

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ

Јелена В. Малетић

**Евалуација генотоксичних ефеката и
патоморфолошких промена код
пацова након апликације
тулатромицина**

докторска дисертација

Београд, 2015.

BELGRADE UNIVERSITY
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Jelena V. Maletić

**Evaluation of genotoxic effects and
pathomorphological in rats after
application of tulathromycin**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

Ментор:

др Нинослав Ђелић, редовни професор, Факултет ветеринарске медицине,
Универзитет у Београду

др Невенка Алексић, редовни професор, Факултет ветеринарске медицине,
Универзитет у Београду

Чланови комисије:

др Зоран Станимировић, редовни професор, Факултет ветеринарске медицине,
Универзитет у Београду

др Владимир Кукољ, доцент, Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у
Београду

др Биљана Спремо-Потпаревић, редовни професор, Фармацеутски факултет,
Универзитет у Београду

Датум одбране:

Свесрдно захваљујем свима онима који су помогли и свима онима који су одмogli да се ова докторска дисертација приведе крају.

Изразито захваљујем мојим менторима, проф. др Нинославу Ђелићу и проф. др Невенки Алексић који су својом стручношћу, знањем и безрезервном подршком умногоме допринели квалитету ове тезе.

Посебно захваљујем проф. др Зорану Станимировићу на корисним саветима и сугестијама током израде ове дисертације.

Доценту Владимиру Кукољу, захваљујем на изуетној сарадњи и помоћи и корисним саветима.

Изразито захваљујем др Милени Радаковић на сарадњи и помоћи у делу који се односи на генотоксиколошка истраживања.

Захваљујем мојој породици, оцу, мајци и брату који су све ове године веровали у мене и бодрили ме да истрајем у постизању свих циљева. Хвала Вам што сте били увек ту за мене.

*Мом супругу Милану,
ћерки Ленки и Мили и будућим потомцима*

САДРЖАЈ

СПИСАК ТАБЕЛА И ГРАФИКОНА

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. Макролидни антибиотици	3
2.1.1. Тулатромицин	6
2.2. Нежељена дејства макролидних антибиотика	9
2.2.1. Нежељена дејства тулатромицина	12
2.3. Значај тестирања лекова на генотоксичност	14
2.4. Реактивне врсте кисеоника, оксидативна оштећења ДНК и могуће последице	16
2.5. Улога комет теста у детекцији и евалуацији оксидативних оштећења ДНК	19
2.5.1. Примена антиоксиданаса у комет тесту	21
2.5.2. Примена инхибитора репарације ДНК приликом извођења комет теста	22
2.6. Значај патохистолошког налаза у евалуацији безбедности примене лека	23
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА	25
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	26
4.1. Генотоксиколошка испитивања	26
4.1.1. Материјал	26
4.1.2. Изолација лимфоцита пацова и третман	27
4.1.3. Одређивање броја и вијабилности ћелија	28
4.1.4. <i>In vitro</i> комет тест	28
4.1.5. Анализа података	29
4.1.6. Статистичка обрада података комет теста	30
4.2. Животиње и дизајн експеримента	31
4.3. Патохистолошка анализа	32
5. РЕЗУЛТАТИ	33
5.1. Ефекат тулатромицина на оштећења ДНК у комет тесту	33
5.2. Ефекат тулатромицина на оштећења ДНК у присуству инхибитора репарације	36
5.3. Утицај тулатромицина на оштећења ДНК у присуству каталазе	38

5.4. Резултати макроскопског прегледа органа и патохистолошког прегледа узорака ткива унутрашњих органа	42
5.4.1. Макроскопски налаз на унутрашњим органима	42
5.4.2. Патохистолошки налаз	43
6. ДИСКУСИЈА	59
6.1. Генотоксични ефекти тулатромицина код пацова	60
6.2. Патоморфолошке промене код пацова након апликације тулатромицина	63
7. ЗАКЉУЧЦИ	66
8. ЛИТЕРАТУРА	68

РЕЗИМЕ

Евалуација генотоксичних ефеката и патоморфолошких промена код пацова након апликације тулатромицина

Примена антибиотика у хуманој и ветеринарској медицини праћена је појавом резистенције бактерија, због чега се непрекидно ради на развоју нових антимикуробних лекова. Неопходно је да антибиотици, поред тога што имају одговарајући спектар дејства, не испољавају значајније токсичне и генотоксичне ефекте.

Циљеви овог истраживања били су да се испитају генотоксични ефекати тулатромицина на изолованим лимфоцитима пацова применом *in vitro* Комет теста, као и проучавање карактера и степена патоморфолошких промена у органима (јетра, бубрег, срце, тестиси и плућа) након супкутане (s.c.) апликације лека пацовима соја Wistar.

У комет тесту се користило седам експерименталних концентрација тулатромицина (у распону од 1-100 μM), при чему је утврђено да највише концентрације (50 μM и 100 μM) тулатромицина доводе до генотоксичних ефеката тако што значајно повећавају ниво ДНК оштећења у поређењу са негативном контролом.

Са циљем испитивања способности ћелија да поправе оштећења ДНК настала дејством тулатромицина, изведен је ко-третман са два ДНК инхибитора репарације: хидроксиуреа (HU) и цитозин арабинозид (AraC). Утврђено је да нема значајне разлике између ефеката третмана са самим тулатромицином и третмана са инхибиторима, што значи да тулатромицин у лимфоцитима пацова не изазива оштећења ДНК молекула која се могу поправити ћелијским механизмима репарације.

Као додаток, изведен је ко-третман са каталазом са циљем да се утврди да ли је ОН[•] индуковао оштећења ДНК молекула. Утврђено је да каталаза не редукује оштећења ДНК настала дејством тулатромицина, што указује на то да каталаза не испољава протективни ефекат у овом случају.

Ради утврђивања степена и карактера патоморфолошких промена у органима (јетра, бубрег, срце, тестиси и плућа), спроведено је истраживање на пацовима који су свакодневно током десет дана добијали тулатромицин s.c. у различитим дозама: терапијској дози (2,5 mg/kg) – група E1, дозама које су три (7,5 mg/kg) – група E2, десет (25 mg/kg) – група E3 и тридесет (75 mg/kg) – група E4 пута веће од терапијске. Десетог дана огледа и 14 дана након завршетка огледа, извршена је обдукција животиња, детаљан макроскопски преглед унутрашњих органа и узети су узорци ткива поменутих органа ради патохистолошког прегледа.

Утврђено је да тулатромицин примењен у највишој дози (75 mg/kg) субкутано током десет дана доводи до значајних некротичних промена на кожи пацова. Такође је утврђено да тулатромицин примењен у испитиваним дозама (2,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 25 mg/kg и 75 mg/kg) доводи до едема, вакуоларне дегенерагације и некрозе ћелија, хиперемие крвних судова, хијалинизације и вакуолизације зида крвних судова, хеморагија по интерстицијуму на унутрашњим органима (јетра, бубрези, срце, плућа и тестиси) код пацова. Резултати нашег истраживања указују на то да хистопатолошке промене на унутрашњим органима (јетра, бубрези, срце, плућа и тестиси) остају и две недеље након апликације, односно да не долази до процеса репарације у том периоду.

Кључне речи: тулатромицин, генотоксичност, комет тест, инхибитори репарације, каталаза, патохистолошке промене

Научна област и ужа научна област:

Генатика, генотоксикологија

Патолошка морфологија

УДК број: 619:616/618:577.21

ABSTRACT

Evaluation of genotoxic effects and pathomorphological changes in rats after application of tulathromycin

The use of antibiotics in human and veterinary medicine is accompanied by the emergence of bacterial resistance, which is constantly working on the development of new antimicrobial drugs. It is essential that antibiotics, in addition to having the appropriate range of effects, do not show significant toxic and genotoxic effects.

The objectives of this study were to investigate the genotoxic effects of tulathromycin in isolated rat lymphocytes using *in vitro* Comet assay, as well as the character and degree of pathological changes in the organs (liver, kidney, heart, lung, and testes) after subcutaneous (s.c.) application of the drug to rats Wistar strain.

The Comet assay is used seven experimental concentration of tulathromycin (ranging from 1-100 μM), and it was found that the highest concentrations (50 μM and 100 μM) of tulathromycin cause genotoxic effects by significantly increasing the level of DNA damage in comparison with the negative control.

To test the ability of cells to repair DNA damage caused tulatromycin fact, we performed co-treatment with two inhibitors of DNA repair: hydroxyurea (HU) and cytosine arabinoside (AraC). It has been found that there is no significant difference between the effects of treatment with a treatment with tulathromycin and inhibitors, which means that in lymphocytes of rats tulatromycin does not cause damage to the DNA molecules that can be fixed by the cell repairation mechanisms.

In addition, we performed co-treatment with catalase, in order to determine whether the $\text{OH}\cdot$ induced damage to DNA molecules. It was found that catalase did not reduce the effect of DNA damage caused by tulathromycin, which indicates that catalase does not exhibit a protective effect in this case.

In order to determine character and degree of pathological changes in the organs (liver, kidney, heart, lung, and testes), we performed the investigation on rats that received daily tulatromycin s.c. during ten days in different doses: therapeutic dose (2.5 mg / kg) -

group E1, three times doses (7.5 mg / kg) - a group of E2, ten (25 mg / kg) - a group E3, and thirty (75 mg / kg) - group E4 times exceeding therapeutic. On the tenth day of the trial and 14 days after the end of the experiment, we performed the autopsy of animals, detailed macroscopic examination of internal organs and tissue samples were taken in order to do histological examination.

It was found that tulatromycin applied in the highest dose (75 mg / kg) subcutaneously over the ten days leading to significant necrotic areas on the skin of rats. It was also found that tulatromycin applied at tested doses (2.5 mg / kg, 7.5 mg / kg, 25 mg / kg and 75 mg / kg) leads to edema, vacuolar degeneration of the cells and necrosis, hyperemia of blood vessel, hyalinization and vacuolation of the wall of blood vessels, interstitial hemorrhage at the internal organs (liver, kidneys, heart, lungs and testes) in rats. The results of our study suggest that the histopathological changes in internal organs (liver, kidneys, heart, lungs and testes) remain and two weeks after the application, or that there is no process of repair in this period.

Keywords: tulathromycin, genotoxicity, Comet assay, inhibitor of DNA repair, catalase, histopathological changes.

Scientific field and narrower scientific fields:

Genetic, genotoxicology

Pathological morphology

UDC number: 619:616/618:577.21

1. УВОД

Здравствена заштита животиња представља корак у борби против болести са којима се суочавамо у хуманој медицини. Она обухвата ерадикацију и контролу зооноза, развој и контролу хигијене намирница, научни рад и едукацију становништва. Постоји више од сто до сада идентификованих зооноских болести, а адекватна употреба антибиотика у терапији животиња, ограничиће ризик преноса резистентних бактерија и код људи (Lathers, 2001). Задатак, између осталог, јесте и да се обезбеди квалитет производа анималног порекла (јаја, млеко, месо), односно да се обезбеде производи без присуства резидуа лекова који су коришћени у терапији (Muhammad и сар., 2009).

У циљу заштите и унапређења здравља људи донете су регулативе којима су прописани максимални ниви резидуа лекова примењених код животиња у производима анималног порекла (енгл. maximum residue level - MRL), затим нивои концентрације лекова при којима се не опажају нежељени ефекти код одређене врсте животиња (енгл. no observed adverse effect level - NOAEL), као и њихов прихватљиви дневни унос (енгл. acceptable daily intake - ADI). ADI представља максималну количину лека (изражену у mg/kg телесне масе) коју човек може да конзумира току дана, а да не доводи до нежељених реакција. Одређивање ADI укључује утврђивање ризика екстраполацијом са токсиколошких истраживања на лабораторијским животињама (Muhammad и сар., 2009). Међутим, због значајних разлика у резултатима микробиолошких и токсиколошких студија, за поједине антибиотике тешко је утврдити ADI (WHO, 2009).

Економски најзначајније болести код говеда, нарочито млађег узраста, јесу инфекције респираторног система, односно хронично респираторно обољење (Griffin, 1997; Taylor и сар., 2010). Лек првог избора против овог обољења је тулатромицин, релативно нов макролидни антибиотик (Wellman и сар., 2007). NOAEL за пса је 5 mg/kg, а токсиколошка ADI за конзументе производа пореклом од третираних животиња износи 0,05 mg/kg. Каренца за тулатромицин у Европи износи 49 дана за говеда и 33 дана за свиње (EMEA, 2005).

Имајући у виду да тулатромицин налази широку примену у ветеринарској пракси у нашој земљи, и како није ретка појава кршења прописа којима се уређује област хигијене намирница и поштовање каренце примењених лекова, али и недостатак литературе о генотоксичном потенцијалу и патолошким променама након примене високих доза тулатромицина, сматрали смо значајним да извршимо истраживање са овог аспекта на пацовима као експерименталним животињама.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Макролидни антибиотици

Макролидни антибиотици су једна од најчешће коришћених фамилија антибиотика за третман болести животиња чији се производи користе у исхрани људи. Сврставају се у веома значајне лекове за ветеринарску медицину (ОИЕ, 2007). Термин „макролиди“ користи се за опис лекова који у својој структури садрже лактонски макроциклични прстен који се састоји од 12 или више атома (Mazzei и сар., 1993). У ову класу једињења спадају различити биоактивни агенси, укључујући антибиотике, антимицотике, прокинетике и имуносупресивне лекове. Макролиди које се састоје од 14-, 15- и 16- атома чине фамилију антибиотика који имају широку употребу у хуманој и ветеринарској медицини (Bearden и сар., 1999). Јединствена структура макролида олакшава им брз прелазак из плазме у ткиво плућа, што их чини веома ефикасним у терапији респираторних обољења бактеријске етиологије (Amsden, 2001; Williams и Sefton, 1993).

Класификација. - Први макролидни антибиотик, еритромицин, изолован је 1952. године из продуката *Streptomyces erythreus*, док се прва генерација полусинтетских макролида, деривата еритромицина, азитромицин и кларитромицин, појавила на тржишту 1991. године (Alvarez-Elcoro и Enzler, 1999; Evans, 2005). У земљама чланицама Европске уније следећи макролидни антибиотици су одобрени за употребу у ветеринарској медицини: еритромицин (14-очлани прстен), гамитромицин и тулатромицин (15-очлани), спирамицин, тилдипирозин, тилмикозин, тилозин и тилвалозин (16-очлани) (ЕМЕА, 2011). Тулатромицин, регистрован за употребу код говеда и свиња, јесте полусинтетски макролид са три аминок групе, чија структура представља смешу двају изомера од којих један садржи тринаесточлани, а други петнаесточлани прстен.

