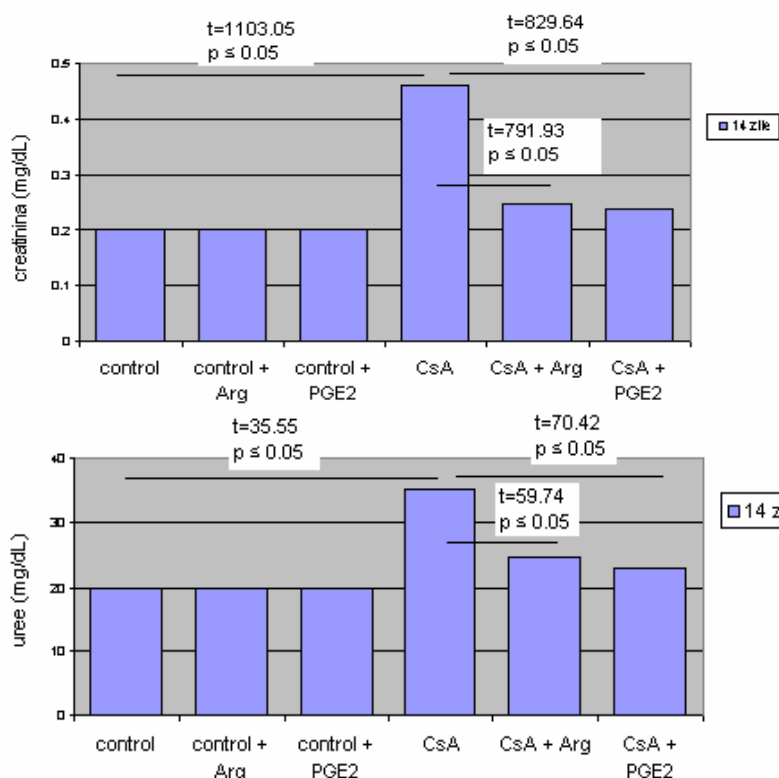


Fig. 5-5 Efectele tratamentului combinativ al CsA (A), MTX (B), ACV (C) cu L-Arg și PGE2 asupra nivelului seric al creatininei.

Fig. 5-6 Efectele tratamentului combinativ al CsA (A), MTX (B), ACV (C) cu L-Arg și PGE2 asupra nivelului seric al ureei.

Restabilirea parțială a parametrilor biochimici (creatinină și uree) cu L-arginină demonstrează capacitatea acestui aminoacid de a îmbunătăți funcția renală și posibilitatea de a fi utilizată ca o terapie adjuvantă ce poate ameliora efectele secundare ale agenților nefrotoxici. Faptul că PGE2 a avut efect benefic asupra funcției glomerulare afectate de cele trei medicamente poate sugera un efect al CsA, MTX și ACV asupra funcției de secreție a rinichilor.

Capitolul 6 – EFECTUL CICLOSPORINEI, METOTREXATULUI ȘI ACICLOVIRULUI ASUPRA NIVELULUI RATEI FILTRĂRII GLOMERULARE ȘI ASUPRA TRANSPORTULUI TUBULAR AL IONILOR LA ANIMALE DE EXPERIENȚĂ

În acest capitol am urmărit dinamica filtrării glomerulare și a ionilor de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} și Mg^{2+} sub influența celor trei medicamente. Analiza valorilor obținute pentru RFG arată că toate cele trei medicamente (CsA, MTX și ACV) au provocat o scădere semnificativă ($p \leq 0.05$) a acesteia.

Scăderea RFG a fost mai accentuată în cazul CsA (la conc. de 100 mg/kg, valoarea acestui parametru a fost de 7.87 după 21 zile de tratament vs. 91.30 mL/24h din lotul de control) decât în cazul ACV care la concentrația maximă (100 mg/kg) și după 21 de zile de tratament a determinat o valoare a RFG de 27.25.

În cazul CsA și a MTX, volumul urinar a fost scăzut proporțional cu concentrația medicamentului; în schimb, tratamentul cu ACV a fost însoțit de menținerea sau de o ușoară creștere a volumului urinar. În fig. 6-1 este ilustrată dinamica ionilor de Na și K, sub acțiunea CsA.

Determinarea concentrației plasmatice a ionilor de Na arată creșteri semnificative ($p \leq 0.05$) ale concentrației ionilor de Na după tratament cu CsA și scăderea nivelului lor după tratament cu ACV (101 mmol/L vs 143). CsA inhibă echivalentul enzimatic al pompelor de Na^+ , K^+ -ATP-aza din țesutul renal, producând o creștere intracelulară a concentrației Na^+ . Tratamentul cu MTX nu a fost urmat de modificări semnificative ($p \geq 0.05$) a concentrației plasmatice a acestui ion. O hipopotasemie a fost evidențiată după tratament cu CsA și ACV; concentrația ionilor de K după tratament cu MTX a rămas aproape nemodificată ($p \geq 0.05$). Concentrațiile serice ale celor doi ioni au suferit modificări în funcție de concentrația medicamentului și de timpul de tratament.

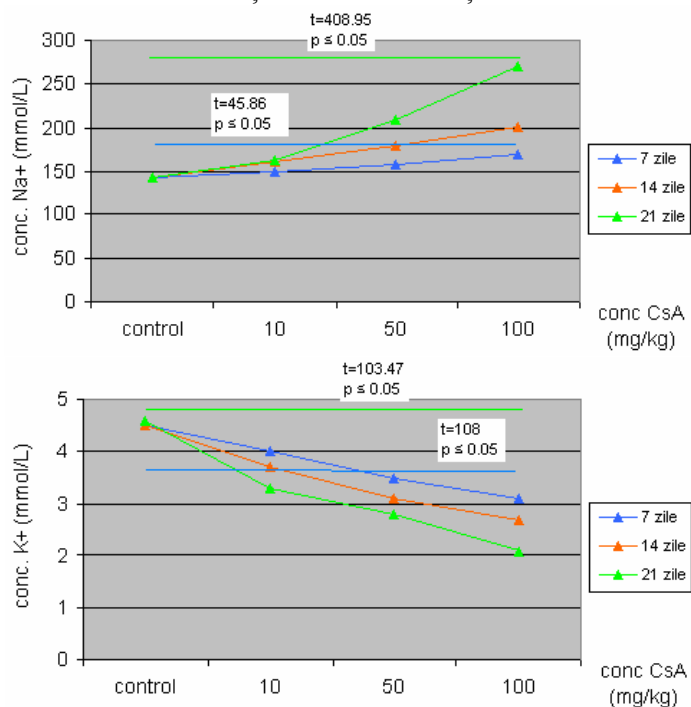


Fig. 6-1 Efectul tratamentului cu CsA asupra nivelului seric al Na^+ și K^+ .

Aceste rezultate arată că CsA, MTX și ACV acționează asupra proteinelor transportoare și cotransportoare de la nivelul epiteliului tubular al nefronului.

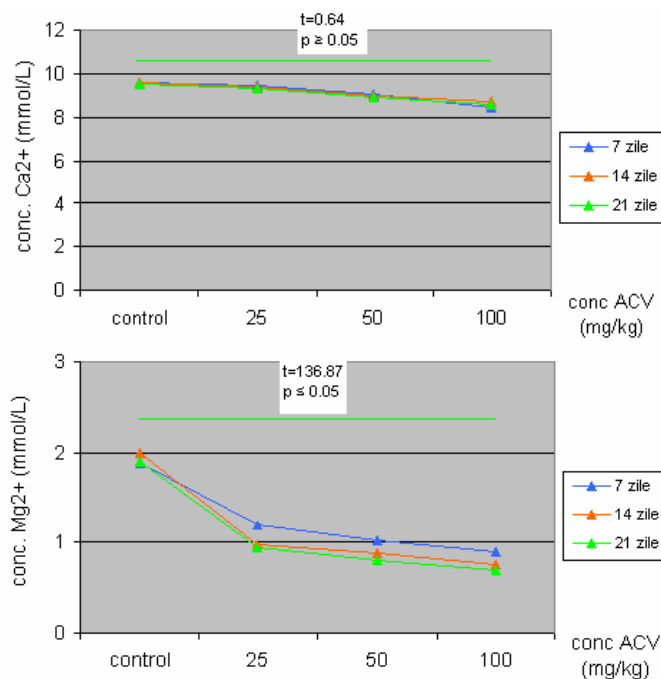


Fig. 6-6 Efectul ACV asupra nivelului seric al ionilor de Ca^{2+} și Mg^{2+} .