Механизам и спектар дејства. - Макролиди се везују за V домен молекула 23S рибозомске РНК у 50S рибозомској субјединици осетљивих микроорганизама инхибирајући биосинтезу протеина. На тај начин, доводе до одвајања транспортне РНК од рибозома током транслокације (Alvarez-Elcoro и Enzler, 1999; Benchaoui и сар., 2004; Evans, 2005). Макролиди имају бактериостатско дејство, углавном

временски зависно (Giguère, 2006a), али и у одређеним концентрацијама и бактерицидно против неких бактеријских врста (Seral и сар., 2003).

Индикације. - Макролиди делују на узрочнике значајних инфекција људи и животиња, и то углавном на грам позитивне бактерије (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* и *Arcanobacterium pyogenes*), грам негативне бактерије (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* и *Campylobacter*), анаеробне бактерије (*Brachyspira*, *Fusobacterium*, *Bacteroides* и *Clostridium* врсте) и неке друге микроорганизме (*Lawsonia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Bordetella*, *Moraxella*, *Leptospira* и *Spirochaeta*) (Bryskier и сар., 2003).

Макролидни антибиотици испољавају антиинфламаторне ефекте, тако што инхибирају синтезу медијатора запаљења и цитокина (Ianago и сар., 2000). Активација неутрофилних гранулоцита у акутним стањима подстакнута макролидима, може да олакша убијање микроорганизама, док супресија хроничне инфламације, такође подстакнута макролидима, може ограничити оштећење респираторних путева. Једно истраживање је показало да макролиди иницијално повећавају производњу проинфламаторних цитокина, а затим убрзано нормализују њихову количину имуномодулаторним ефектом (Parnham и сар., 2005). Показано је да у ћелијама сисара, макролиди утичу на интрацелуларне митогеном активирани протеинске киназе (МАРК), нарочито на екстрацелуларне сигнал-регулисане киназе (ERK1/2) и NF-κB низводни пут ERK. Како су ови путеви укључени у многобројне ћелијске функције, као што су пролиферација ћелија, производња инфламаторних цитокина и секреција муцина, ефекат на ERK1/2 и NF-κB може објаснити већину имуномодулаторних ефеката макролида показаних до сада (Soichiro и сар., 2010). Реактивне кисеоничне врсте (ROS) препознате су као медијатори запаљења ћелија и ткива. Макролидни антибиотици су способни да инхибирају стварање ROS од стране неутрофилних гранулоцита (Cochrane, 1991) и овај ефекат зависи од времена инкубације (Levert, 1998). Истраживања показују да макролиди могу изазвати апоптозу активираних неутрофила (Aoshiba и сар., 1995; Inamura и сар., 2000).

Код људи, макролиди се углавном примењују у терапији респираторних инфекција, инфекција коже или инфекција гениталног тракта (Gilbert и сар., 2009).

Заједно са флуорохинолонима, третман су избора за лечење кампилобактериозе (Moss, 2003). Макролиди имају ограничену примену у лечењу инфекција изазваних врстама рода *Legionella* и мулти-резистентним врстама рода *Salmonella bongori* и *Salmonella enterica* (WHO, 2007).

Код животиња, макролидни антибиотици налазе широку примену у лечењу најчешћих обољења животиња чији се производи користе за људску употребу. Први макролид одобрен за примену код животиња био је спирамицин (раних 1960-их година), затим еритромицин и тилозин (раних 1970-их), па тулатромицин (2003), гамитромицин (2008) и тилдипирозин (2011). У већини земаља, свиње су идентификоване као основне циљне животиње за примену макролида. Главне индикације за њихову примену код свиња су пнеумоније, ентеритис и артритис, а код говеда инфекције респираторног и гениталног тракта, повреде папака и маститиси, док је код живине њихова примена индикована за респираторне инфекције и некротични ентеритис (ЕМЕА, 2011).

Фармакокинетика. - Макролидни антибиотици се добро распоређују по свим телесним течностима и ткивима. Хемијски представљају изразито липофилне слабе базе. Њихова активност значајно зависи од рН средине у којој се налазе (Bryskier, 2003), при чему оптималну активност испољавају у срединама чији је рН виши од 7. Најчешће се акумулирају у фагоцитима (Zhanel и сар., 2001; Evans, 2005; Kilgore и сар., 2005). Макролиди се не апсорбују у потпуности након оралне примене. Елиминишу се углавном преко јетре, делом у облику изворне супстанце, а делом у виду метаболита. Макролиди подлежу ентеро-хепатичном кружењу и имају дуго полувреме елиминације. Било да се примењују орално или парентерално, макролиди испољавају своје дејство и на микроорганизме у цревима (Giguère, 2006). Новооткривени полусинтетски макролиди имају веома низак клиренс. Тако полувреме елиминације тулатромицина код говеда и свиња око 4 дана, док је за гамитромицин код говеда око 2 дана. Макролиди се веома добро апсорбују са инјекционог места, и биолошка расположивост им је већа од 90 % (ЕМЕА, 2011).

Резистениција. - Природну резистенцију на макролидне антибиотике поседују бактерије које их и саме продукују - *Streptomyces*, као и друге бактерије које су природно резистентне на макролиде - *Mycobacterium tuberculosis* комплекс

(Andini и Nash, 2006), и неколико брзо-растућих микобактерија које носе јединствене *erm* гене (Nash и сар., 2006). Ентеробактерије, као што су *E. coli*, салмонеле и друге грам негативне бактерије, генерално су слабо осетљиве на макролиде (Vaara, 1993).

Стечена резистенција утврђена је код *Staphylococcus* spp. (Roberts, 2008; Zhanel и сар., 2001).

Бројни су радови који потврђују резистенцију разних врста бактерија рода *Brachyspira* на тилозин (Vyt и сар., 2006; Hidalgo и сар., 2009), као и резистенцију бактерија из фамилије *Pasteurellaceae* на тилозин, тилмикозин, спирамицин и еритромицин (Catry и сар., 2005; Gutierrez-Martin и сар., 2006; Kaspar и сар., 2007; AFFSA, 2009).

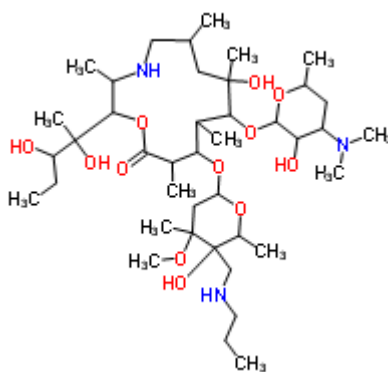
Веома је значајно поменути појаву резистенције зоонотских патогена, као што је *Campylobacter* spp., изолованих из животиња које се користе за исхрану људи. Међутим, сумњиви су резултати испитивања ризика утицаја *Campylobacter* spp. резистентних на макролиде на здравље људи. Код људи се макролидни антибиотици најчешће користе у третману инфекција узрокованих бактеријама које се не преносе храном. Међутим, резистенција на макролиде може се развити и код других бактерија које не потичу из хране анималног порекла, трансфером гена за резистенцију са једне на другу врсту бактерија (ЕМЕА, 2011).

2.1.1. Тулатромицин

Тулатромицин је једини припадник нове класе макролидна, триамилида, намењен искључиво за употребу у ветеринарској медицини. Ова група макролида развијена је са циљем да се побољша пенетрација лека у грам-негативне бактерије, чиме се повећава потенцијал његовог дејства.

Структура. - Тулатромицин је макролид чији прстен чине 15 атома и чија се једиствена хемијска структура одликује присуством три амино групе (слика 1). Свака амино група може постати позитивно наелектрисана, тако да молекула тулатромицина у раствору може носити до три позитивна наелектрисања. Молекуларна формула тулатромицина је $C_{41}H_{79}N_3O_{12}$. Структурно је сличан еритромицину, који је монобазан, и азитромицину, који је двобазан (Evans, 2005).

Активна форма тулатромицина у раствору је стабилна, уравнотежена смеша два макроциклина у односу 9:1, 15-чланог прстена азалида и 13-чланог прстена азалида, који се разликују по лактонским везама на C11 и C13 атомима (Nowakowski и сар., 2004; Venchaoui и сар., 2004).



Слика 1. Хемијска структура тулатромицина

(преузето са <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.26001683.html>)

Механизам и спектар дејства. - Упркос јединственој структури тулатромицина, његов механизам дејства против бактерија не разликује се од других макролида, и испољава се директном инхибицијом биосинтезе протеина након везивања за 50S рибозомску субјединицу и стимулацију раздвајања пептидил t-РНК од рибозома током транслокације, што доводи до инхибиције деобе ћелије и њене смрти (Kilgore и сар., 2005; Venner и сар., 2007; Wellman и сар., 2007). Тулатромицин се акумулира у полиморфонуклеарним леукоцитима и алвеоларним макрофагима, који учествују у имуном одговору на инфекцију у плућима и полако се отпушта у екстрацелуларни простор где директно делује на узрочнике респираторних инфекција (Evans, 2005; Kilgore и сар., 2005; Zhanel и сар., 2001). Познато је да макролидни антибиотици мењају функцију имунских ћелија, тако што утичу на инфилтрацију неутрофилних гранулоцита и ометају њихову способност секреције цитотоксичних једињења и проинфламаторних цитокина. Тулатромицин поспешује апоптозу неутрофилних гранулоцита активацијом каспазе-3 и смањује акумулацију леукотриена B₄ у плућима инфицираних животиња (Fischer и сар., 2011). Он такође инхибира секрецију CXCL-8 и индукује каспаза-3-зависну апоптозу неутрофилних гранулоцита, које

фагоцитију макрофаги говеда, што даље доводи до потпуне резолуције оштећеног ткива и спречавања развоја хроничног запаљења (Fischer и сар., 2013).

У Европској унији, тулатромицин је регистрован за лечење респираторних обољења говеда (BRD) изазваних следећим врстама *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni (Histophilus somnus)* и *Mycoplasma bovis*. Код свиња је регистрован за лечење респираторне болести свиња (SRD) у чијој етиологији учествују *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* и *Mycoplasma hyopneumoniae* осетљиве на тулатромицин (Evans, 2005).

Терапијска примена. - Тулатромицин је индикован и регистрован за лечење бактеријских респираторних обољења говеда и свиња. Даје се једнократно у дози од 2,5 mg/kg, супкутано код говеда, а интрамускуларно код свиња (Nowakowski и сар., 2004; Evans, 2005; Kilgore и сар., 2005; Nutsch и сар., 2005). Доказана је и његова ефикасност у лечењу ждребади са апсцесом плућа (Venner и сар., 2007; Scheuch и сар., 2007), као и респираторних болести коза (Washburn и сар., 2007; Young и сар., 2010; Clothier и сар., 2011; Romanet и сар., 2012) и кунића (Abo-El-Sooud и сар., 2012).

Фармакокинетика. - Постоји доста литературних података о фармакокинезици тулатромицина након супкутане примене код говеда (Evans, 2005; Gáler и сар., 2004; Nowakowski и сар., 2004) и интрамускуларне примене код свиња (Benchaoui и сар., 2004; Gáler и сар., 2004; Huang и сар., 2012; Wang и сар., 2012). Недавно су спроведена истраживања о ефикасности примене тулатромицина код коза (Young и сар., 2010; Clothier и сар., 2011; Romanet и сар., 2012) и ждребади (Scheuch и сар., 2007; Venner и сар., 2007). Показано је да се тулатромицин брзо апсорбује, и брзо и веома добро дистрибуира по ткивима, а затим акумулира у плућима у много вишој концентрацији него у плазми (Evans, 2005; Gáler и сар., 2004; Nowakowski и сар., 2004; Young и сар., 2010; Clothier и сар., 2011; Romanet и сар., 2012). Након супкутане примене код говеда, споро се елиминише из плућа, а полувреме елиминације износи осам дана (Nowakowski и сар., 2004). Биорасположивост тулатромицина код говеда већа је од 90% (Nowakowski и сар., 2004; ЕМЕА, 2005), а код свиња од 80%. Елиминише се готово непромењен, билијарном екскрецијом (Evans, 2005; ЕМЕА, 2005).

Каренца за тулатромицин која је одређена у Европи је 49 дана за говеда и 33 дана за свиње (ЕМЕА, 2005), док је у САД много краћа.

2.2. Нежељена дејства макролидних антибиотика

Антибиотици спадају у лекове који се најчешће примењују у ветеринарској медицини. Нажалост, могу да имају веома различите нежељене ефекте. Генерално се сматра да нежељени ефекти на биохемијском нивоу представљају индикаторе ефеката на патоморфолошком нивоу (Yazar и сар., 2004). Са аспекта бактеријске резистенције на антимикробне супстанце веома је занимљиво утврдити токсичност антибиотика на ћелије животињског организма. Сматра се да повећање резистенције делимично настаје услед повећања примењене дозе. Bitно је истаћи да је дозу могуће повећати само до одређене границе, јер више дозе доводе до токсичних ефеката. Међутим, ако токсичност лека није велика, са повећањем дозе може доћи до појаве бактеријске резистенције (Giguère и сар., 2006).

Макролидни антибиотици се релативно добро подносе, али могу имати и значајне нежељене ефекте. Најчешће су описани поремећаји функције гастроинтестиналног тракта (мучнина, повраћање, бол у трбуху, дијареја). Код људи, као нежељени ефекти након примене азитромицина у највећем броју случајева јављају се дијареја, бол у трбуху, мучнина, главобоља или вртоглавица и пролазни пораст активности трансаминаза у плазми (Норкинс, 1991). Приликом интравенске примене азитромицина забележен је бол на месту инјекције и локално запаљење (Garey и сар., 1999). Слични нежељени ефекти забележени су и након примене кларитромицина (Guay и сар., 2001). Поремећена функција јетре и леукоцитопенија ретко је забележена након примене кларитромицина (Eisenberg и сар., 1994). Након примене телитромицина код људи, као нежељени ефекти најчешће су запажени промећаји функције гастроинтестиналног тракта (дијареја, мучнина, повраћање, абдоминални бол), док клиничке студије са телитромицином указују на благо продужење QT- интервала, али не и код здравих одраслих особа (Demolis и сар., 2003).

Нешто ређи, али веома озбиљни, нежељени ефекти макролида су хепатотоксичност (Ег и сар., 2011), ототоксичност и кардиотоксичност (Anadon и сар., 1999; Abu-Gharbieh и сар., 2004; Ег и сар., 2011). Кардиотоксични лекови директно реагују са јонским каналима у срцу и на тај начин продужавају QT-интервал или доводе до појаве аритмија. Неки макролидни антибиотици (еритромицин, кларитромицин, азитромицин, телитромицин) понекад могу довести до продужења QT- интервала (Daihong и сар., 2010). Кардиотоксичност је често запажана приликом прекомерне примене одређених лекова као и код третмана пацијената са већ поремећеном кардиоваскуларном функцијом (O'Brien, 2008). Фактори ризика за испољавање овог нежељеног ефекта макролидних антибиотика су: велика старост и присуство обољења срца код пацијента, затим висина дозе и брзина апликације лека (Daihong и сар., 2010).

Није у потпуности објашњено на који начин макролидни антибиотици доводе до оштећења јетре. Сматра се да настаје услед цитотоксичног дејства макролида и хиперсензитивности организма на ову групу лекова (Periti и сар., 1993). Способност макролидних антибиотика да доведу до оштећења ћелијске мембране и последично наруше њену функцију, сматра се основним механизмом хепатоцелуларног оштећења (Dujovne, 1978). Хидрофобни макролиди садрже *N*-диметиламино групу која може да се метаболише до нитрозоалкана, који су даље способни да се ковалентно вежу за сулфидрил групу протеина и доведу до оштећења јетре (Periti и сар., 1992; Periti и сар., 1993). Поред тога, стварање нитрозоалкана, метаболита пореклом од макролида, изгледа да је повезано са њиховим хепатотоксичним потенцијалом (Pessayre и сар., 1985; Franklin, 1991; Periti и сар., 1993). Показано је да азитромицин у дози од 5,6 mg/kg код пацова доводи до благе перипорталне инфилтрације моноклеарним ћелијама, док у дози од 11,2 mg/kg до хиперемije синусоидних капилара и крвних судова порталних подручја са благом инфилтрацијом моноклеарним ћелијама (Olayinka и сар., 2013). У истом истраживању установљене су протеинске формације у лумену тубула бубрега након примене азитромицина у дози од 5,6 mg/kg код пацова, док је доза од 11,2 mg/kg довела до изражене конгестије и хеморагија у кортексу бубрега, као и образовања протеинских формација у лумену тубула (Olayinka и сар., 2013).

Резултати истраживања Xiugong и сарадника (2011) указују на могућност појаве нежељених ефеката макролидних антибиотика на респираторни систем ако се примењују у високим дозама током дужег временског периода. Наиме, долази до повећаног стварања ексудата у трахеи, некрозе епитела и инфилтрације неутрофилних гранулоцита.

Цитотоксичност макролидних антибиотика испитивана је у истраживању на хуманој ћелијској линији јетре – *Chang liver cell line* (CCL 13) уз помоћ МТТ теста (колориметријски тест за одређивање вијабилности ћелија). Процена цитотоксичних ефеката вршена је на основу способности ћелија да редукују МТТ. Еритромицин се показао као најтоксичнији, затим рокситромицин и кларитромицин, а као најмање токсичан азитромицин (Viluksela и сар., 1996). Ранија истраживања су потврдила да је цитотоксичност макролида дозно-зависна (Otoguro и сар., 1991). Fülörová и сарадници спровели су истраживање са циљем да се утврди цитотоксичност тилмикозина, тилозина и спирамицина на различите ћелијске културе (*VERO* ћелије - ћелије бубрега *Macacus rhesus*, *FE* ћелије - ембрионалне ћелије мачака и *BHK 21* ћелијска линија пореклом од бубрега младих хрчака) *in vitro*. Утврђено је да су *BHK 21* ћелије најосетљивије на поменуте лекове, примењене у нижим концентрацијама, док се значајно смањење виталности *VERO* ћелија запажено тек при вишим концентрацијама. Микроскопским прегледом потврђено је да у вишим концентрацијама макролиди доводе до промене морфологије и деструкције ћелија (Fülörová и сар., 2012).

Познато је да макролидни антибиотици могу довести до оксидативног стреса (Yazar и сар., 2004; Kumar и сар., 2008). Оксидативни стрес, представља статус дисбаланса организма, када оксидативни процеси успеју да надвладају антиоксидативне механизме заштите. Ово стање може бити један од главних фактора у патогенези разних обољења респираторног тракта. Реактиве кисеоничне врсте јесу нестабилни молекули који садрже кисеоник и способни су да реагују са другим молекулима као акцептори електрона или водоника. Они настају као производ нормалног метаболизма ћелије и имају значајну улогу у преношењу ћелијских сигнала и хомеостази (Park и сар., 2009). Резултат прекомерне производње реактивних кисеоничних врста доводи до оксидативног стреса. Овај статус дисбаланса оксиданата и антиоксиданата може проузроковати

поремећај оксидације протеина, ДНК и липида. Плућа су нарочито осетљива на оксидивни стрес. Оксидативни стрес може довести до запаљења респираторних путева (активацијом транскрипционих фактора - нуклеарни фактор-капа В и активног протеина-1) што доводи до даљег развоја оксидативног стреса (Oliveira и сар., 2013).

Малондиалдехид (MDA) настаје оксидативном разградњом, као производ реактивних кисеоничних врста и представља индикатор липидне пероксидације (Neilsen и сар., 1997). Глутатион пероксидаза катализује глутатион зависну редукцију водоник пероксида или липидне пероксида (Chan и сар., 1994). Тилмикозин смањује активност или синтезу срчане супероксид дисмутазе и глутатион пероксидазе и не доводи до липидне пероксидације у срцу (Yazar и сар., 2002). Међутим, у једном истраживању, показано је да при вишим дозама, тилмикозин статистички значајно повећава концентрацију малондиалдехида и глутатиона у јетри. С обзиром да се макролидни антибиотици метаболишу у јетри, постоји могућност да је током спровођења овог огледа, тилмикозин достигао високе концентрације у јетри, изазвао одређена оштећења и довео до пораста наведених ензима (Yazar и сар., 2004). Недавно истраживање са азитромицином указује да азитромицин у дози од 5,6 mg/kg и 11,2 mg/kg значајно смањује активност супероксид дисмутазе и каталазе, као и активност глутатион-S-трансферазе у јетри пацова. Том приликом забележен је значајан пораст концентрације малондиалдехида јетре, продукта липидне пероксидације, као и смањење концентрације глутатиона, важног антиоксиданта у организму (Olayinka и сар., 2013).

2.2.1. Нежељена дејства тулатромицина

Поред антимикробног дејства, тулатромицин поседује и антиинфламаторне и имуномодулаторне особине. Он поспешује апоптозу неутрофилних гранулоцита активацијом каспазе-3 и смањује акумулацију леукотријена В₄ у плућима инфицираних животиња (Fischer и сар., 2011). Резултати истраживања указују да тулатромицин инхибира секрецију CXCL-8 и индукује каспаза-3-зависну апоптозу неутрофилних гранулоцита и њихову фагоцитозу од стране макрофага

код говеда, што даље доводи до потпуне резолуције оштећеног ткива и спречавања развоја хроничног запаљења (Fischer и сар., 2013).

Токсичност тулатромицин је умерена, јер он може да доведе до умерених гастроинтестиналних поремећаја и одређених патоморфолошких промена на унутрашњим органима циљних врста, свиња и говеда (ЕМЕА, 2005).

Ређи нежељени ефекти макролида су хепатотоксичност, ототоксичност и кардиотоксичност (Anadon и сар., 1999; Abu-Gharbieh и сар., 2004). Кардиотоксичност је доказана и приликом примене тулатромицина у дозама које су више пута веће од терапијске. Тако тулатромицин апликован у дозама 5 и 6 пута већим од терапијске доводи до мултифокалних дегенеративних промена на миокарду. Подаци указују да дозе веће од 10 mg/kg телесне масе доводе до значајног повећања креатин фосфокиназе и лактат дехидрогеназе код телади (ЕМЕА, 2004). Такође је показано да доза од 10 mg/kg телесне масе доводи до значајног повећања концентрације серумског тропонина I (TnI) и изоензимске форме креатин киназе (СК-МВ), специфичних маркера оштећења срца код кунића (Ег и сар., 2011), док доза од 12,5 mg/kg и 25 mg/kg доводи до значајног повећања концентрације креатин киназе код коза (Washburn и сар., 2007; Clothier и сар., 2010). Кардиотоксичност тулатромицина вероватно настаје услед блокаде K^+ канала у срцу (Ег и сар., 2011).

Утврђено је да тулатромицин доводи до иритиса, реверзибилног конјуктивитиса и непрозирности рожњаче код кунића, па се сматра окуларним иритантом код ове врсте животиња (ЕМЕА, 2004).

Показано је да оброци у које је додат тулатромицин у дозама 2, 6 и 10 већим од терапијске, доводе до значајног повећања концентрације аспартат аминотрансферазе, алкалне аминотрансферазе, алкалне фосфатазе, гама-глутамил трансферазе, албумина, уреје, натријума и фосфора у крви код прасади. Како се вредности наведених параметара враћају на нормалне две недеље након третмана, закључено је да тулатромицин примењен у наведеним дозама доводи до благог оштећења функције јетре. Наведене дозе такође су довеле до повећања телесне масе и телесне температуре третираних животиња (Zhihui Нао и сар., 2012). Токсиколошка истраживања на пацовима показала су да тулатромицин примењен

у високим дозама доводи до значаног смањења уноса хране, прираста и телесне масе (ЕМЕА, 2004).

Тулатромицин може да изазове оксидативни стрес и поремећаје коагулације, јер доводи до повећања малондиалдехида, оксида нитрата, супероксид дисмутазе и креатин киназе (СК-МВ), али и до смањења концентрације антитромбина III (АТ) код кунића, у дози која је четири пута већа од терапијске (Ег и сар., 2011).

Генотоксични потенцијал тулатромицина испитиван је различитим *in vivo* (микронуклеус тест на пацовима) и *in vitro* тестовима (Ејмсов тест, тест генских мутација на HGPRT локусу СНО ћелија, тест хромозомских аберација на хуманим лимфоцитима). Резултати досадашњих анализа углавном указују да тулатромицин није генотоксичан (ЕМЕА, 2004). Међутим, праћењем садржаја ДНК у ћелијама, применом проточне цитометрије ради евалуације генотоксичности, Washburn и сар. (2007) показали су да тулатромицин апликован у дози 10 пута већој од терапијске код коза доводи до одређених оштећења ДНК. Резултати до којих се дошло указују да би тулатромицин могао да има евентуалне генотоксичне ефеката.

2.3. Значај тестирања лекова на генотоксичност

Широм света одговарајуће организације за безбедност лекова и медицинских средстава прописале су процедуре о начину регистрације лекова, којима је обухваћена и испитивања како њиховог генотоксичног потенцијала, тако и њихових метаболита. Преклиничка испитивања спроводе се ради добијања основних сазнања о токсиколошком профилу нових лекова. Токсиколошки подаци користе се за оцену безбедности нових лекова пре изласка на тржиште, како би се предвидели потенцијални ризици њихове примене (Јена и сар., 2002). Данас није могуће регистровати нови лек без података о њиховој мутагености (Cartwright и сар., 1994).

Континуирано се спроводе бројне токсиколошке евалуације како би се утврдила безбедност присутних резидуа ветеринарских лекова у храни за људе, које укључују и утврђивање могуће опасности од генотоксичног дејства лекова.

Многи, мада не сви, канцерогени су истовремено и мутагени, док се сви мутагени агенси могу сматрати канцерогеним обзиром да делују на нивоу промоције канцерогенезе. Многе супстанце које доводе до токсичних ефеката или изазивају репродуктивне поремећаје, такође испољавају генотоксичне ефекте (ЕМЕА, 2013).

Према водичима за оцену генотоксичног потенцијала лекова који се користе у ветеринарској медицини, препоручује се употреба три врсте тестова: (1) тест реверзних мутација на бактеријама, (2) цитогенетички тестови којима се утврђују оштећења хромозома (*in vitro* на лимфоцитима сисара или *in vitro* микронуклеус тест на пацовима) или *in vitro* тест генских мутација *tk* локуса на ћелијама миша и (3) *in vivo* цитогенетички тест на ћелијама костне сржи глодара (ЕМЕА, 2013). У већини случајева, предложени тестови су адекватни за оцену генотоксичности нових лекова. Међутим, у ретким случајевима, ови тестови нису довољни па се јавља потреба за даљим истраживањима. Водичи за оцену генотоксичног потенцијала лекова не искључују употребу нових метода и охрабрују развој нових система и њихову употребу када снажни научни докази подржавају налазе (Јена и сар., 2002). Коришћење нових метода довешће до повећања осетљивости и специфичности постојећих тест протокола.

Комет тест (гел електрофореза појединачних ћелија) представља релативно нову, једноставу и осетљиву методу за детекцију и евалуацију оштећења ДНК (Speit и Rothfuss, 2012). Ова метода, има одређене предности у одноду на друге генотоксиколошке методе: веома је осетљив јер омогућава детекцију ниског степена оштећења ДНК, захтева мали број ћелија по узорку и малу количину тест супстанце, флексибилна је, релативно јефтина, лака за извођење и релативно брза (Tice и сар., 2000). Комет тест спада у индикатор тестове (на супрот тестовима на мутагеност), јер детектује оштећења ДНК која могу даље довести до мутација (Brendler-Schwaab и сар., 2005).

Као што је раније поменуто, евалуација генотоксичног потенцијала тулатромицина испитивана је различитим тестовима и резултати су показали да он није генотоксичан (ЕМЕА, 2004). Међутим, како су Washburn и сар. показали да тулатромицин примењен у дози 10 пута већој од терапијске код коза доводи до одређених оштећења ДНК, и како је потврђено да тулатромицин може изазвати

оксидативни стрес (Eg и сар., 2011) сматрали смо да би било значајно његово тестирање на генотоксичност применом алкалне верзије комет теста (Singh и сар., 1988; Speit и Rothfuss, 2012). Тиме би се стекао увид у могућност стварања примарних оштећења ДНК.