Tratamentul șobolanilor cu CsA și MTX a indus o scădere semnificativă ($p \leq 0.05$) a concentrației plasmatice a ionilor de Ca și Mg. Scăderea concentrației serice a Ca în urma tratamentului cu CsA și MTX se datorează atât acumulării lui intracelulare (datele din literatură menționează acest lucru) cât și hipercalciuriei. În cazul ACV, nivelul seric al Ca nu a suferit modificări semnificative (fig. 6-6). Din aceste rezultate transpare ideea că CsA și MTX afectează profund reabsorbția tubulară a Ca de către proteinele transmembranare transportoare, în schimb ACV nu influențează transportul membranal al Ca.

Nivelul seric al Mg a fost scăzut atât după tratamentul cu CsA cât și după cel al MTX și ACV (fig. 6-6). Acest rezultat contrazice așa-numitul antagonism Ca/Mg. Acest efect se datorează inducției unui defect de reabsorbție tubulară.

Pe baza rezultatelor obținute și coroborate cu datele din literatura de specialitate se poate sugera un posibil mecanism prin care cele doua medicamente, CsA și MTX, și în mai mică măsură ACV, afectează transportul ionilor la nivelul diferitelor segmente ale nefronilor (fig. 6-7).

Membrana plasmatică a celulelor epiteliului tubular este foarte bogată în proteine transmembranare care realizează toate tipurile de transport (uniport, simport și antiport).

70% din calciul filtrat la nivel glomerular se reabsoarbe în segmentul proximal al nefronului, 20% este reabsorbit la nivelul ramului ascendent al ansei Henle și 8% în tubul contort distal.

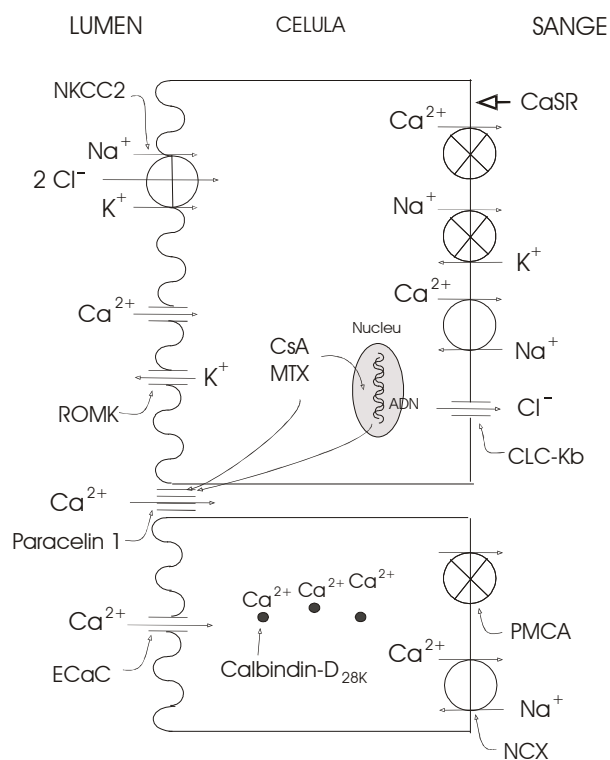


Figura 6-7 Un posibil mecanism molecular al CsA și MTX în tubii renali. Legendă: CaSR-receptorii sensibili la Ca, EcaC-canalele epiteliale de Ca, NKCC2-natrium, kalium, chloride channel-2, PCLN-1-paracellin-1, PMCA-plasma membrane Ca-ATP-aza, ROMK-renal outer medullary potassium

Principala proteină vizată de aceste medicamente este PCLN-1 (paracellin-1) pentru că ea asigură cea mai mare parte a reabsorbției Ca de-a lungul tubilor. O dovadă a implicării principale a acestei proteine o constituie mutațiile PCLN-1

identificate în cazurile cu sindromul de hipomagnezemie și hipocalciurie. Aceste date sprijină ipoteza că alterări ale secvenței AA din PCLN-1 afectează reabsorbția calciului și magneziului.

Efectul negativ pe care îl exercită CsA și MTX asupra celulelor tubulare s-ar putea datora acumulării lor în celule, iar această acumulare este posibilă prin inhibiția sau expresia scăzută a pompelor gp-P (glicoproteina P).

Pompele gp-P expulzează din celule substanțele hidrofobice, cum ar fi agenții chimioterapici și imunosupresori (ciclosporina A). P-gp este implicată în interacțiunile medicamentelor cu diferite țesuturi (nervos, hepatic, renal, intestinal, etc.). Rolul P-gp în eliminarea renală a CsA rămâne însă necunoscut.

Capitolul 7 – STUDII HISTOLOGICCE PRIVIND MODIFICĂRILE INDUSE DE TRATAMENTUL CU CICLOSPORINĂ, METOTREXAT ȘI ACICLOVIR ÎN ȚESUTUL RENAL DE ȘOBOLAN

Acest capitol a fost consacrat evaluării indexului apoptotic precum și a modificărilor structurale și ultrastructurale după tratamentul cu CsA, MTX și ACV. După tratamentul cu ACV, moartea celulară de tip apoptotic nu a depășit limita normală fiziologică. Moartea celulară indusă de ACV se realizează indirect, prin intermediul obstrucției tubulare consecutive formării de microcristale de aciclovir.

La doze scăzute, rata apoptozei crește direct proporțional cu perioada de expunere la MTX. Indexul apoptotic scade invers proporțional cu concentrația de MTX administrată și cu durata tratamentului, locul ei fiind luat de necroză.

În cazul tratamentului cu CsA, indexul apoptotic crește odată cu durata de expunere dar și cu concentrația de CsA folosită. Apoptoza are loc mai ales în cortexul renal și mai puțin la nivelul glomerulilor. Apoptoza atinge un nivel maxim la conc. de 100 mg/kg/zi CsA și după 21 zile de administrare (fig. 7-6).

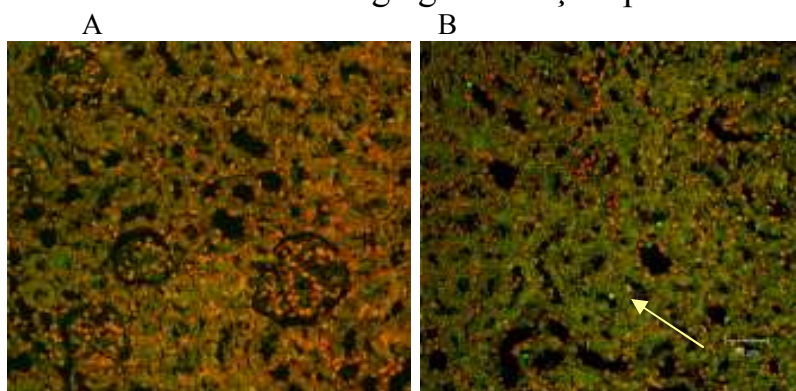


Fig. 7-6 Imagini de microscopie confocală prezentând nuclei apoptotici într-o zonă de țesut renal la șobolani din lotul tratat cu 100 mg/kg CsA, timp de 21 de zile (B) vs lot normal (A). Colorație dublă FITC /PI. Mărire 20/zoom1.

La șobolanii care au urmat tratamentul cu aciclovir întreaga arhitectură renală a fost preservată. La concentrația de 100 mg/kg/zi, după 21 de zile, am observat foarte rar prezența unor cristale de aciclovir, formate în urma precipitării medicamentului (fig. 7-11). Cristalele se pot acumula la suprafața celulelor epiteliale tubulare datorită concentrației celulare crescute, unde fluxul urinar este limitat.

Nivelul ATP dintr-o celulă este un factor decisiv în calea pe care o va urma: apoptoza sau necroza.

Prin urmare, când MPT (pori mitocondriali de tranziție a permeabilității) epuizează ATP atunci apare necroza, iar când MPT apare fără depleția ATP, atunci se dezvoltă apoptoza. Dacă depleția se dezvoltă în timpul progresiei apoptozei, va interveni moartea necrotică pentru a produce necroza secundară care, adesea, este asociată cu apoptoza (fig. 7-9). Deci, MPT este un mecanism patofiziologic împărtășit atât de apoptoză cât și de necroză, iar o distincție netă între cele două procese nu este clară.

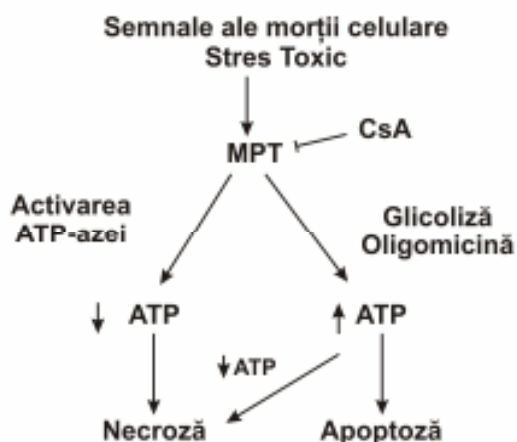


Fig. 7-9 Implicarea ATP în apoptoză și necroză.

Moartea celulară indusă de MTX a fost dependentă de timpul de expunere și nu a prezentat trăsături apoptotice.

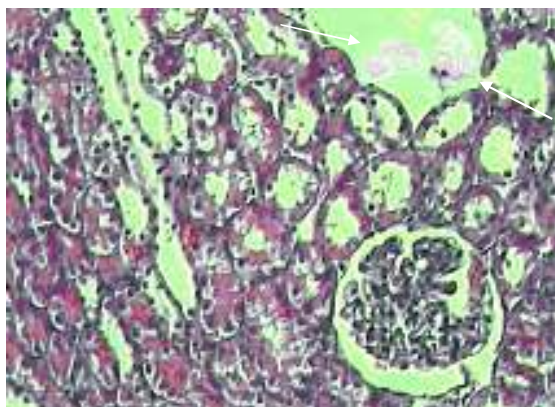


Fig. 7-11 Imagine de țesut renal prezentând un glomerul și tubuli renali ușor dilatați și parțial încărcăți cu cristale de ACV (marcate cu săgeți). Colorație HE. Mărire X20.

În cazul MTX, la dozele scăzute folosite de noi (0.1 și 0.5 mg/kg/zi), tubulii și glomerulii renali nu prezintă modificări structurale. După 21 de zile de tratament cu doza de 1.5 mg/kg MTX, epiteliul tubular pare să aibă un aspect neregulat, așa cum se întâlnește în necroza tubulară acută. Apare o ușoară hipertrofie a glomerulului asociată cu creșterea în mărime a glomerulului, precum și adeziune capsulară. Matrixul mezangial se reduce după tratamentul cu MTX (fig. 7-12).

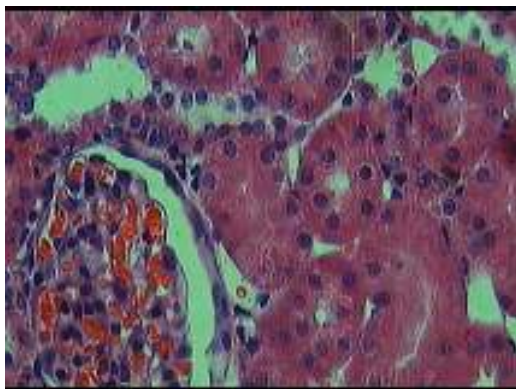


Figura 7-12 Imagine de țesut renal reprezentând zone cu hipertrofie glomerulară și reducerea matrixului mezangial. Colorație HE. Mărire X40.

După tratamentul cu CsA, la concentrația de 10 mg/kg/zi, nu am observat modificări structurale renale. Odată cu creșterea dozei folosite, precum și cu durata de expunere, modificările histopatologice încep să apară gradual. Astfel, după tratamentul cu 50 mg/kg CsA timp de 21 de zile, am remarcat pierderea parțială a marginii în perie la nivel tubular, edemul interstițial și chiar necroză a epiteliului. La doze de 100 mg/kg CsA, modificările histopatologice observate atât în corticală cât și în medulara renală au constat în fibroză tubulo-interstițială, vacuolizare apicală, îngroșarea membranei bazale glomerulare, precum și apariția depozitelor de hialin (fig. 7-13).

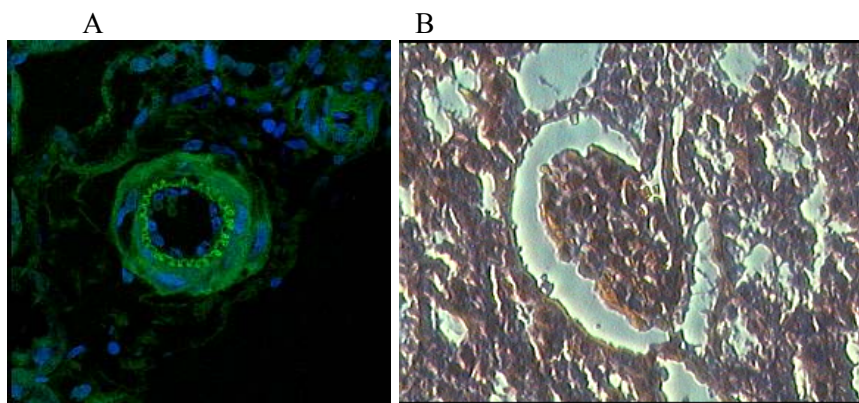


Fig. 7-13 Aspect de țesut renal cu depozite de hialin la nivel arteriolar (A), precum și aparat glomerular cu îngroșarea membranei bazale și cu depozite de amiloid (B). Colorație AO-EB (A) și HE (B). Mărire X40 (A, B).

În cadrul investigațiilor de microscopie electronică, după tratamentul șobolanilor cu doze scăzute de ACV timp de 7 zile, nu am înregistrat modificări ultrastructurale caracteristice apoptozei, imaginile electronomicroscopice ale țesutului renal nefiind diferite față de cele ale lotului martor.

După 7 zile de expunere la 0.1 mg/kg/zi MTX, majoritatea alterărilor constatate se încadrează în tipul apoptotic timpuriu de moarte celulară: apoptoza timpurie cu invaginare pronunțată a anvelopei nucleare (fig. 7-15A). În spațiul vascular se pot întâlni aglomerări de limfocite apoptotice cu activitate fagocitară (fig. 7-15B - un fagozom alcătuit în interior din membrane dispuse concentric).

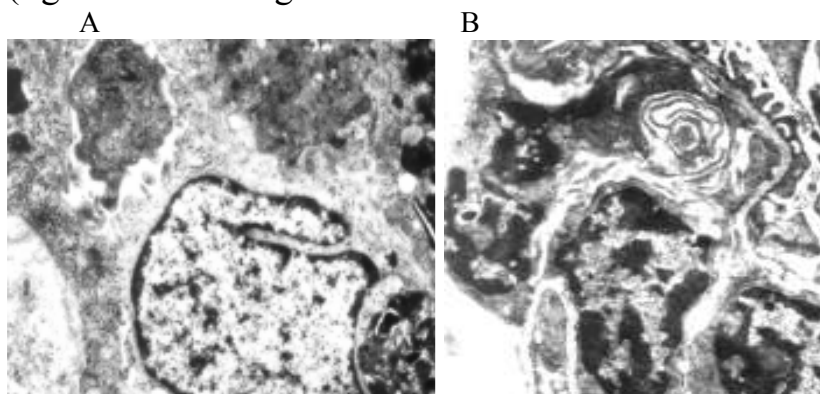


Fig. 7-15 Imagini electronomicroscopice ilustrând modificări ale celulelor din glomerulul (A, B) unui șobolan după expunerea la doze mici de MTX. Mărire (A) X6.300, (B) X7.500.

Modificări ultrastructurale ale țesutului renal pe care le-am întâlnit la șobolanii expuși la doze mici de MTX, le observăm și după expunerea la CsA.

Capitolul 8 – STUDII EFECTUATE PE CULTURI DE CELULE RENALE DE ȘOBOLAN EXPUSE LA CICLOSPORINĂ, METOTREXAT ȘI ACICLOVIR

În acest capitol am urmărit evidențierea citotoxicității induse de ciclosporină, metotrexat și aciclovir în culturi de celule renale, dinamica unor biomarkeri ai stresului oxidativ, evidențierea β -galactozidazei asociată senescenței celulare și evaluarea indexului mitotic sub influența celor trei

medicamente, precum și efectul L-Arg, α -tocferol (vitamina E) și ANF (4 amino-1.8-naftalimid) – un inhibitor al PARP1, asupra parametrilor de mai sus.