2.4. Реактивне кисеоничне врсте, оксидативна оштећења ДНК и могуће последице

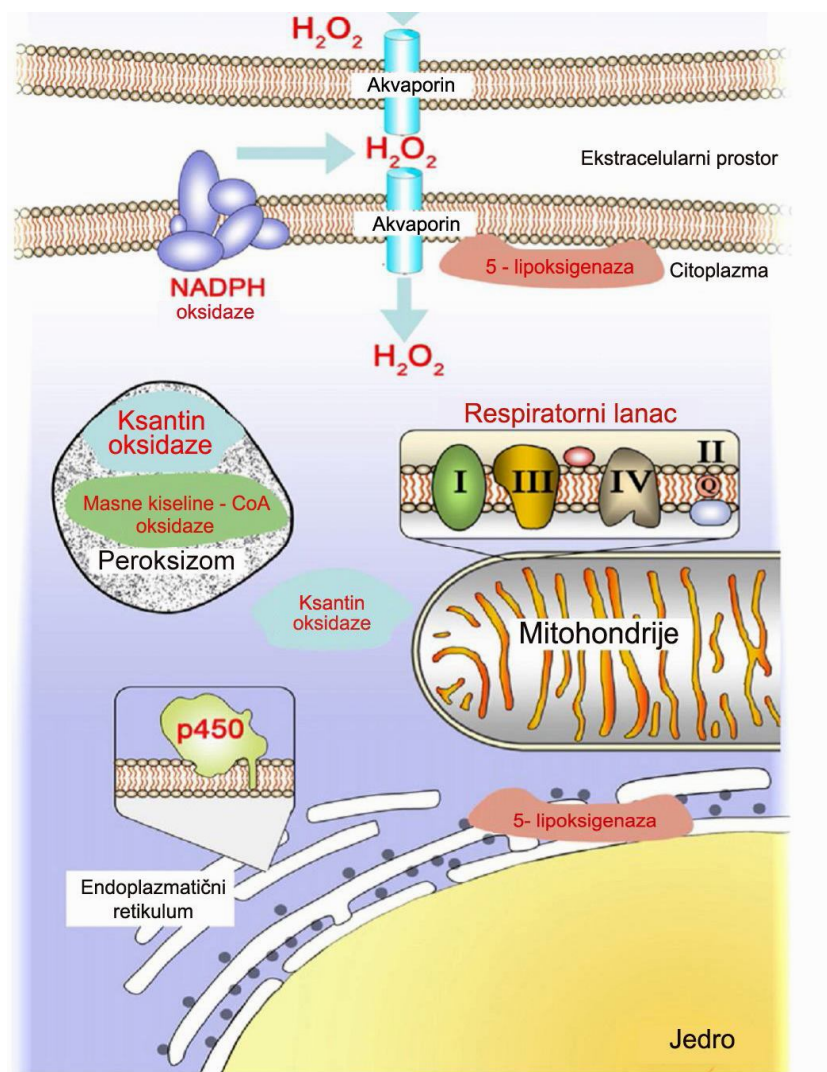
Оксидативни стрес се сматра узроком старења и патолошке смрти ћелије (Covarrubias и сар., 2008). Оксидативни стрес, представља дисбаланс у организму, при чему оксидативни процеси успевају да надвладају антиоксидативне механизме заштите. Ово стање може бити један од главних фактора у патогенези разних обољења. Реактивне кисеоничне врсте настају као производ нормалног метаболизма ћелије и имају значајну улогу у преношењу ћелијских сигнала и хомеостази (Park и сар., 2009). Резултат прекомерне производње реактивних кисеоничних врста доводи до оксидативног стреса. Овај статус дисбаланса оксиданата и антиоксиданата, може проузроковати поремећај оксидације протеина, ДНК и липида (Oliveira и сар., 2013).

Назив реактивне кисеоничне врсте (ROS - Reactive oxygen species) односи се на све молекуле и слободне радикале који воде порекло од молекулског кисеоника. Редукцијом кисеоника настају релативно стабилни молекули. Од једног редукционог електрона настаје супероксид-анјон који је прекурсор веће реактивних врста кисеоника. Осим супероксида, водоник-пероксида и хидроксилног радикала, постоје и нарочите реактивне кисеоничне врсте са биолошким ефектима. Такав је на пример азот-оксид, кратко-живећи молекул са три електрона, који регулише бројне физиолошке функције (Kuzin и сар., 1996; Regulski и сар., 2004).

Научници су одавнина били заинтересовани за улогу реактивних кисеоничних врста у процесу оштећења ткива. Познато је да ова једињења могу да оштете ДНК, ензиме и структурне протеине, јер могу да реагују директно са њиховим сулфхидрилним групама, али такође могу да подстакну неконтролисани ланац реакција, као што је пероксидација липида или реакције аутооксидације

(Herington, 1986; Halliwell и сар., 1994; Bijlani, 1995; Kamagai и сар., 1997). Пероксидација липида мембране доводи до нарушавања њеног интегритета (Vliet и сар., 1992).

Реактивне кисеоничне врсте настају као неизбежни споредни производи аеробног дисања и различитих катаболичких и анаболичких процеса (Halliwell, 1991).



Слика 2. Места у ћелији где настају реактивни кисеоничне врсте (преузето од Covarrubias и сар., 2008)

Реактивне кисеоничне врсте настају у митохондријама, ендоплазматском ретикулуму и пероксизомима, директно из кисеоника, посредством ензима NADPH–оксидазе (слика 2), главне фамилије ензима чија је каталитичка субјединица кодирана *Nox1-5* и *Duox1-2* генима. Мада је ова активност иницијално утврђена током фагоцитозе, сада се зна да су ови ензими широко распрострањени у бројним ткивима (Lambeth, 2004).

Ниво реактивних кисеоничних врста није само одређен количином и брзином њихове продукције, већ и степеном деградације или инактивације. Ензимски и неензимски антиоксиданси су одговор ћелије на ефекте реактивних кисеоничних врста (Covaгubias и сар., 2008). Ензимски антиоксиданси су супероксид-дисмутазе, које преводe супероксидни радикал до водоник пероксида и кисеоника (Maier и сар., 2002), као и каталаза и пероксидазе, које преводe водоник пероксид у воду (O'Brien, 2000; Kirkman и сар., 2007). Најпознатији неензимски антиоксиданси у организму су глутатион и тиоредоксин (Wu и сар., 2004; Holmgren и сар., 2005). Редукцијом тиола протеина, смањује се интрцелуларно редокс стање у ћелијама сисара (Nakamura, 2005).

Извршен је велики број истраживања механизма оксидативног оштећења ДНК. Степен ових оштећења у највећој мери зависи од тога која реактивна кисеонична врста је укључена, од места њеног настанка и присуства јона метала. Показало се да је хидроксил радикал ($\cdot\text{OH}$), као најреактивнија врста, најзначајнији оксидант одговоран за оштећења ДНК. Он регује са ДНК везујући се за двоструку везу ДНК база или одузимањем једног атома водоника из метил групе тимина и сваке С-Н везе 2'-деоксирибозе (Cooper и сар., 2003). Реакцијама пуриских и пиримидинских база настају бројни продукти ДНК, и ове модификоване базе установљене су *in vitro* експериментима на ДНК сисарских ћелија након излагања реактивним врстама кисеоника (Dizdaroglu, 1998). Поред наведених оксидативних оштећења, $\cdot\text{OH}$ може реаговати са шећерно-фосфатном окосницом молекула ДНК и довести до настанка апуринских места као последица уклањања базе. На овај начин настају једночлани и двочлани прекиди ДНК молекула. Једночлани прекиди могу се показати мутагеним, али и смртоносним за ћелију (Friedberg и сар., 1995) Од нарочите важности је механизам уклањања оксидативних оштећења ДНК који подразумева исецање модификованих база, укључујући уклањање појединачних

оштећења гликозилазним дејством, и уклањање оштећених олигонуклеотида, исецањем нуклеотида (Cooke и сар., 2003).

Једна од најважнијих последица оксидативног оштећења ДНК је настанак мутација, односно наследних промена молекула ДНК које представљају почетни корак у процесу канцерогенезе. Повећан ниво оксидативних оштећења ДНК забележен је у бројним туморима.

Оксидативна оштећења ДНК доводе се у везу не само са канцером већ и са другим обољењима. Тако у патогенези неуродегенеративних стања код људи, као што су Алцхајмерова и Паркинсонова болест, важну улогу има оксидативни стрес у својој патогенези, тј. пораст оксидације липида и протеина, а у нешто мањем степену и пораст нивоа оксидативних оштећења ДНК (Mecocci и сар., 1998; Smith и сар., 2000). Тренутно најактивна теорија као разлог старења истиче акумулацију оштећења у молекулима ДНК и смањен капацитет репарације тих оштећења, а као резултат тих процеса губитак функционалности ћелије што може даље евентуално довести до њене смрти. Настанак реактивних кисеоничних врста и њихов циљани ефекат на ДНК, који подразумева њено оштећење, уско је повезан са стрењем и поремећајима који су везани за овај процес (Kalluri, 2009).

Постоје бројни докази о вези између запаљењских процеса и оксидативног стреса (Cooke и сар., 2003), а забележена је и веза између кардиоваскуларних болести и оксидативних оштећења ДНК (Collins и сар., 1998).

Очекује се да утврђивање тачне улоге оксидативних оштећења ДНК у патогенези одређених болести, омогући проналазак механизма исправке тих оштећења, што би помогло у превенцији и терапији обољења.

2.5. Улога комет теста у детекцији и евалуацији оштећења ДНК

Комет тест (гел електрофореза појединачних ћелија) представља, једноставу, осетљиву, квантитативну технику за детекцију и евалуацију оштећења ДНК (Collins, 2004; Speit и Rothfuss, 2012). Основни принцип комет теста је откривање и кантификација оштећења ДНК праћењем миграције денатурисаних ДНК фрагмената кроз агарозни гел ка аноди током електрофорезе (Collins, 2004). Комет тест су развили Ostling и Johanson 1984. године, као тест за евалуацију ДНК

оштећења на нивоу појединачних ћелија. Singh и сарадници су 1988. године модификовали првобитну методу, увођењем алкалних услова ($\text{pH} > 13$) током процеса електрофорезе. При овим условима, повећање миграције ДНК је у вези са порастом једноланчаних прекида, а што се опет доводи у везу са некомплетним исецањем делова који су за поправку и алкално лабилним местима. Алкални комет тест омогућава детекцију како једноланчаних, тако и дволанчаних прекида ДНК, алкално лабилних места, ДНК-ДНК/ДНК-протеин укрштених веза и ДНК прекида који су у вези са некомплетним местима поправке (Błasiak, 2001; Liao и сар., 2009; Kang и сар., 2013).

Као што је већ поменуто, принцип комет теста заснован је на праћењу миграције ДНК фрагмената кроз агарозни гел. Ћелије које су претходно изложене супстанци која се испитује, мешају се са 1 % раствором агарозе са ниском тачком топљења и наносе на предметне плочице прекривене слојем 1% агарозе са нормалном тачком топљења. Плочице се затим потапају у хладни алкални лизирајући раствор са високом концентрацијом соли и детерџената како би се дезинтегрисале биолошке мембране и ослободила једарна ДНК. Лизирање се врши најчешће током целе ноћи. Након лизирања плочице се смештају у кадицу за хоризонталну гел електрофорезу и потапају у хладни пуфер ($\text{pH} > 13$), да би се извршила денатурација ДНК, односно одмотавање ланаца ДНК (енгл. DNA unwinding). После денатурације обавља се електрофореза (најчешће на 25 V и 300 mA). Временско трајање електрофорезе варира у зависности од типа ћелија, обично износи 20-30 мин. По завршетку електрофорезе врши се неутрализација алкалија и на крају бојење флуоресцентном бојом (нпр. етидијум бромид, Syber green итд.) ради визуелизације комета. Евалуација оштећења ДНК врши се прегледом плочица на флуоресцентном микроскопу. Степен оштећења ДНК директно је пропорционалан величини репа комете, односно количини фрагмента ДНК у репу, а обрнуто пропорционалан степену настанка ДНК укрштених веза (Singh и сар., 1988; Ashby и сар., 1995; Collins, 2004; Kang и сар., 2013).

2.5.1. Примена антиоксиданаса у комет тесту

У циљу бољег разумевања механизма генотоксичности различитих супстанце и са циљем повећања специфичности самог теста, приликом извођења комет теста може се применити котретман ћелија са антиоксидансима (Vincy и сар., 2005; Radaković и сар., 2013). На овај начин, може се утврдити да ли оштећења ДНК, након третмана са одређеном супстанцом, настају услед оксидативног стреса, односно услед стварања реактивних кисеоничних и азотових врста и њихове реакције са ДНК молекулом. Антиоксиданси изазивају дозно-зависну редукцију оксидативних оштећења ДНК (Nogoozi и сар., 1998).

У овом истраживању као антиоксиданс коришћена је каталаза. Каталаза је ензим присутан у свим организмима и органима, а њена активност се обично региструје у митохондријама, лизозомима и пероксизомима (Alberts и сар., 2002; Chelikani и сар., 2004). Каталаза у ћелији има улогу да разлаже водоник пероксид, штетан споредни производ нормалних метаболичких процеса, до молекула воде и кисеоника, и на тај начин превенира стварање веома реактивног хидроксил радикала (Gaetani и сар., 1996). Као последица недовољне функције може доћи до формирања ковалентно модификованих база у ДНК (ДНК адукти), као што је 8-хидроски-2'-деоксигуанозин (8-OHdG) и повећања производње водоник пероксида који може да изазове апоптозу (Zunino и сар., 2001; Bai и Cederbaum 2003; Saadatzaheh и сар., 2004). Бројна истраживања показала су да каталаза својим антиоксидативним дејством доприноси смањењу оксидативних оштећења ДНК (Djelić и Anderson, 2003; Diaz-Llera и сар., 2002; Hook и сар., 2004; Radaković и сар., 2013; Al-Jumaily и Al-Safar, 2014)

Како је показано да тулатромицин може да изазове оксидативни стрес, самим тим и потенцијална оксидативна оштећења ДНК, у овом испитивању је ензим каталаза примењен као антиоксиданс за боље разумевање механизма претпостављеног генотоксичног дејства овог лека.

2.5.2. Примена инхибитора репарације приликом извођења комет теста

Карактеристика комет теста да може да детектује веома низак степен оштећења ДНК може бити знатно побољшана увођењем инхибитора репарације ДНК, као што су хидроксиуреа (НУ) и цитозин арабинозид (Ага С). Хидроксиуреа смањује стварање дезоксирибонуклеотида преко инхибиције рибонуклеотид редуктазе (Но и сар., 2006), док је цитозин арабинозид антимерит који омета синтезу ДНК услед инхибиције ДНК полимеразе, РНК полимеразе и нуклеотид редуктазе. На овај начин значајно се повећава осетљивост комет теста. Увођењем инхибитора омогућава се откривање ширег опсега генетичких оштећења и потенцијала различитих супстанци да изазову оваква оштећења (Andreoli и сар., 1999; Horvathova и сар., 1999; Speit и сар., 2008; Kawaguchi и сар., 2010).