Viabilitatea celulelor a scăzut după tratamentul cu cele trei medicamente într-o manieră dependentă de concentrație și de durata de tratament ((în cazul CsA - conc. 50 $\mu\text{g/mL}$ și 48 de ore ajungând la 82%) (fig. 8-1), și respectiv la 78% (în cazul concentrației de 100 $\mu\text{g/mL}$).

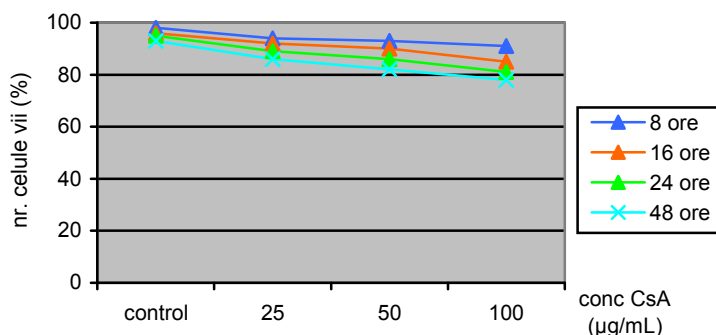


Fig. 8-1 Viabilitatea celulelor renale de șobolan cultivate în prezența concentrațiilor folosite de CsA.

Pornind de la ideea că stresul oxidativ poate reprezenta pentru multe medicamente mecanismul molecular al citotoxicității lor, am determinat, în culturi de celule renale, capacitatea celor trei medicamente de a crește producția de specii reactive de oxigen (ROS) prin evaluarea sistemelor de apărare antioxidantă: glutationul redus intracelular și activitatea superoxid-dismutazei.

Evaluarea glutationului redus (GSH) și a glutationului oxidat (GSSH), efectuată pentru toate concentrațiile CsA, MTX (fig. 8-2) și ACV la un interval de 48 de ore, indică diminuarea statistic semnificativă ($p \leq 0.05$) nivelului intracelular al GSH și creșterea nivelului GSSH pentru CsA și MTX; acești parametri au suferit modificări neesențiale ($p \geq 0.05$) în celulele tratate cu ACV. Când culturile au fost tratate cu CsA, MTX (fig. 8-2) și ACV în combinație cu L-arginină (100 $\mu\text{g/mL}$), valorile parametrilor s-au apropiat de valorile de control, fapt ce demonstrează că cele două medicamente induc stres oxidativ prin afectarea balanței redox controlate de glutatone, iar L-arginina are efecte antioxidante.

Activitatea SOD a fost diminuată semnificativ ($p \leq 0.05$) în culturile tratate cu CsA și MTX și nu a fost modificată ($p \geq 0.05$) în culturile tratate cu ACV; activitatea SOD a scăzut într-o manieră dependentă de concentrație. La concentrația de 100 $\mu\text{g/mL}$ CsA a provocat după 48 de ore de tratament scăderea activității SOD la jumătate ($1.68 \pm 0.2 \mu\text{g/mg}$ proteină vs 3.25 ± 0.6 în probele de control) (fig.8-3). De asemenea, MTX a avut un efect similar. Tratamentul combinativ al CsA și MTX cu L-Arg a fost urmat de o creștere semnificativă ($p \leq 0.05$) a valorilor activității SOD, apropiată valorilor de control.

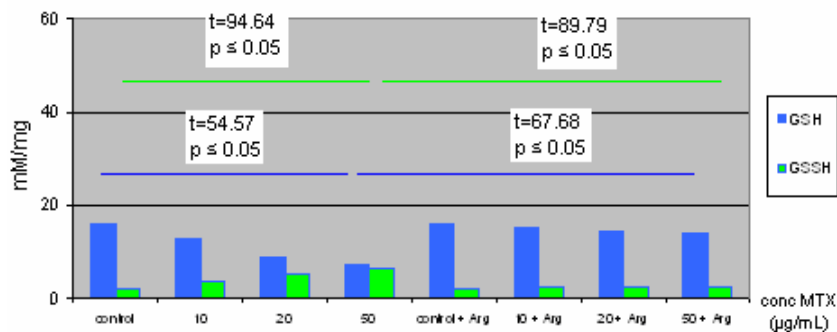


Fig. 8-2 Efectul diferitelor concentrații de MTX sau combinate cu L-arginina asupra nivelului GSH și GSSH în culturi de celule renale de șobolan.

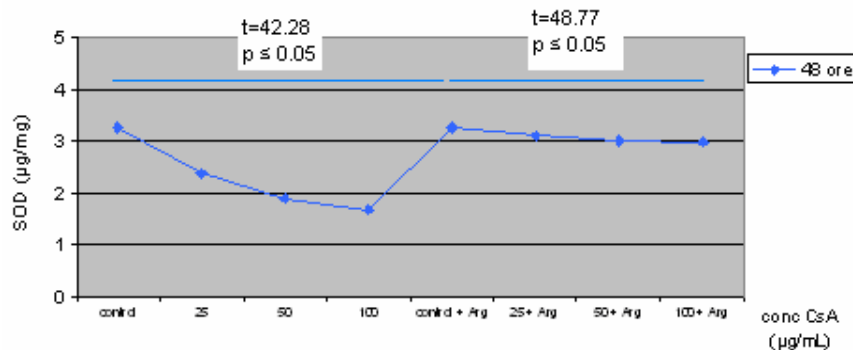


Fig. 8-3 Nivelul SOD în culturi de celule renale de șobolan expuse la diferite concentrații de CsA sau combinate cu L-arginina.

Din aceste rezultate transpare ideea că CSA și MTX afectează sistemele de apărare antioxidantă și că L-arginina poate antagoniza efectele secundare ale celor două medicamente asupra celulelor renale.

Rezultatele noastre cu privire la efectele CsA și a MTX asupra principalelor sisteme de apărare antioxidantă (GSH și SOD) ne conduc la ideea că stresul oxidativ indus de aceste două medicamente poate fi un mecanism al nefrotoxicității CsA și MTX, iar tratamentul combinativ cu L-arginină a avut efecte benefice, restabilind valorile normale pentru GSH și SOD.

O altă moleculă țintită de noi a fost monoxidul de azot (NO) care este o moleculă semnal în calea de semnalizare a stresului oxidativ și a morții celulare. În concentrații mari, NO este o specie reactivă de oxigen pentru că reacționează cu O₂ și formează peroxinitritul care este extrem de reactiv. Radicalul NO este foarte instabil; el se oxidează rapid în cationul nitrozonium (NO⁺) care este reactiv stabil în soluții apoase și extrem de reactiv cu compușii nucleofili sau cu alți oxizi de azot. Nivelul lui a fost determinat prin valoarea nitriților din mediul de cultură. Tratamentul celulelor cu CsA și MTX a fost urmat de o scădere semnificativă a NO ($p \leq 0.05$), iar tratamentul cu ACV a determinat o ușoară expresie crescută, dar statistic semnificativă (fig.8-4). Co-tratamentul cu L-arginină a culturilor expuse la CsA, MTX și ACV pentru 48 de ore a rezultat în restabilirea producției de NO.

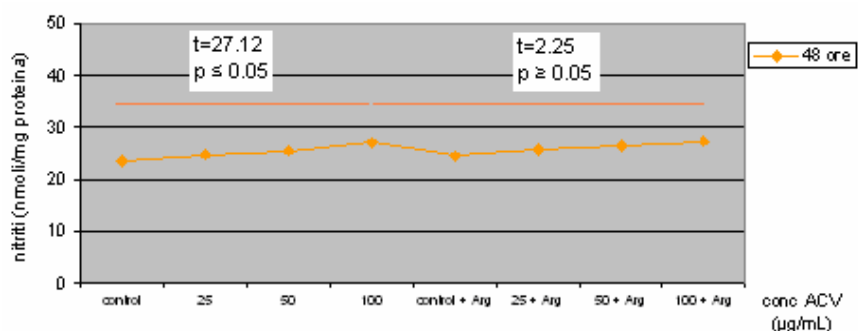


Fig. 8-4 Concentrația nitriților în culturi de celule renale de șobolan expuse diferite concentrații de ACV sau combinate cu L-arginina.

Scăderea concentrației de NO intracelular de către CsA și MTS poate explica scăderea volumului urinar ca urmare a vasoconstricției glomerulare, iar creșterea concentrației NO sub acțiunea ACV poate explica creșterea volumului urinar/24 de ore ca urmare a vasodilatației glomerulare.