Репликацију ДНК омогућава ензим ДНК полимеразе. Ага С је аналог цитозина. Он се од њега разликује присуством једне хидроксилне групе на 2' позицији. Ага С је специфични инхибитор синтезе ДНК. Блокира репарацију њених оштећених молекула тако што инхибира РНК полимеразе, нуклеотид редуктазе и активност ДНК полимеразе у еукариотским ћелијама. ДНК полимеразе иначе попуњава празнину насталу исецањем нуклеотида или база, али је и реверзибилни инхибитор унутар једарне репликације ДНК у еукариотским ћелијама. Ага С такође може деловати и индиректно, инсерцијом у регион поправке молекула ДНК, што га чини нестабилним за даље деловање ензима одговорних за репликацију (Mihailović, 2000; Speit и сар., 2008). Ефикасност Ага С се повећава у присуству НУ (Martin и сар., 1999). Показано је да Ага С и НУ инхибирају ћелијски циклус V79 ћелијске линије, што доводи до заустављања ћелија у S фази. Овај ефекат зависио је од времена и концентрације (Speit и сар., 2008).

С обзиом да употреба инхибитора репарације молекула ДНК у комет тесту између осталог повећава генотоксични ефекат алкалних једињења (Frankfurt и сар., 1993), те да је тулатромицин по својој природи слаба база, налазимо да је примена наведених инхибитора у евалуацији генотоксичних ефеката овог лека оправдана.

2.6. Значај патохистолошког налаза у евалуацији безбедности примене лека

Евалуација патохистолошких промена насталих применом нових лекова на лабораторијским животињама, један је од корака у процесу утврђивања њихове безбедности и обавезно се процењује пре прве примене код циљних врста. Прелиминарни налази, засновани на хистопатолошкој дијагнози, умногome доприносе развоју нових третмана болести (Greaves и сар., 2004).

Током токсиколошких истраживања врши се мониторинг према стандардизованој листи хематолошких и биохемијских параметара, са циљем утврђивања потенцијалних токсичних ефекта лекова на одређеним органима. Потврда било које биолошке и токсиколошке значајне промене између контролне и експерименталне групе, узима се у перспективи у разматрање. Мада је некада тешко успоставити везу између клиничких и патохистолошких налаза, патохистолошке промене су пресудне уколико се подаци правилно процењују (James, 1993).

Нежељени ефекти подразумевају промене у морфологији, физиологији, расту, развоју, репродукцији и животном веку ћелије, организма или система, што даље доводи до функционалног оштећења, оштећења способности ћелије да компензује додатни стрес или повећања осетљивости на друге утицаје (Keller и сар. 2012).

Патохистолошке промене настале дејством неког лека могу бити реверзибилне или иреверзибилне. Уколико неклиничка истраживања покажу да су промене реверзибилне, даље се испитује која би то највећа доза лека могла обезбедити његову безбедну клиничку примену (Rosenfeldt и сар. 2010). Уколико истраживања, спроведена на животињским врстама које нису крајњи корисници лека, покажу да су промене иреверзибилне, онда се мора повећати почетна доза у клиничком испитивању леку на циљној врсти (FDA, 2005).

Истраживањима на лабораторијским животињама не могу се утврдити сва нежељена дејства лекова (Olsen и сар., 2000). Поклапања варирају за различита ткива и органе, па се свака патолошка промена настала услед примене лека код лабораторијских животиња, анализира као посебан случај у погледу њене повезаности са клиничком применом тог лека. Ипак, патохистолошки налаз је од изузетне важности и сматра се најосетљивијом техником при процени нежељених

ефеката лекова на појединим органим и органским системима (Такауата и сар., 1995).

Пре пуштања у промет хуманих и ветеринарских лекова примењују се исти принципи у циљу утврђивања безбедности њихове примене код циљне животињске врсте. Такође се врше истраживања утицаја лека на околину и истраживања безбедности ветеринарског лека по људе као крајње конзументе производа анималног порекла. Пошто се налаз патохистолошких промена насталих услед деловања лека на лабораторијске животиње мора екстраполирати на бројне животињске врсте, истраживања често морају бити допуњена и патохистолошким налазом након примене вишеструких терапијских доза код циљних животиња (Woodward KN., 2005).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ

С обзиром да постоје експериментални налази који указују да тулатромицин може да изазове оксидативни стрес, циљ овог истраживања је да се укаже на могућност настанка примарних оштећења ДНК под његовим дејством применом алкалне верзије комет теста. Имајући у виду високу сензитивност комет теста, било би значајно упоредити добијене резултате са до сада обављеним генотоксиколошким испитивањима тулатромицина.

Због већ описаних кардиотоксичних и хепатотоксичних ефекта тулатромицина и недовољно података из литературе, други циљ истраживања је да се испитају потенцијалне патоморфолошке промене на унутрашњим органима (јетра, бубрези, плућа, срце и тестиси).

Задаци ове докторске дисертације дефинисани су на следећи начин:

- евалуација степена оштећења ДНК на изолованим лимфоцитима пацова третираних тулатромицином у распону концентрација од 1 μM до 100 μM применом *in vitro* комет теста,
- индиректно утврђивање механизма потенцијалних генотоксичних ефеката тулатромицина применом антиоксиданса (каталаза),
- утврђивање могућег повећаног испољавања оштећења ДНК у присуству инхибитора репарације (хидроксиуреа и цитозин арабинозид),
- утврђивање карактера и степена патоморфолошких промена у органима (јетра, бубрег, срце, тестиси и плућа) након свакодневне s.c. апликације лека током 10 дана у терапијској дози (2,5 mg/ kg) и дозама које су три (7,5 mg/ kg), десет (25 mg/kg) и тридесет (75 mg/kg) пута веће од терапијске.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживања су спроведена у два огледа. Први је имао за циљ евалуацију генотоксичних ефеката тулатромицина применом *in vitro* комет теста, док је други део истраживања имао за циљ евалуацију патоморфолошких промена након свакодневне s.c. примене тулатромицина током 10 дана.

4.1. Генотоксиколошка испитивања

Генотоксиколошка испитивања обављена су у Лабораторији за генетику животиња, Катедре за биологију, Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

4.1.1. Материјал

Приликом евалуације генотоксичних ефеката, као тест супстанца, коришћен је лек тулатромицин (Draxxin[®], Pfizer Animal Health, Kikland, QC). Као позитивна контрола коришћен је водоник пероксид (Galafarm, Скопље, Македонија), а негативна контрола је био раствор PBS (Торлак, Београд, Србија).

За изолацију лимфоцита коришћен је: RPMI 1640 медијум са додатком L-глутамата и NEPES-a (PAA Laboratories GmbH), Ficoll-Paque[™] Plus (GE Healthcare Biosciences AB, Шведска) и натријум-хлорид (Галеника, Београд, Србија).

За комет тест коришћене су следеће хемикалије: агароза нормалне тачке топљења (NMPA) (CAS no 9012-36-6), агароза ниске тачке топљења (LMPA) (CAS No 39346-81-1), EDTA (CAS No 6381-92-6), натријум-хлорид (CAS No 7647-14-5), Tris (хирдоксиметил-аминометан) (CAS No 77-86-1), каталаза из говеђе јетре (CAS No 9001-05-2), хидроксиуреа (CAS No 127-07-1) и цитозин-арабинозид (CAS No 147-94-4). Све наведене хемикалије су од произвођача Sigma Chemical Co., St. Louis, САД. Такође су коришћени: диметил-сулфоксид (DMSO) и натријум-хидрокид (Merck KGaA, Darmstadt, Немачка), triton X-100 Plus One (Amersham Biosciences, Шведска), и етидијум-бромид за визуелизацију комета (20 µg/mL) (Serva, Heidelberg, Немачка).

4.1.2. Изолација лимфоцита пацова и третман

За потребе истраживања коришћена је периферна венска крв Wistar пацова. Животиње су уведене у општу анестезију (интраперитонеално 0.5 mg/kg медетомидин + 60-70 mg кетамина) за чије време је праћено њихово опште стање, а затим су узети узорци крви у количини од 4 mL по животињи. За потребе истраживања коришћена су укупно 11 пацова, по 4 за истраживање са тулатромицином и експеримент са и без инхибитора репарације и 3 пацова за експеримент са каталазом. Из узорака хепаринизоване крви лимфоцити су изоловани на следећи начин: раслојавање фикола (Ficoll-PaqueTM Plus), центрифугирање на 1900 rpm током 15 минута, затим формирање лимфоцитног прстена, прикупљање ћелија и њихово ресуспендовање два пута у RPMI 1640 медијуму. Између испирања обављено је центрифугирање на 1800 rpm током 10 минута. На крају, супернатант је пажљиво уклоњен, а талог ресуспендован у RPMI 1640 медијуму.

При евалуацији степена оштећења ДНК под утицајем тулатромицина коришћено је седам експерименталних концентрација у распону од 1 μ M до 100 μ M. Три концентрације тулатромицина (5, 20 и 50 μ M) при којима се јавља вијабилност ћелија преко 90% употребљене су за даља испитивања. Да би се повећа сензитивност комет теста, изоловани лимфоцити пацова инкубирани су на 37°C током 30 минута са одабраним концентрацијама тулатромицина 5, 20 и 50 μ M и инхибиторима репарације цитозин арабинозом (AraC) у концентрацији од 40 μ M и хидроксиуреом (HU) у концентрацији од 4000 μ M. Овим је обављен заједнички третман лимфоцита са појединачним концентрацијама тулатромицина и инхибиторима репарације.

Такође је испитиван ефекат тулатромицина у концентрацији од 100 μ M у присуству антиоксиданса каталазе (CAT) примењене у две различите концентрације (100 IU/mL и 500 IU/mL). Изоловани лимфоцити третирани су одабраном концентрацијама тулатромицина и каталазе на 37°C током 30 минута.

4.1.3. Одређивање броја и вијабилности ћелија

Процена вијабилности ћелија и бројање ћелија обављени су „Трипан Blue“ у хемцитометру. Ћелијска суспензија запремине 20 μL помешана је са 20 μL 0.4% боје трипан плаво и инкубирана на собној температури током 5 минута. Овом обојеном суспензијом ћелија (10 μL) попуњена је Нојбауерова комора (Neubauer). Бројање ћелија обављено је под светлосним микроскопом (Olympus, CX-21 - Olympus Corporation, Јапан) на увећању 40X. Да би се избегли цитотоксични артефакти у тесту, неопходно је да најмање 70% ћелија буде вијабилно како би комет тест био валидан (Henderson и сар., 1998).

4.1.4. *In vitro* комет тест

У овом испитивању урађен је базни комет тест (Singh и сар, 1988; Tice и сар., 2000) уз незнатне модификације. Микроскопске плочице су премазане 1% агарозом нормалне тачке топљења и остављене на собној температури 48 сати да се осуше. Суспензије лимфоцита пацова инкубиране су у раствору PBS са различитим концентрацијама тест супстанци (табела 1). По третману ћелија прешли смо у тамну просторију како би се спречили додатно оштећење ДНК под утицајем UV зрачења. Суспензије ћелија центрифугиране су на 2000 rpm током 5 минута, чиме је добијен ћелијски талог који је даље измешан са једнаком количином 1% агарозе ниске тачке топљења и наносен на претходно припремљене плочице. Плочице су затим остављене 4°C током 5 минута, да би агарозни слој очврсно, након чега је наносен трећи слој агарозе (0.5% агароза ниске тачке топљења). Након полимеризације гела, плочице су потапане у лизирајући раствор (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) и остављене преко ноћи на температури од 4°C. Сутрадан, плочице су слагане у кадицу за хоризонталну гел електрофорезу и потапају у хладни алкални (pH \geq 13) електрофоретски пуфер (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) да би се омогућила денатурација ДНК у трајању од 30 мин. Електрофореза је обављана у трајању од 30 минута, при напону од 25 V и јачини струје од 300 mA. По завршетку електрофорезе плочице су испиране три пута по 5 минута са

неутралишућим раствором (0,4 М Tris база, рН 7.5). Затим су дехидратисане у ледено хладном метанолу, осушене у трајању од 20 мин. на температури од 55 до 60°C и одлагане на суво место до анализе комета. Ради визуелизације ћелија, осушене плочице су потапане у ледено хладну дестиловану воду током 15 минута, а затим обојене са 50 µL етидијум-бромидом (20 µg/mL по плочици).

Табела 1. Тестиране концентracије тулатромицина и одговарајуће дозе

Супстанце	Концентрације (µM)	Концентрације (mg/kg)	У односу на терапијску дозу (која износи 2.5 mg/kg TM)
Негативна контрола, PBS	/	/	/
Тулатромицин	1	0.806	0.3224
	2	1.61	0.644
	5	4.03	1.612
	10	8.06	3.224
	20	16.12	6.448
	50	40.3	16.12
	100	80.6	32.24

4.1.5. Анализа података

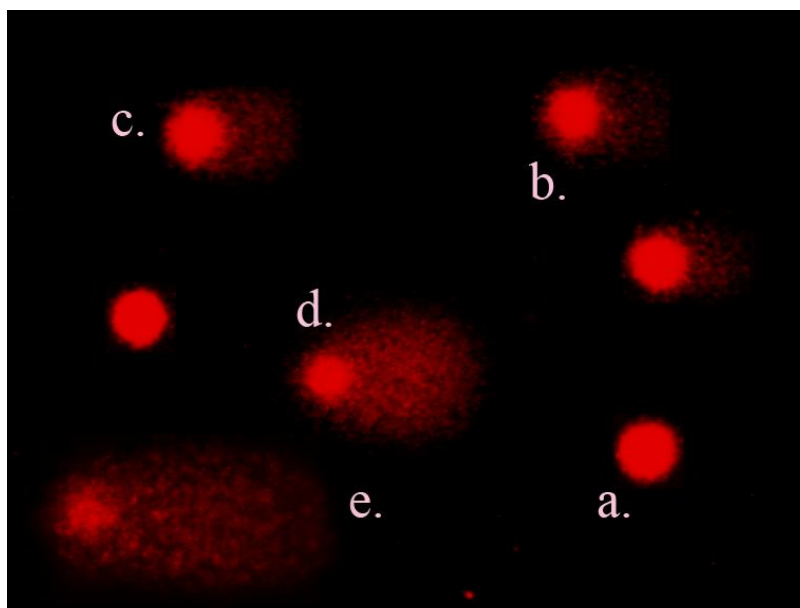
Евалуација оштећења молекула ДНК обављена је мануелно, под светлосним микроскопом (Zeiss AXIO Imager.M1 - Carl Zeiss Hamburg, Немачка) на увећању 400×, коришћењем флуоресцентне светлости. За узорак сваког пацова и за сваку појединачну концентрацију анализирано је по 100 насумично одабраних ћелија.

Вредновање оштећења ДНК обављено је према Collins-у 2002. Ћелије су сврставане визуелно у пет класа (слика 3.) у складу са степеном оштећења ДНК, односно величином репа комете: (А) без миграције тј. оштећења, <5%, (В) слаба миграција тј. низак ниво оштећења, 5–20%, (С) средња миграција тј. средњи ниво оштећења, 20–40%, (D) висока миграција тј. висок ниво оштећења, 40-95% и (Е) опсежна миграција тј. потпуно оштећење, >95%. Да би се олакшала даља

манипулација и сама обрада података, вредност ДНК оштећења израчуната је и изражена као TCS (енг. *total comet scores*), при чему је

$$TCS = 0 \times A + 1 \times B + 2 \times C + 3 \times D + 4 \times E.$$

Према томе, као што се види из ове формуле нумеричка вредност TCS креће се у распону $0 < TCS < 400$.



Слика 3. Различити степени ДНК оштећења на лимфоцитима пацова у комет тесту
а. ћелије без оштећења, б. слабо оштећене ћелије, с. средње оштећење, д. високо оштећене ћелије, е. тотално оштећене ћелије

4.1.6. Статистичка обрада података комет теста

Хипотезе о једнакости ефеката различитих третмана на TCS добијених у комет тесту провераване су поређењем средњих вредности. Између алтернативних метода за испитивање разлика просечних вредности изршен је избор у складу са вредностима коефицијента варијације. Као групни тест, у случају хомогених података у узорцима ($c_v < 30\%$) коришћен је параметријски модел, метода анализа варијансе, а у случају хетерогених података ($c_v > 30\%$) непараметријски Kruskal Wallis-ов тест. Тестирање разлике две средње вредности

у случају хомогених података у узорцима ($c_v < 30\%$) извршено је Tukey-евим тестом, док је у случају хетерогених подата ($c_v > 30\%$) примењен Mann-Whitney-ев U-тест. Статистичка анализа резултата добијених извођењем комет теста спроведена је употребом статистичког софтвера *STATISTICA* v.6.

4.2. Животиње и експериментални дизајн

Истраживање је спроведено на 60 пацова мушког пола, соја Wistar (пореклом са фарме експерименталних животиња Војно-медицинске академије), старости 2-3 месеца, телесне масе 200-300 г. Могући токсични ефекти тулатромицина (Draxxin[®], Pfizer Animal Health, Kikland, QC) испитивани су на основу патоморфолошких промена на унутрашњим органима (јетра, плућа, тестиси, бубрези, срце) третираних животиња. Пацови су били подељени у 6 група са по 10 јединки и држани у кавезном групном систему Лабораторије за смештај животиња, Катедре за фармакологију и токсикологију, Факултета ветеринарске медицине, под сталним надзором дипломираног ветеринара. Животиње су боравиле у виваријуму са природном светлошћу, температуром од 18° до 24°C и релативном влагом ваздуха 50% - 70 %. Четири експерименталне групе животиња добијале су свакодневно током десет дана тулатромицин s.c. у различитим дозама: терапијској дози од 2,5 mg/kg – група E1, дози од 7,5 mg/kg – група E2, дози од 25 mg/kg – група E3 и дози од 75 mg/kg – група E4. Пета група је контролна експериментална група која је примала растварач лека (пропилен гликол) у дози од 2,5 mg/kg – група Ke, а шеста група је била нетретирана, апсолутна контролна група - Ka. Након десет дана свакодневне апликације лека, половина животиња из сваке групе била је хумано жртвована (i.v. 100-150 mg пентобарбитона). Четрнаест дана након завршетка огледа жртвоване су преостале животиње, за које време се очекивало да ће доћи до евентуалних репарација могућих оштећења на унутрашњим органима који су испитивани. Током целог огледа, животињама био омогућен слободан приступ храни и води (*ad libitum*).

4.3. Патохистолошка анализа

Десетог дана огледа, и 14 дана након завршетка огледа, извршена је обдукција и детаљан макроскопски преглед унутрашњих органа жртвованих животиња у обдукционој сали Катедре за патолошку морфологију Факултета ветеринарске медицине. Узети су узорци ткива срца, јетре, плућа, тестиса и бубрега узети су за патохистолошки преглед и фиксирани у 10% пуферизованом формалину у трајању од 48 до 72 сата. Даље су процесовани стандардним поступком у аутоматском ткивном процесору (дехидрација у серији алкохола, просветљавање у ксилолу и импрегнација парафином) и уклопљени у парафинске блокове у Лабораторији за патологију исте катедре. Парафински исечци органа дебљине 3-5 μm бојени су хематоксилин-еозином (ХЕ).

Евалуација микроскопских промена извршена је светлосним микроскопом (Olympus, ВХ-51 – Olympus Corporation, Јапан) уз употребу уобичајених увеличања објектива (20 \times , 40 \times , 100 \times , 200 \times , 400 \times , 600 \times).

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Ефекат тулатромицина на оштећења ДНК у комет тесту

Утврђена вијабилност лимфоцита третираних тулатромицином била је преко 90%, чиме су се стекли услови за даља истраживања. Применом комет теста извршена је евалуација оштећења ДНК молекула на изолованим лимфоцитима пацова који су били изложени широком спектру концентрација тулатромицина (1 до 100 μM). За испитивање осетљивости теста употребљен је водоник пероксид (H_2O_2) у концентрацији од 100 μM као позитивна контрола, која је при свим третманима показала статистички врло значајно оштећење ДНК молекула у односу на негативну контролу (PBS). Оштећења ДНК молекула изражена су преко TCS вредности.

Основни статистички параметри приказани су у табели 2. Вредности TCS кретале су се од 1 у негативној контролној групи и ћелијама третираним са 1 μM и 10 μM тулатромицина, до 332 у позитивној контролној групи. Применом позитивне контроле, добијене су хомогене вредности TCS ($c_v=11.13\%$), док су применом осталих третмана вредности TCS биле хетерогене (односно, коефицијент варијације кретао се од 33,64 % при третману са тулатромицином у концентрацији од 100 μM до 92,88 % при третману са 20 μM тулатромицина). С обзиром на то, медијана је адекватна средња вредност, па се може закључити да је просечна вредност TCS варијала од 5,5 при примени 2 μM тулатромицина до 279,5 при примени позитивне контроле.

Пошто су резултати добијени у овом експерименту били хетерогени, користили смо непаметријски тест. Резултати Kruskal-Wallis-овог теста ($N=20.73$, $p=0.008$) показали су да третмани имају статистички врло значајан различит ефекат на просечну вредност TCS. Као што показују резултати Mann-Whitney-евог U теста, то је последица значајне разлике у ефекту позитивне контроле у односу на ефекат негативне контроле и ефекте свих примењених концентрација тулатромицина, као и ефекта третмана ћелија са 100 μM тулатромицина у односу на негативну контролу и третмана са 5 μM

тулатромицина, и значајне разлике између ефеката третмана ћелија са 50 μM тулатромицина у односу на негативну контролу (табела 3, графикон 1 и слика 4).

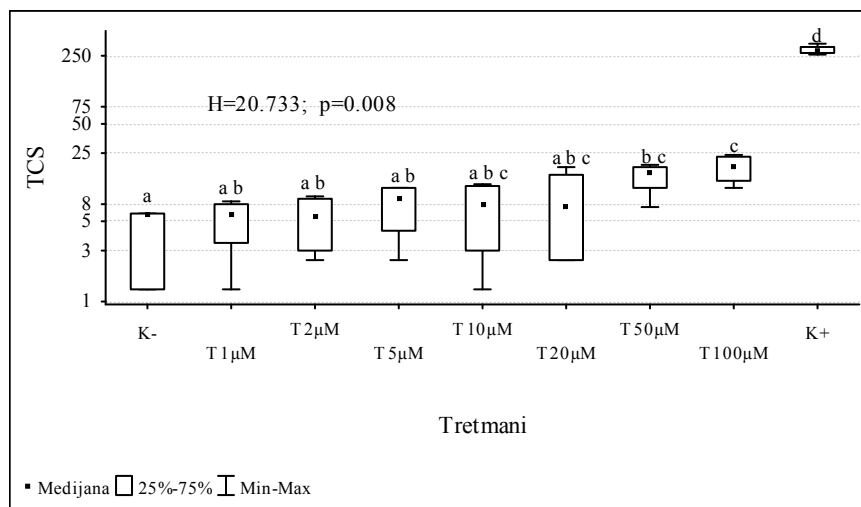
Табела 2. Основни статистички параметри TCS вредности у експерименту са различитим концентрацијама тулатромицина (n=4)

Третман		Медијана	Мин.-Макс.	Доњи квартил	Горњи квартил	Коефицијент варијације
Негативна контрола (К-)		6.00	1.00-6.00	1.00	6.00	66.62
Тулатромицин	1 μM	6.00	1.00-8.00	3.00	7.50	58.97
	2 μM	5.50	2.00-9.00	2.50	8.50	63.85
	5 μM	8.50	2.00-11.00	4.00	11.00	58.12
	10 μM	7.50	1.00-12.00	2.50	11.50	76.49
	20 μM	7.00	2.00-18.00	2.00	15.00	92.88
	50 μM	16.00	7.00-19.00	11.00	18.00	36.28
	100 μM	18.50	11.00-24.00	13.00	23.00	33.64
Позитивна контрола (К+)		279.50	257.00-332.00	266.50	307.50	11.13

Табела 3. Нивои значајности разлика TCS вредности у контролама и третманима различитим концентрацијама тулатромицина, на бази Mann-Whitney-евог U теста

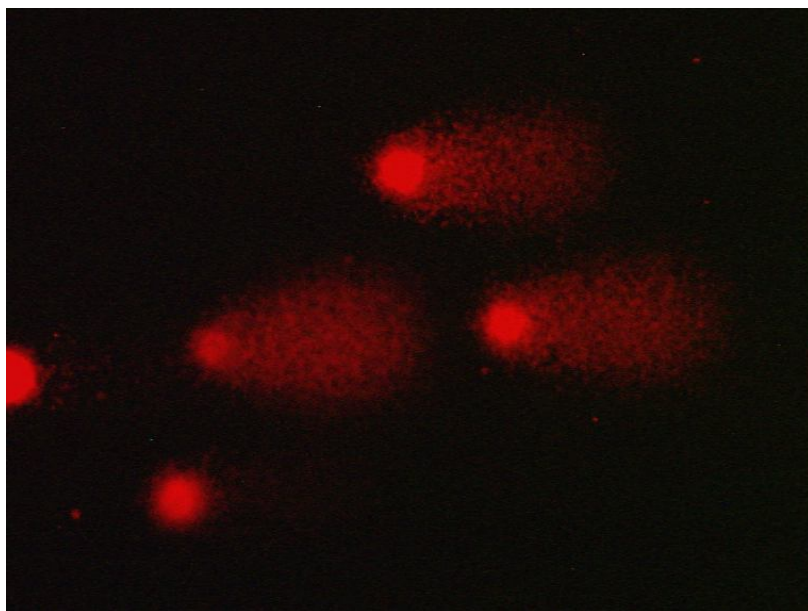
Третман	Тул 1 μM	Тул 2 μM	Тул 5 μM	Тул 10 μM	Тул 20 μM	Тул 50 μM	Тул 100 μM	К ⁺
К⁻	0.589	0.476	0.266	0.589	0.471	0.032	0.032	0.032
T 1μM		0.663	0.384	0.663	0.561	0.059	0.021	0.021
T 2μM			0.465	0.564	0.767	0.083	0.021	0.021
T 5μM				≈ 1.000	0.766	0.081	0.038	0.020
T 10μM					0.661	0.083	0.059	0.021
T 20μM						0.245	0.146	0.020
T 50μM							0.468	0.021
T 100μM								0.021

Графикон 1. Ефекат различитих концентрација тулатромицина на прочишћене лимфоците пацова као резултат Kruskal-Wallis-ове анализе варијансе и Mann-Whitney-евог U теста



Негативна контрола: 0 μM тулатромицина – K-; позитивна контрола: 100 μM H_2O_2 – K+. Истим словима су обележени третмани који се статистички значајно не разликују према резултатима Mann-Whitney-евог U теста.

Дијаграм је полулогаримаски.



Слика 4. Комете са значајним оштећењем ДНК након третмана са тулатромицином у концентрацијом од 100 μM

5.2. Ефекат тулатромицина на оштећења ДНК у присуству инхибитора репарације

Са циљем евалуације могућих оштећења ДНК деловањем тулатромицина, а ради детекције потенцијалних оштећења ДНК молекула која су веома ниског степена, спровели смо експеримент са инхибиторима репарације ДНК, хидроксиуреом (HU) и цитозин арабинозидом (Ага С). Тестирали смо три концентрације тулатромицина (5, 20 и 50 μM) без присуства инхибитора, као и исте концентрације тулатромицина у присуству инхибитора репарације у концентрацији од 40 μM АгаС и 4000 μM HU.

У овом експерименту, вредности TCS кретале су се од 6 у негативној контролној групи и ћелијама третираним са 5 μM тулатромицина до 328 у позитивној контролној групи (табела 4). Применом пет третмана добијене су хетерогене вредности TCS ($c_v > 30\%$), па су као просечне вредности коришћене медијане, чије су се вредности кретале од 7,5 у негативној контролној групи са инхибиторима и у третману са тулатромицином у концентрацији од 20 μM и 5 μM , до 321,5 у позитивној контролној групи.

На основу резултата Kruskal-Wallis-овог теста ($H = 15.27$, $p = 0.054$) анализирана група узорака није се статистички значајно разликовала по просечним вредностима TCS, односно није било статистички значајне разлике између третмана. Међутим, како је вредност p веома близу круцијалне вредности од 0,05, примењен је-Whitney-ев U тест. Као што је и очекивано, резултати су показали да постоји статистички значајна разлика између ефеката негативне контроле и свих осталих третмана са тулатромицином и тулатромицином са инхибиторима репарације. Резултати Mann-Whitney-евог U теста указују на то да нема статистички значајне разлике у ефектима третмана са тулатромицином и третмана са тулатромицином и инхибиторима (табела 5 и графикон 2).

Добијени резултати наводе на закључак да што је већа употребљена концентрација тулатромицина то је слабији ефекат инхибитора (више су грешке прве врсте односно нивои значајности). Третман са тулатромицином у концентрацији од 50 μM има јачи ефекат у односу на третмане са 20 μM и 5 μM тулатромицина, него третман са тулатромицином у концентрацији од 20 μM према третману са 5 μM тулатромицина.

Применом третмана при којима су различитим концентрацијама тулатромицина додати инхибитори репарације, добијене су просечне вредности TCS које се статистички још мање разликују, на шта указују резултати Kruskal-Wallis-овог теста ($H = 0,262$, $p = 0,877$). При томе, ефекат третмана са тулатромицином у концентрацији од 50 μM са инхибиторима, сличнији је ефекту третмана са 5 μM тулатромицина са инхибиторима, него ефекат третмана са 20 μM тулатромицина са инхибиторима и третман са 5 μM тулатромицина са инхибиторима.