Aceste rezultate sugerează că stresul oxidativ poate fi implicat în mecanismul molecular care stă la baza nefrotoxicității CsA și MTX. Mecanismul nefrotoxicității ACV nu poate fi explicat prin prisma stresului oxidativ.

Stresul oxidativ fiind puternic asociat cu senescența, am vizualizat și activitatea β -galactozidazei (β -Gal), un marker biochimic al senescenței replicative, iar celulele β -Gal pozitive au fost exprimate procentual. Celulele tratate cu CsA, MTX (fig. 8-5) și ACV au etalat activitate β -Gal la toate concentrațiile și la toți timpii de tratament.

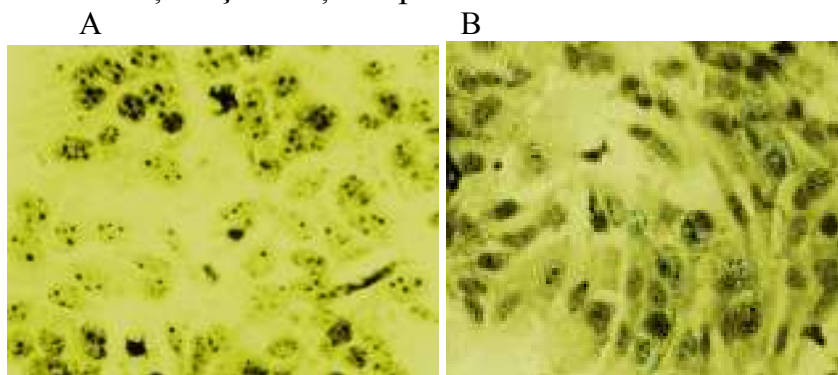


Fig. 8-5 Prezența celulelor senescente β -Gal+ în culturi de celule renale. Control (A), tratat cu MTX (B). Mărire X20.

Frecvența celulelor senescente a fost direct proporțională cu concentrația și cu durata de tratament și invers proporțională cu frecvența mitotică determinată din relația $[(\text{Nr. celule în diviziune}/\text{Nr. total de celule numărate}) \times 100]$.

În timp ce frecvența celulelor β -Gal pozitive crește (în cazul CsA - fig.8-6), frecvența celulelor în diviziune scade (fig.8-7), fapt ce demonstrează că odată cu creșterea concentrației medicamentului și a perioadei de tratament, tot mai multe celule își blochează diviziunea și tot mai puține celule își continuă diviziunea celulară.

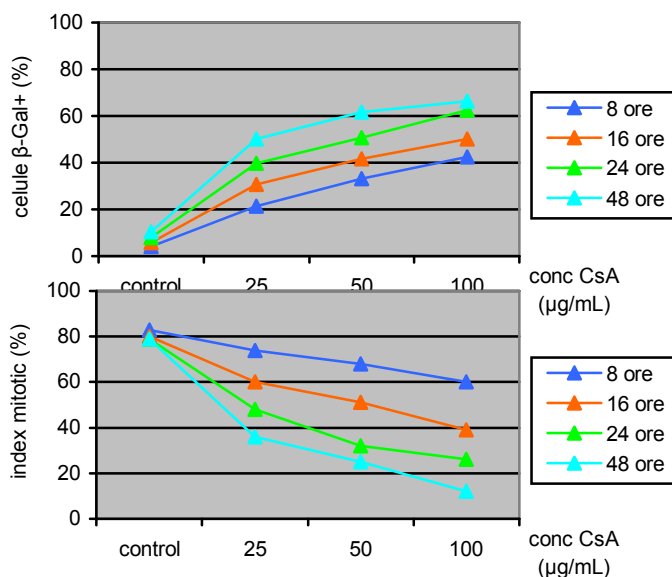


Fig. 8-6 Frecvența celulelor β-Gal pozitive în culturi de celule renale de șobolan, tratate cu CsA.

Fig. 8-7 Frecvența mitotică în culturi de celule renale de șobolan, tratate cu CsA.

Această blocare a diviziunii celulare este temporară, pentru că după întreruperea tratamentului, celulele își recapătă capacitatea de a se divide.

Pentru a demonstra că senescenta celulelor, indusă de CsA și MTX (fig. 8-8), se datorează stresului oxidativ, am efectuat un tratament combinativ al celulelor cu vitamina E (100 μg/mL) pentru 48 de ore de tratament. Urmărind frecvența celulelor β-Gal pozitive, am constatat că aceasta a diminuat semnificativ.

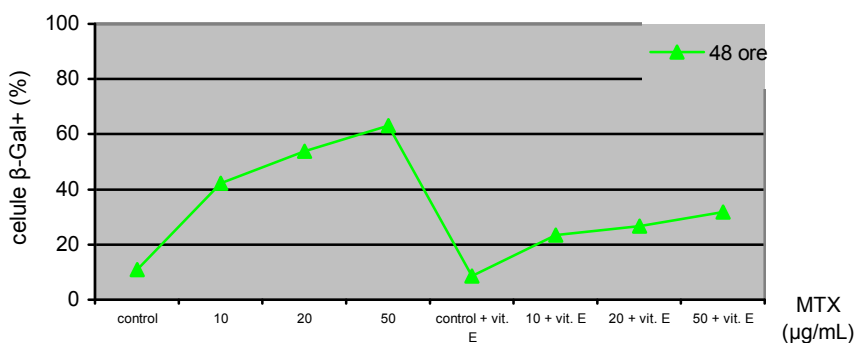


Fig. 8-8 Efectul vitaminei E asupra senescentei replicative induse de MTX după 48 ore de tratament.

Un mecanism celular care ar putea acționa ca un senzor al genomului pentru unele tipuri de modificări ale ADN este poli(ADP-ribozil)-polimeraza, o modificare post-translațională reversibilă a proteinelor nucleare, care este intim legată de apariția rupturilor catenelor de ADN și reprezintă un răspuns celular imediat la modificarea ADN indusă de medicamente.

Pentru a demonstra că PARP-1 intervine în senescenta replicativă, am tratat culturile pentru un interval de 48 de ore cu CsA și ANF (4 amino-1.8-naftalimid) (10 μg/mL) și am determinat activitatea β-gal. Frecvența celulelor β-Gal pozitive a scăzut semnificativ ($p \leq 0.05$) când celulele au fost supuse co-tratamentului cu

CsA și ANF (fig. 8-9). Rezultate similare au fost obținute și în cazul tratamentului combinativ al MTX și ACV cu ANF.

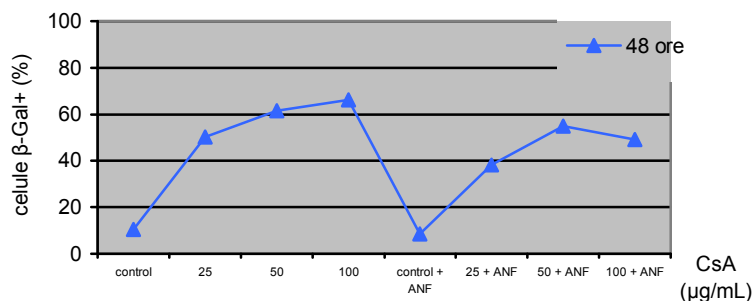


Fig. 8-9 Efectul ANF asupra senescentei replicative induse de CsA după 48 ore de tratament.

Pe baza rezultatelor noastre, coroborate cu datele din literatura de specialitate, noi sugerăm că stresul oxidativ indus de CsA și MTX reprezintă mecanism molecular al senescentei replicative (fig. 8-10).

Odată ce a pătruns în celule prin difuziune, CsA crește producția ROS, pe de o parte, și inhibă calcineurin-fosfataza (CnP), o proteină ubiquitară, pe de altă parte. ROS pot induce modificări ale ADN care activează PARP-1 și care, la rândul ei, activează transcripția proteinei p53 ce activează în unele celule transcripția genelor pro-apoptotice și în altele transcripția genei p21, principalul actor în declanșarea senescentei replicative. De asemenea, diminuarea Cu-SOD induce senescentă tot prin intermediul proteinei p53. Blocarea calcineurin-fosfatazei inhibă defosforilarea miozinei II și diviziunea celulelor este blocată. Este bine cunoscut faptul că medicamentele care blochează diviziunea sau care induc stres oxidativ determină intrarea celulelor în senescentă. Pe de altă parte, nivelul crescut al ROS determină în unele celule disfuncții mitocondriale care pot afecta sinteza de ATP. În condițiile în care concentrația celulară de ATP se menține constantă, celulele vor muri prin apoptoză iar când sinteza de ATP este mult diminuată, celulele vor muri prin necroză.