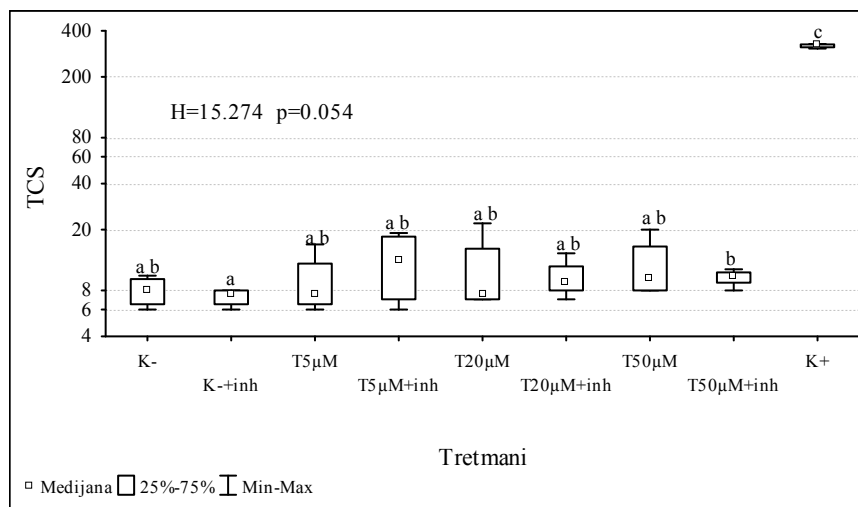
Табела 4. Основни статистички параметри TCS вредности у експерименту са различитим концентрацијама тулатромицина и различитим концентрацијама тулатромицина са инхибиторима репарације (n=4)

Третман	Медијана	Мин.-Макс.	Доњи квартил	Горњи квартил	Коефицијент варијације
Негативна контрола (К-)	8.00	6.00-10.00	6.50	9.50	22.82
К ⁻ + инхибитори	7.50	6.00-8.00	6.50	8.00	13.21
Тулатромицин 5μM	7.50	6.00-16.00	6.50	12.00	49.44
Тулатромицин 5μM + инхибитори	12.50	6.00-19.00	7.00	18.00	51.64
Тулатромицин 20μM	7.50	7.00-22.00	7.00	15.00	66.80
Тулатромицин 20μM + инхибитори	9.00	7.00-14.00	8.00	11.50	30.63
Тулатромицин 50μM	9.50	8.00-20.00	8.00	15.50	48.33
Тулатромицин 50μM + инхибитори	10.00	8.00-11.00	9.00	10.50	12.91
Позитивна контрола (К+)	321.50	306.00-328.00	312.50	326.00	3.00

Табела 5. Нивои значајности разлика TCS вредности у контролама и третманима различитим концентрацијама тулатромицина и третманима са различитим концентрацијама тулатромицина са инхибиторима репарације, на бази Mann-Whitney-евог U теста

Третман	К ⁻	К ⁻ +инх	50 μM	50 μM +инх	20 μM	20 μM +инх	5 μM	5 μM +инх
К ⁺	0.021	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.021	0.021
К ⁻		0.557	0.245	0.139	0.767	0.457	≈1.000	0.468
К ⁻ +инх			0.065	0.037	0.544	0.106	0.765	0.297
50μM				0.881	0.372	0.770	0.237	0.767
50μM+инх					0.304	0.559	0.306	0.884
20μM						0.552	0.655	0.884
20μM+инх							0.465	0.772
5μM								0.381

Графикон 2. Ефекат различитих концентрација тулатромицина и тулатромицина са инхибиторима репарације ДНК на прочишћене лимфоците пацова као резултат Kruskal-Wallis-ове анализе варијансе и Mann-Whitney-евог U теста.



Негативна контрола: 0 µM тулатромицина – K-; позитивна контрола: 100 µM H₂O₂ – K+. Истим словима су обележени третмани који се статистички значајно не разликују према резултатима Mann-Whitney-евог U теста.

Дијаграм је полулогаримски.

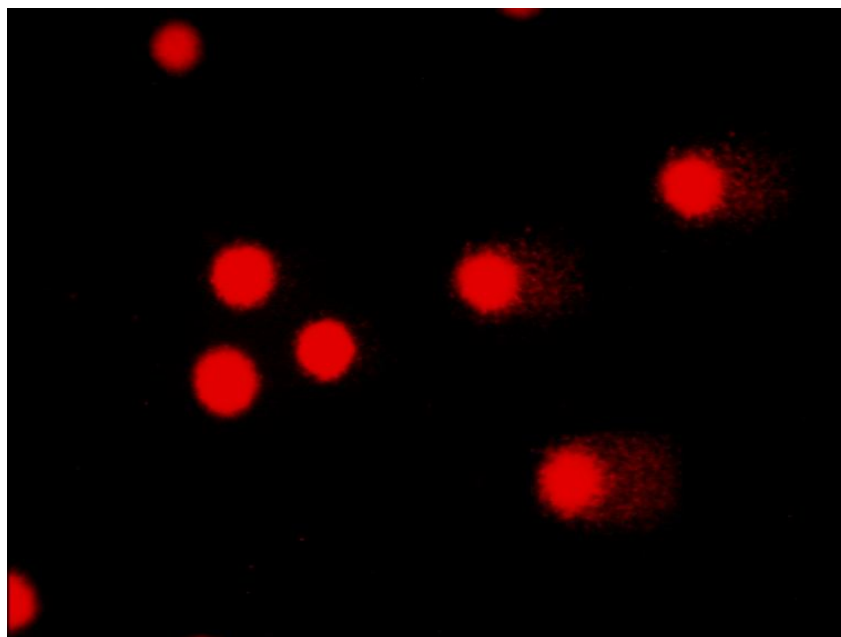
5.3. Утицај тулатромицина на оштећења ДНК у присуству каталазе

У циљу бољег разумевања механизма генотоксичног ефекта тулатромицина и могућег учешћа реактивних кисеоничних врста у испољавању генотоксичног ефекта тулатромицина, у комет тест смо увели антиоксидант, каталазу. Том приликом, одабрали смо концентрацију тулатромицина од 100 µM која је значајно индуковала оштећења ДНК молекулам у лимфоцитима пацова и пратили њен ефекат без присуства каталазе, као и у присуству каталазе у концентрацијама од 100 IU/mL или 500 IU/mL.

У овом експерименту, просечна вредности TCS кретала се од 4,0 при третману са каталазом у концентрацији од 500 IU/ml до 307,0 у позитивној контролној групи (табела 6). Како су подаци у свим узорцима били хомогени ($c_v < 30\%$), за просечне вредности биле су адекватне аритметичке средине, које су се кретале од 5,0 при третману са каталазом у концентрацији од 500 IU/ml до 297 у позитивној контролној групи.

С обзиром на вредности коефицијента варијације ($c_v < 30\%$), даље тестирање спроведено је применом параметријског теста. Резултати анализе варијансе ($F=440.379$, $p < 0.001$) указују да се просечне вредности TCS остварене под дејством испитиваних третмана статистички врло значајно разликују. Према резултатима Tukey-евог теста, разлика групног тестирања последица је

статистички врло значајне разлике између ефеката позитивне контроле и позитивне контроле са каталазом у концентрацији од 500 IU/ml у односу на све остале третмане (тулатромицин, тулатромицин са каталазом у концентрацији од 500 IU/ml, тулатромицин са каталазом у концентрацији од 100 IU/ml и негативна контрола). Резултати указују да нема статистички значајне разлике у ефекту третмана са тулатромицином у односу на третман са тулатромицином у котретману са каталазом (слика 5.), као и да не постоји статистички значајна разлика између ефеката третмана са тулатромицином у котретману са каталазом у концентрацији од 100 IU/ml у односу на третман са тулатромицином и каталазом у концентрацији од 500 IU/ml.



Слика 5. Комете без оштећења ДНК након третмана каталазом (500 IU/ml)

Према томе, каталаза у обе испитиване концентрације не редукује оштећења ДНК молекула настала дејством тулатромицина. Такође, не постоји статистички значајна разлика између ефекта третмана са каталазом у концентрацији од 500 IU/ml и ефекта негативне контроле, па закључујемо да каталаза није индуковала оштећења ДНК молекула што потврђује њен протективни ефекат. Резултати су приказани у табели 7 и графикону 3.

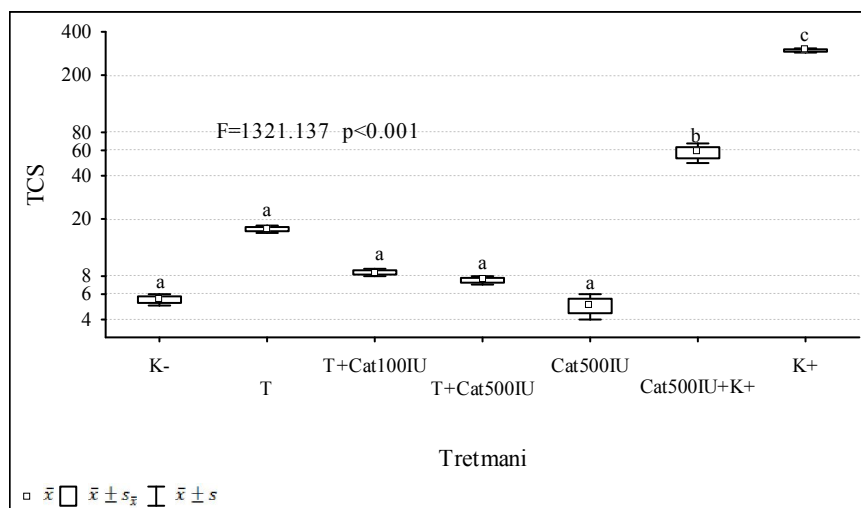
Табела 6. Основни статистички параметри TCS вредности у експерименту са тулатромицином у котретману са антиоксидансом, каталазом (n=3)

Третман	Медијана	Мин.-Макс.	Доњи квартил	Горњи квартил	Коефицијент варијације
Негативна контрола (К-)	5.50	5.00-6.00	5.00	6.00	9.09
Тулатромицин 100 μ M	17.00	16.00-18.00	16.00	18.00	5.88
Тул. + CAT 100IU/ml	8.50	8.00-9.00	8.00	9.00	5.88
Тул. + CAT 500IU/ml	7.50	7.00-8.00	7.00	8.00	6.67
CAT 500IU/ml	5.00	4.00-6.00	4.00	6.00	20.00
CAT 500IU/ml + K ⁺	58.00	49.00-67.00	49.00	67.00	15.52
Позитивна контрола (К+)	297.00	287.00-307.00	287.00	307.00	3.37

Табела 7. Нивои значајности разлика TCS вредности у контролама и третманима са тулатромицином у котретману са антиоксидансом каталазом, на бази Tukey-евог теста

Третман	T +CAT 500 IU/ml	T +CAT 100 IU/ml	CAT 500 IU/ml	CAT+K ⁺	K ⁺	K ⁻
T	0.829	0.885	0.659	0.008	< 0.001	0.695
T+CAT 500 IU/ml		≈1.000	≈1.000	0.002	< 0.001	≈1.000
T+CAT 100 IU/ml			0.998	0.003	< 0.001	0.999
CAT 500 IU/ml				0.002	< 0.001	≈1.000
CAT+K ⁺					< 0.001	0.002
K ⁺						0.001

Графикон 3. Ефекат тулатромицина (100 μM), каталазе (100 IU/ml и 500 IU/ml), негативне и позитивне контроле на редукцију оштећења ДНК



Негативна контрола: 0 μM тулатромицина – K-; позитивна контрола: 100 μM H_2O_2 – K+. Истим словима су обележени третмани који се статистички значајно не разликују према резултатима Tukey-евог теста.

\bar{x} : аритметичка средина, $S_{\bar{x}}$: стандардна грешка средине, s : стандардна девијација

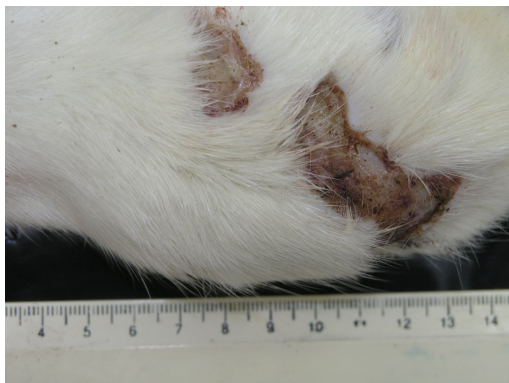
Дијаграм је полулогаримаски.

5.4. Резултати макроскопског прегледа органа и патохистолошког прегледа узорака ткива унутрашњих органа

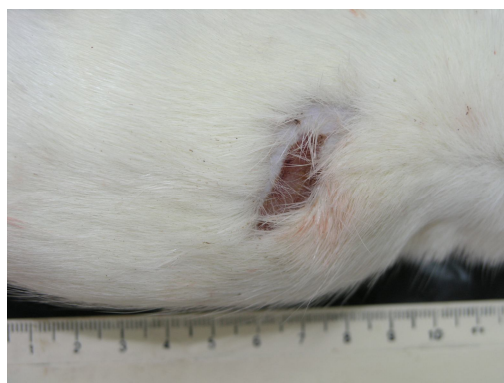
5.4.1. Макроскопски налаз на унутрашњим органима

Приликом макроскопског прегледа нису утврђене видљиве патоморфолошке промене на унутрашњим органима животиња из огледа.

У групи животиња која је примала највишу дозу тулатромицина Е4 током десетодневног огледа уочене су промене на кожи, на месту апликације лека. На месту апликације присутна су влажна некротична подручја, неправилног облика, сланинастог изгледа, чврсте конзистенције, величине 1 до 3 cm (слика 6 и слика 7).



Слика 6. Кожа пацова Е4 групе десет дана након третмана, некротичне промене на месту апликације лека



Слика 7. Кожа пацова Е4 групе, промене на месту апликације лека

5.4.2. Патохистолошки налаз

А) Резултати патохистолошког прегледа узорака ткива унутрашњих органа након десетодневног огледа

Јетра. У испитаним узорцима јетре пацова групе Ка не уочавају се патолошке промене. Хепатоцити су правилног облика, са хомогеном, светлоружичастом цитоплазмом и нормохроматичним једром. Хепатоцити су поређени у Ремакове гредице. У центру класичног јетриног режњића налази се централна вена. У портним подучјима се налазе жучни канал и огранци артерије и вене. Синусоидни капилари су испуњени мањим бројем еритроцита и Купферовим ћелијама округлог облика.