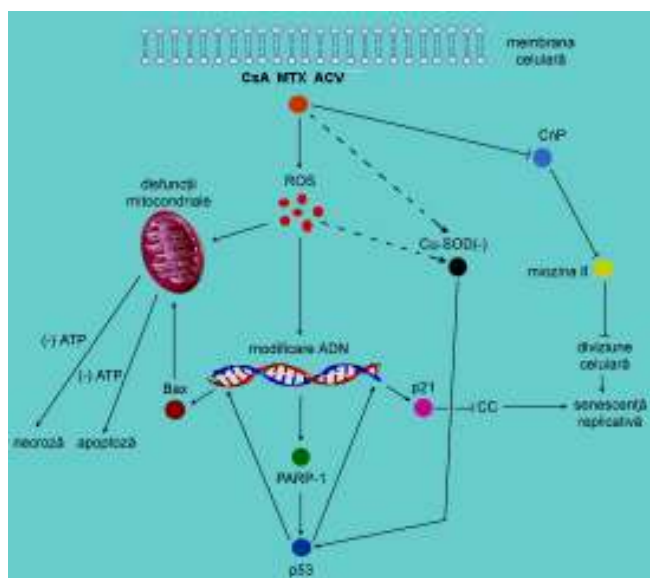


Figura 8-10 Un posibil mecanism molecular al senescentei induse de CsA, MTX și ACV în celule renale cultivate.

Deși în cea mai mare parte, mecanismul senescentei MTX se suprapune peste cel al CsA, există totuși unele diferențe în sensul că MTX poate induce stres oxidativ prin modificarea expresiei genelor care codifică sistemele de apărare antioxidante, iar CsA poate represa sistemele de apărare prin legarea ei directă la acestea cu care formează așa-numiții adductori. În schimb, mecanismul indus de ACV pare să fie diferit, el țintind direct ADN în care se inseră în timpul replicării acestuia, eveniment premergător diviziunii celulare. Cum el se poate insera în orice regiune, se poate insera în vecinătatea unor gene, care codifică diferite proteine implicate în controlul ciclului celular, inhibându-le transcripția și, în consecință, diviziunea celulară. Cum proteina p53 are un rol cheie atât în senescență cât și în apoptoză, mutațiile ADN activează proteina p53 care determină, pe de o parte, intrarea unor celule în senescență și a altora în apoptoză.

CONCLUZII GENERALE

Pe baza rezultatelor obținute se pot concluziona următoarele:

- 1) Tratamentul cronic al șobolanilor din rasa Wistar cu CsA, MTX și ACV a determinat nefrotoxicitate prin afectarea atât a funcției glomerulare cât și a funcției tubulare a rinichilor.
- 2) Tratamentul șobolanilor cu CsA, MTX și ACV a fost urmat de creșterea nivelului seric al creatininei și ureei. În toate experimentele efectuate, nivelurile creatininei și ureei au crescut într-o manieră dependentă de concentrație și de timpul de tratament.
- 3) Hidratarea animalelor (10 mL – gavaj) înainte de tratament a redus semnificativ ($p \leq 0.05$) potențialul nefrotoxic al medicamentelor, fapt ce sugerează importanța unui consum suplimentar de apă înainte de tratament.
- 4) Cele trei medicamente au indus o scădere semnificativă a ratei filtrării glomerulare ($p \leq 0.05$) și a creatininei urinare.
- 5) Restabilirea normală a parametrilor biochimici (creatinină și uree) cu L-arginină (100 $\mu\text{g/kg corp/zi}$) demonstrează capacitatea acestui aminoacid de a îmbunătăți funcția renală și posibilitatea de a fi utilizată ca o terapie adjuvantă ce poate ameliora efectele secundare ale agenților nefrotoxici.
- 6) Faptul că PGE_2 a avut efect benefic asupra funcției glomerulare afectate de cele trei medicamente poate sugera un efect al CsA, MTX și ACV asupra funcției de secreție a rinichilor.
- 7) Tratamentul combinativ al PGE_2 (10 $\mu\text{g/kg corp/zi}$) cu CsA, MTX și ACV ameliorează semnificativ ($p \leq 0.05$) RFG prin diminuarea efectului vasoconstrictor indus de cele trei medicamente.
- 8) CsA a indus semnificativ ($p \leq 0.05$) hipernatremie și hipopotasemie, MTX nu a modificat statistic semnificativ nivelul seric al acestor ioni ($p \geq 0.05$), iar ACV a provocat o scădere semnificativă ($p \leq 0.05$) a natremiei și potasemiei.

- 9) Tratamentul cu CsA și MTX a fost urmat de hipocalcemie și hipomagnezie (p ≤ 0.05), iar tratamentul cu ACV nu a modificat semnificativ nivelul calciului în sânge (p ≥ 0.05), în schimb a provocat scăderea semnificativă a magnezemiei (p ≤ 0.05).
- 10) Efectele CsA, MTX și ACV asupra nivelului seric al ionilor pot fi explicate prin acțiunea lor directă sau indirectă asupra proteinelor transmembranare implicate în reabsorbția tubulară, în principal, de la nivelul segmentelor proximale ale nefronilor și din ramul ascendent al ansei Henle.
- 11) CsA induce modificări funcționale tubulare (transport membranar) și vasculare (vasoconstricție) la concentrații mici și modificări structurale (fibroză tubulo-interstitală, microangiopatie și apariția hialinului la nivel glomerular/arteriole) la concentrații mari și tratament cronic. Electrono-microscopic, CsA provoacă vacuolizarea citoplasmei, dispunerea periferică a heterocromatinei și modificări severe ale organelor celulare.
- 12) MTX induce necroză tubulară, hipertrofierea glomerulului cu reducerea matrixului mezangial, iar ultrastructural, la concentrații mari, apare edematierea membranei celulare și nucleare, indentarea anvelopei nucleare și dezintegrarea cristelor mitocondriale.
- 13) ACV determină modificări histologice structurale și ultrastructurale ale țesutului renal numai la concentrații foarte mari și după formarea microcristalelor.
- 14) CsA, MTX și, în mică măsură ACV, induc apoptoza și necroza celulelor renale într-o manieră dependentă de concentrație și de timpul de tratament. Indexul apoptotic scade invers proporțional cu concentrația de MTX și cu durata tratamentului, apoptoza fiind înlocuită de necroză.
- 15) Apoptoza celulelor tubulare contribuie la patogeneza afecțiunilor renale.
- 16) Viabilitatea celulelor renale cultivate a scăzut într-o manieră dependentă de concentrația celor trei medicamente și de durata de tratament.
- 17) CsA și MTX au cauzat, în celulele renale cultivate de șobolan, o deteriorare marcată (p ≤ 0.05) a profilului endogen antioxidant, evidențiată prin diminuarea activității SOD și a GSH.
- 18) ACV nu a determinat modificări semnificative (p ≥ 0.05) ale sistemelor antioxidante (superoxid-dismutaza, glutatión).
- 19) CsA și MTX au diminuat semnificativ (p ≤ 0.05) producția NO în celulele renale cultivate și acest efect poate explica vasoconstricția arteriole renală, scăderea ratei filtrării glomerulare și scăderea volumului urinar.
- 20) ACV a determinat creșterea semnificativă (p ≤ 0.05) a producției de NO, fapt ce poate explica creșterea volumului urinar.
- 21) În cazul expunerii la CsA și MTX, co-tratamentul celulelor cu L-arginină (100 μg/mL mediu de cultură) a fost urmat de creșteri semnificative (p ≤ 0.05) ale glutatiónului redus (GSH), a activității SOD și a nivelului NO.

- 22) L-arginina nu a modificat semnificativ ($p \geq 0.05$) nivelurile GSH, SOD și NO în cultura tratată cu ACV.
- 23) CsA și MTX induc stres oxidativ, în timp ce ACV nu produce stres oxidativ.
- 24) Stresul oxidativ afectează, pe de o parte, funcțiile componentelor celulare, iar, pe de altă parte, ADN mitocondrial și nuclear, influențând pozitiv sau negativ expresia unor gene care codifică proteine ale căilor apoptozei și senescentei replicative.
- 25) Toate cele trei medicamente, CsA, MTX, ACV, țintesc calea senescentei replicative. Activitatea β -galactozidazei a fost crescută într-o manieră dependentă de concentrație și de timpul de tratament.
- 26) Vitamina E a diminuat procentul celulelor β -Gal pozitive, fapt ce demonstrează că stresul oxidativ generat de CsA și MTX induce modificări la nivelul ADN, stimulând activarea genelor implicate în senescență.
- 27) Prin urmare, CsA nu induce direct senescența, ci indirect prin intermediul stresului oxidativ. MTX induce senescența atât direct prin țintirea ADN, cât și indirect prin intermediul ROS, iar ACV induce senescența replicativă prin țintirea directă a replicării ADN.
- 28) Co-tratamentul celulelor cultivate cu 4-amino-1,8-naftalimid (ANF), un inhibitor al PARP-1 (poly ADP-ribose polymerase -1), un senzor al leziunilor ADN, a fost urmat de diminuarea numărului de celule β -Gal pozitive, demonstrându-se astfel implicarea PARP-1 în senescența indusă de CsA, MTX și ACV.
- 29) Senescența celulară indusă de CsA ar putea explica fibroza interstițială a rinichiului prin modificarea expresiei genelor, iar apoptoza celulelor renale ar putea genera atrofia tubulară fără anomalii glomerulare majore prin declinul raportului celule vii/moarte.
- 30) Mecanismul molecular al citotoxicității renale induse de CsA și MTX este stresul oxidativ generat de producția crescută a speciilor reactive de oxigen prin diminuarea sistemelor de apărare anti-oxidante. Apoptoza și senescența celulară sunt răspunsuri ale celulelor la stresul oxidativ.
- 31) Mecanismul molecular care stă la baza nefrotoxicității ACV este senescența celulelor renale, apărută ca răspuns la blocarea ciclului celular, prin efectul inhibitor asupra ADN polimerazei.
- 32) Deși mecanismele de acțiune ale celor trei medicamente sunt foarte diferite, mecanismul nefrotoxic al celor trei medicamente se suprapune cel puțin parțial.
- 33) ACV este nefrotoxic, dar la concentrații foarte mari ($\geq 1\text{g/kg corp/zi}$), în schimb CsA și MTX sunt nefrotoxice și la concentrații inferioare (100 mg/kg corp/zi , respectiv 1.5 mg/kg corp/zi).

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Adler SG, Weening JJ, A Case of Acute Renal Failure, *Clin J Am Soc Nephrol* (2006), 1: 158–165.
2. Amudha G, Josephine A, Mythili Y, Sundarapandiyar R, Varalakshmi P., Therapeutic efficacy of dl-alpha-lipoic acid on cyclosporine A induced renal alterations. *Eur J Pharmacol.* (2007), 571(2-3):209-14
3. Badagnani I., Castro RA., Taylor TR., Brett CM., Huang CC., Stryke D., Kawamoto M., Johns SJ., Ferrin TE., Carlson EJ., Burchard EG., Giacomini KM., Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants. *J Pharmacol Exp Ther* (2006), 318 (2): 521-529.
4. Blanton A., Nsaif R., Hercule H., Oyekan A., Nitric oxide/cytochrome P450 interactions in cyclosporin A-induced effects in the rat. *J Hypertens* (2006), 24 (9): 1865-1872.
5. Bledsoe G., Shen B., Yao Y., Zhang JJ., Chao L., Chao J., Reversal of renal fibrosis, inflammation, and glomerular hypertrophy by kallikrein gene delivery. *Hum Gene Ther.* (2006), 17 (5): 545-555.
6. Cetiner M., Sener G., Sehirli AO., Eksioglu-Demiralp E., Ercan F., Sirvanci S., Gedik N., Akpulat S., Tecimer T., Yegen BC., Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leucocyte death. *Toxicol Appl. Pharmacol.* (2005), 209 (1): 39-50.
7. Cetinkaya A., Kurutas EB., Bulbuloglu E., Kantarceken B., The effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced oxidative renal damage in rats. *Nephrol Dial Transplantation* (2007), 22 (1): 284-285.
8. Chander V., Chopra K., Effect of molsidomine and L-arginine in cyclosporine A nephrotoxicity: role of nitric oxide. *Toxicology* (2005), 207(3): 463-74.
9. Charlot J., Pretet J., Haughey C., Mougin C., Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) dissipations of wild type and mutated p53 epithelial cells. *Apoptosis* (2004), 9 (3): 333-343.
10. Cybulla M., Schaefer E., Weundt S., Ling H., Krober SM., Hovelborn U., Schandelmaier S., Rohrbach R., Neumann HP., Chronic renal failure and proteinuria in adulthood: Fabry disease predominantly affecting the kidneys. *Am J Kidney Dis.* (2005), 45 (5): e82-e89.
11. Damaschin C., Hertzog R., Ionescu L., Patrinochi B., Hertzog D., Niculina Mitrea, Apoptotic cell death in renal tissue of cyclosporine A - treated rats, *Farmacia* (2007), LV, 6: 703-709.
12. Damaschin C., Hertzog D., Hertzog R., Patrinochi B., Niculina Mitrea, Molecular mechanism of cyclosporine A-induced hepatotoxicity. *Farmacia* (2007), LV, 4: 396-403 .
13. Damaschin C, Hertzog D, Hertzog R, Activitatea beta-galactozidazei indusa de ciclosporina A, metotrexat si aciclovir, in culturi de rinichi de embrion de hamster: studiu comparativ, VIII-lea Congres Nat Farmacol, Terapeut, Toxicol (2007), Tg Mures, iunie 6-9.
14. Damaschin C, Hertzog R., Patrinochi B, Hertzog D., Apoptoza indusa de ciclosporina A in celulele tubulare renale la sobolan, *Revista Medicina Farmacie* (2007), Tg Mures, 53: 89.
15. Devrim E., Cetin R., Kilicoglu B., Erguder BI., Avci A., Durak I., Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Renal Failure* (2005), 27 (6): 771-773.
16. Dimri GP., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Raskelley C., Medrano EE., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995), 92 (20): 9363-9367.
17. Elli M., Söylemezoglu O., Erbas D., Bakkaloglu SA., Buyan N., Ozkaya O., Hasanoglu E., Plasma and urine nitric oxide levels in healthy Turkish. *Pediatric Nephrology* (2005), 20(11): 1605-1609.
18. François H., Facemire C., Kumar A., Andoly L., Koller B., Coffman T., Role of microsomal prostaglandin E-synthase in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* (2007), 18 (5): 1466-1475.
19. Gibson RJ., Bower JM., Cummins AG., Keefe DMK., Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p53/p21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. *Clin Exp Medicine* (2005), 4 (4): 188-195.
20. Gronroos M., Chen M., Jahnukainen T., Capitanio A., Aizman RI., Celsi G., Methotrexate induces cell swelling and necrosis in renal tubular cells. *Pediatr Blood Cancer* (2006), 46 (5): 624-629.
21. Hagar HH., Etter EE., Arafa M., Taurine attenuates hypertension and renal dysfunction induced by cyclosporine A in rats. *Clinical Exp Pharm Physiol.* (2006), 33 (3): 189-196.

22. Hatano E., Bradham CA., Stark A., Iimuro Y., Lemasters JJ., Brenner DA., The mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *J Biol Chem.* (2000), 275: 11814-11823.
23. Hertzog D., Damaschin C, Hertzog R., Efectul ciclosporine A asupra glicoproteinei P in culturi de rinichi de embrion de hamster, VIII-lea Congres Nat Farmacol Terapeut Toxicol (2007), Tg Mures, iunie 6-9.
24. Hertzog R, Marculescu M, Damaschin C, Patranichi B, Marculescu Z, Immunohistochemical expression of HIF-1 α in human enchondromas, Endothelial Cell and Tumor Angiogenesis Conference (2007), Timisoara, april 20-21.
25. Izzedine H., Launay-Vacher V., Karie S., Caramella C., de Person F., Deray G., Is low-dose methotrexate nephrotoxic? Case report and review of the literature. *Clin Nephrol.* (2005), 64 (4): 315-319.
26. Izzedine H, Launay-Vacher V, Isnard-Bagnis C, Deray G, Antiviral drug-induced kidney and electrolytes disorders. *Minerva Urol Nefrol.* (2003), 55(3): 157-72.
27. Izzedine H., Launay-Vacher V., deray G., Antiviral drug-induced nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis.* (2005), 45 (5): 804-817.
28. Jara A., Chacon C., Ibaceta M., Valdivieso A., Felsenfeld AJ., effect of ammonium chloride and dietary phosphorus in the azotaemic rat. I. Renal function and biochemical changes. *Nephrol Dial Transplant* (2004), 19: 1986-1992.
29. Jarad G, Cunningham J, Shaw AS, Miner JH., Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*^{-/-} mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. *J Clin Invest.* (2006), 116 (8): 2090-2093.
30. Jennings P., Koppelstaetter Ch., Aydin S., Abberger Th., Wolff AM., Mayer G., Pfaller W., Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2007), 293(3):F831-8.
31. Joy MS., Nিকেleit V., Hogan SL., Thompson BD., Finn WF., Calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and renal expression of P-glycoprotein. *Pharmacotherapy* (2005), 25 (6): 779-789.
32. Kanetsuna Y., Takahashi K., Nagata M., Gannon MA., Breyer MD., Harris RC., Takabashi T., Deficiency of endothelial nitric oxide synthase confers susceptibility to diabetic nephropathy in nephropathy-resistant inbred mice. *Am J Pathol.* (2007), 170: 1473-1484.
33. Kneuer C., Honscha KU., Honscha W., Rat reduced-folate carrier-1 is localized basolaterally in MDCK kidney epithelial cells and contributes to the secretory transport of methotrexate and fluoresceinated methotrexate. *Cell Tissue Res.* (2005), 320 (3): 517-524.
34. Kobayashi K, Terada C., Tsukamoto I., Methotrexate-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. *Eur J Pharmacology* (2002), 438 (1): 19-24.
35. Lassila M. Finckenberg P., Pere AK., Krogerus L., Ahonen J., Vapaatalo H., Nurminen ML., Comparison of enalapril and valsartan in cyclosporin A- induced hypertension and nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats on high-sodium diet. *British J Pharmacol* (2000), 130: 1339-1337.
36. Lea J, Green T, Hebert L, Lipkowitz M, Massry S, Middleton J, Rostand SG, Miller E, Smith W, Bakris GL, The relationship between magnitude of proteinuria reduction and risk of end-stage renal disease: results of the African-American study of kidney disease and hypertension. *J Am Soc Nephrol* (2005), 16: 3477-84.
37. Lessio C., de Assuncao SF., Gloria MA., Di Tommaso AB., Gori Mouro M., Di Marco GS., Schor N., Higa EM., Cyclosporine A and NAC on the inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide synthesis in rat renal artery cultured cells. *Kidney Int.* (2005), 68 (6): 2508-2516.
38. Liekens S., Gijsbers S., Vanstreels E., Daelemans D., De Clercq E., Hatse S., The nucleotide analog cidofovir suppresses basic fibroblasts growth factor (FGF2) expression and signaling and induces apoptosis in FGF2-overexpressing endothelial cells. *Mol Pharmacol* (2007), 71 (3): 695-703.
39. Liu DTL., Lee VYW., Lam PTH., Lam DSC., Acyclovir-induced nephrotoxicity in a patient with acute renal necrosis. *Hong Kong Med J.* (2007), 13 (2): 155-6.
40. Liu R, Carretero OA, Ren Y, Garvin J, Increased intracellular pH at the *macula densa* activates nNOS during tubuloglomerular feedback. *Kidney Int.* (2005), 67: 1837-1843.

41. Mahmud IM., Hussein Ael-A., Sarhan ME., Awad AA., El Desoky I., Role of combined L-arginine and prostaglandin E1 in renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Physiol.* (2007), 105 (4): 57-65.
42. Matlhagela K., Taub M., Prostaglandins regulate transcription by means of prostaglandin response elements located in the promoters of mammalian Na, K-ATP-ase beta 1 subunit genes. *Am NY Acad Sci. USA* (2006), 1091: 233-243.
43. Matlhagela K., Taub M., Regulation of the Na-K-ATP-ase beta 1-subunit promoter by multiple prostaglandin-responsive elements. *Am J Physiol renal Physiol.* (2006), 291 (3): F635-F646.
44. Melk A., Schmidt BM., Vongwiwatana A., Rayner DC., Lalloran PF., Increased expression of senescence-associated cell cycle inhibitor p16^{INK4a} in deteriorating renal transplants and diseased native kidney. *Am J Transplant* (2005), 5 (6): 1375-1382.
45. Müller A., Dairam A., limson JL., Santy D., Mechanisms by which acyclovir reduces the oxidative neurotoxicity and biosynthesis of quinolinic acid. *Life Sciences* (2006), 80 (10): 918-925.
46. Müller AC., Maharaj H., Maharaj DS., Daya S., Acyclovir protects against quinolinic-acid induced oxidative neurotoxicity. *J Pharm Pharmacol.* (2005), 57 (7): 883-888.
47. Nilakantan V., Zhou X., Hilton G., Roza AM., Adams MB., Johnson CP., Pieper GM., Hierarchical change in antioxidant enzyme gene expression and activity in acute cardiac rejection: role of inducible nitric oxide synthase. *Mol Cell Biochem.* (2005), 270 (1-2): 39-47.
48. Nilwarangkoon S., Anzai N., Shiraya K., Yu E., Islam R., Cha SH., Onozato ML., Miura D., Jutabha P., Tojo A., Kanai Y., Endou H., Role of mouse organic anion transporter 3 (mOAT3) as a basolateral prostaglandin E2 transport pathway. *J Pharmacol.* (2007), 103: 48-55.
49. Öktem F., Yilmaz RH., Ozguner F., Olgar S., Ayata A., Uzar E., Uz E., Methotrexate induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health* (2006), 22: 241-247.
50. Poele RH., Okorokov AL., Jardine L., Cummings J., Joel SP., DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* (2002), 62: 1876-1883.
51. Rezzani R., Buffoli B., Rodella L., Stacchiotti A., Bianchi R., Protective role of melatonin in cyclosporine A-induced oxidative stress in rat liver. *Intl Immunopharmacol.* (2005), 5 (9): 1397-1405.
52. Sener G., Eksioglu-Demiralp E., Cetiner M., Ercan F., Yegen BC., Beta-glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *Eur J Pharmacol.* (2006), 542 (1-3): 170-78.
53. Şener G., Demiralp EE., cetiner M., Ercan F., Şırvanci S., Gedik N., Yegen BC., L-carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leucocyte death. *Cell Biol Toxicol.* (2006), 22 (1): 47-60.
54. Silva FG, Chemical-Induced Nephropathy: A Review of the Renal Tubulointerstitial Lesions in Humans, *Tox Pathol* (2004), 32(2):71-84.
55. Tekin NS., Ilter N., Sancak B., Ozden MG., Gurer MA., Nitric oxide levels in patients with psoriasis treated with methotrexate. *Mediators Inflamm.* (2006), 3: 16043.
56. Tomomura M., Furuichi T., Apoptosis-associated tyrosine kinase (AATYK) has differential Ca²⁺-dependent phosphorylation states in response to survival and apoptotic conditions in cerebellar granule cells. *J Biol Chem.* (2005), 280, 42: 35157-63.
57. Toribio RE., Kohn CW., Romke KM., Levine AL., Rosol ThJ., Effects of hypercalcemia on serum concentrations of magnesium, potassium, and phosphate and urinary excretion of electrolytes in horses. *Am J Vet Res.* (2007), 68(5): 543-554.
58. Vadyiuk OB., Effect of caffeine and cyclosporin A on the transmembrane exchange of Ca ions in smooth muscle mitochondria. *Ukr Biokhim Zh.* (2005), 77(2): 88-93.
59. Van der Heijden JW., Dijkmans Ben AC., Sceper RJ., Jansen G., Drug insight: resistance to methotrexate and other disease-modifying antirheumatic drugs-from bench to bedside. *Nat Clin Practice Rheumatology* (2007), 3 (1): 26-34.
60. Widemann BC., Adamson PC., Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *The Oncologist* (2006), 11 (6): 694-703.
61. Xia C-F, Bledsoe G, Chao L, Chao J, Kallikrein gene transfer reduces renal fibrosis, hypertrophy, and proliferation in DOCA-salt hypertensive rats *Am J Physiol Renal Physiol* (2005), 289: F622–F631.