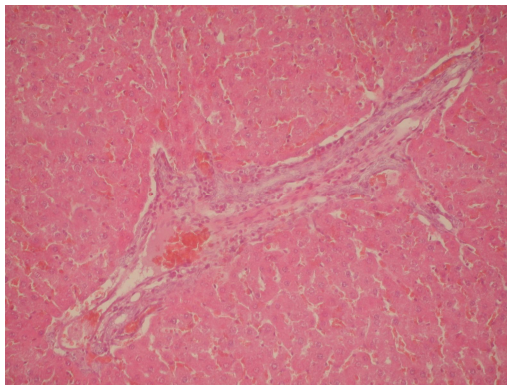
Узорци јетре пацова којима је апликован растварач тулатромицина (Ке) немају изражене патолошке промене и по морфологији одговарају узорцима јетре пацова који нису примали ништа.

У јетри пацова Е1 групе уочава се интрацелуларни едем хепатоцита. Хепатоцити су отечени, са замућеном цитоплазмом и маскираним једром. Ретки хепатоцити су захваћени вакуоларном дегенерацијом са централно постављеном вакуолом у цитоплазми услед чега је једро померено на периферију ћелије. Због отока хепатоцита синусоидни капилари су сужени и испуњени Купферовим ћелијама. У портним просторима се запажа умерено присуство мононуклеарног инфилтрата састављеног од лимфоцита, макрофага и плазма ћелија. У два узорка јетре уочавају се фокална некротична огњишта хепатоцита која су окружена Купферовим ћелијама као и хеморагична подручја.

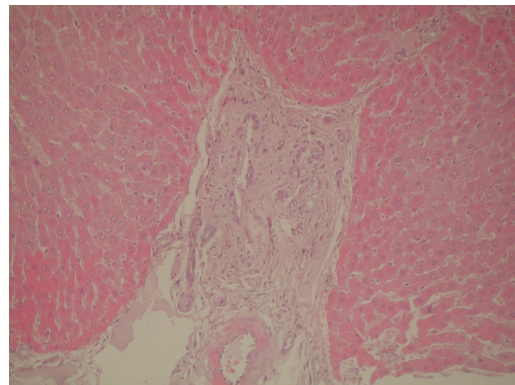
У узорцима јетре Е2 групе уочава се интрацелуларни едем хепатоцита. Синусоидни капилари су хиперемични, испуњени еритроцитима, мононуклеарним ћелијама и ретким еозинофилним гранулоцитима. Портни простори су инфилтровани малим бројем еозинофилних гранулоцита (слика 8).

Најизраженије промене у узорцима јетре Е3 групе су хиперемична крвних судова и портна фиброза. У портним подручјима се запажа повећана количина везивног ткива састављеног од фибробласта и колагених влакана (слика 9).

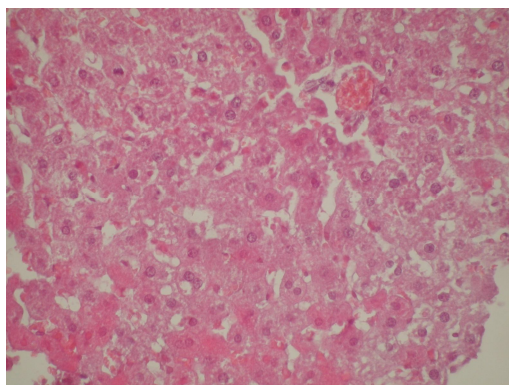
Хепатоцити у јетри пацова Е4 групе су местимично вакуолизовани услед вакуоларне дегенерације, а местимично са замућеном, фино зрнастом цитоплазмом и маскираним једром (слика 10). Поједини хепатоцити су некротизовани са изразито црвеном цитоплазмом, без једра или са једром које је захваћено пикнотичним променама. Сви крвни судови су изразито хиперемични, препуњени крвљу. У узорцима јетре из ове групе уочава се и местимична реакција Купферових ћелија које добијају троугласт, четвороугласт или овалан облик шта указује да су у различитим фазама активације.



Слика 8. Јетра пацова Е2 групе десет дана после третмана, портни простори инфилтровани еозинofilним гранулоцитима и ретким лимфоцитима, хепатоцити захваћени интрацелуларним едемом (ХЕ, 200Х).



Слика 9. Јетра пацова Е3 групе десет дана после третмана, умножавање везивног ткива у порталним просторима (ХЕ, 200Х).



Слика 10. Јетра пацова Е4 групе десет дана после третмана, хепатоцити са просветљеном, замућеном и местимично вакуолизованом цитоплазмом (ХЕ, 400Х).

Бубрези. У узорцима бубрега пацова Ка групе запажа се веома блага хиперемија крвних судова гломерула. Бовманова капсула је уобичајеног изгледа, без видљивих промена. Тубулоцити су правилног облика, са хомогеном цитоплазмом у којој се јасно уочава једро. Лумен тубула је празан. Крвни судови интерстицијума су умерено пуњени крвљу.

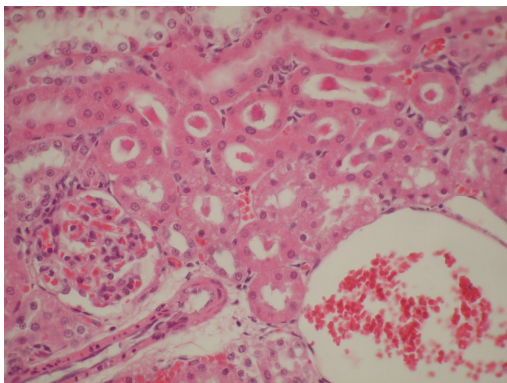
У узорцима бубрега пацова Ке групе примећује се јака хиперемија крвних судова гломерула и интерстицијума. У појединим деловима интерстицијума уочавају се хеморагична подручја. Тубулоцити имају просветљену цитоплазму.

Бубрези пацова Е1 групе имају изражене хеморагичне промене у интерстицијуму као и хиперемију крвних судова гломерула и интерстицијума. У интерстицијуму се местимично запажа периваскуларни едем. Тубулоцити су захваћени интрацелуларним едемом, са замућеном цитоплазмом. Због отока тубулоцита сужен је лумен тубула. У цитоплазми епителних ћелија субкортикалних тубула уочава се вакуолизација слабог интензитета.

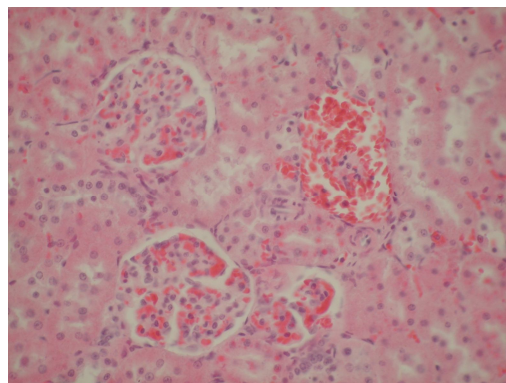
У крвним судовима интерстицијума и гломерула бубрега пацова Е2 групе изражена је хиперемија (слика 11). Такође је изражена вакуолизација епителних ћелија тубула смештених у субкортексу са тенденцијом ширења ка кортикалним тубулима. У лумену кортикалних тубула запажају се неорганизовани цилиндри хомогеног изгледа (слика 11), док се на епителним ћелијама ових тубула не уочавају патолошке промене. Епителне ћелије појединих проксималних тубула су отечене, са замућеном цитоплазмом и нејасном међућелијском границом.

Изразита хиперемија крвних судова интерстицијума и гломерула су основна промена и у бубрезима пацова Е3 групе. Периваскуларни простори су едемизирани и просветљени. Поред тога примећује се и вакуолизација цитоплазме епителних ћелија субкортикалних тубула, док је лумен тубула који се налазе на граници коре и сржи испуњен еритроцитима. У кори се налазе цистична проширења различите величине која су испуњена еритроцитима и одговарају хемоцистама.

Промене на бубрезима пацова Е4 групе су сличне променама које су описане на бубрезима пацова Е3 групе. Изражена је хиперемија крвних судова гломерула и интерстицијума (слика 12), са видљивим периваскуларним едемом. Тубулоцити су захваћени вакуоларном дегенерацијом.



Слика 11. Бубрег пацова Е2 групе десет дана после третмана, хиперемија крвних судова гломерула и интерстицијума, у лумену тубула хомогени неорганизовани цилиндри (ХЕ, 400Х)



Слика 12. Бубрег пацова Е4 групе десет дана после третмана, хиперемија крвних судова гломерула и интерстицијума (ХЕ, 400Х)

Тестиси. У тестисима Ка групе, пацови који нису примали ништа, уочава се нормална хистолошка грађа. Јасно се запажају семени каналићи са герминативним епителом који належе на базалну мембрану. Лумен семених каналића је испуњен умереним бројем сперматозоида. У интерстицијуму се запажају везивно-ткивна влакна и интерстицијалне Лајдигове ћелије.

Базална мембрана семених каналића у тестисима пацова Ке групе је очувана. У лумену појединих семених каналића код пацова из ове групе уочавају се ретки фокуси дегенерисаних ћелија као и присуство циновских ћелија. Сертолијеве ћелије појединих семених каналића су отечене, са замућеном цитоплазмом. У појединим крвним судовима интерстицијума изражена је хијалина дегенерација зида, са местимичним накупљањем Лајдигових ћелија око њих.

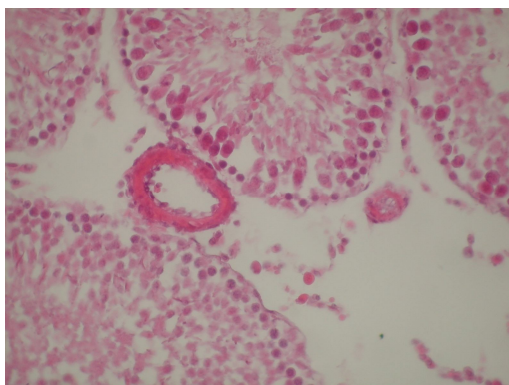
У тестисима пацова Е1 групе интерстицијум је слабо развијен са умноженим Лајдиговим ћелијама у њему. Поједини семени каналићи имају изражене дегенеративне промене, мутни су и непрозирни, са оштећеном базалном мембраном. Сертолијеве ћелије имају местимично изражену вакуолизацију цитоплазме.

Интерстицијум тестиса пацова Е2 групе је изразито едематозан и у њему се примећују крвни судови са задебљалим и хомогенизованим зидом што одговара фибриноидној дегенерацији (слика 13). Услед задебљања зида крвних судова

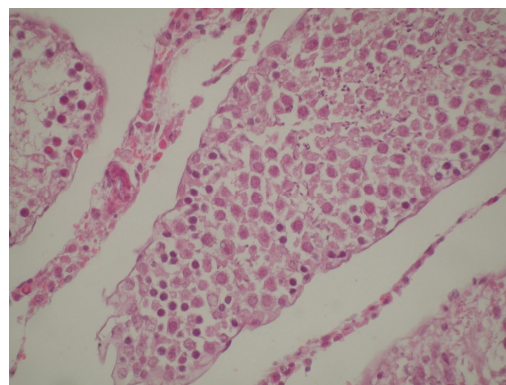
лумен је сужен. На базалној мембрани семених каналића примећују се промене различитог степена, од благог оштећења до потпуне деструкције (слика 13). Поједини семени каналићи су некротизовани, претворени у хомогену масу у којој се не уочавају ћелијске структуре. Сертолијеве ћелије су местимично вакуолизоване, а могу се уочити и некротичне промене.

Крвни судови интерстицијума у тестисима пацова Е3 групе су захваћени фибриноидном дегенерацијом и промене одговарају оним који су описаним код тестиса пацова Е2 групе. У семеним каналићима запажа се да појединачне Сертолијеве ћелије имају вакуолизовану цитоплазму, а спорадично се уочава и присуство двоједарних ћелија.

У тестисима пацова Е4 групе изражена је фибриноидна дегенерација и некроза крвних судова интерстицијума. Интерстицијум је рашчијан, са мноштвом лимфоцита и макрофага (слика 14) и фокалним крварењима. Лајдигове ћелије су едематозне. Сертолијеве ћелије су захваћене некротичним променама, претворене у беструктурну масу, а на једрима се уочавају некротичне промене. У појединим семеним каналићима се запажа присуство мултиједарних ћелија.



Слика 13. Тестис пацова Е2 групе десет дана после третмана, дегенерација герминативног епитела, зид крвних судова захваћен фибриноидном дегенерацијом (ХЕ, 400Х).



Слика 14. Тестис пацова Е4 групе десет дана након третмана, дегенеративне промене герминативног епитела, интерстицијум тестиса инфилтрован лимфоцитима и макрофагима (ХЕ, 400Х).

Срце. У узорцима ткива срца нетретираних пацова (Ка група) изражена је хиперемиа крвних судова који су проширени и испуњени крвљу. Ендомизијум је едематозан и просветљен. Мишићне ћелије су правилно поређане једна уз другу и у цитоплазми се јасно уочава нормохроматично једро.

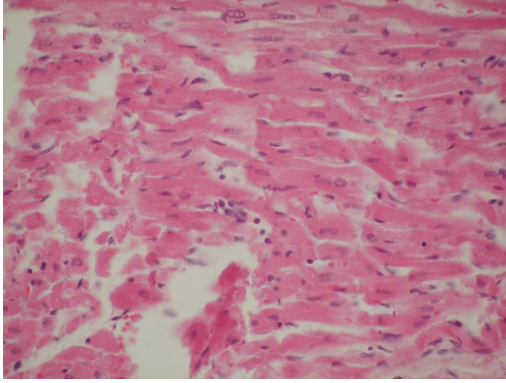
У узорцима срца пацова Ке групе уочава се да је ендомизијум рашчијан и местимично инфилтрован лимфоцитима и макрофагима. Зид крвних судова миокарда је задебљан, а око крвних судова уочава се умножено везивно ткиво састављено од фибробласта и колагених влакана. У миокарду се запајају хеморагична подручја слабог интензитета.

У узорцима срца пацова Е1 групе присутна су фокална некротична подручја мишићних ћелија око којих се налазе накупине мононуклеарних ћелијских елемената (слика 15). Између мишићних ћелија налазе се еритроцити ван крвног суда што указује на присутно крварење. Ендомизијум је едематозан, рашчијан и тешко уочљив, местимично инфилтрован мононуклеарним ћелијама. Већи крвни судови су препуњени крвљу, са израженим периваскуларним едемом.

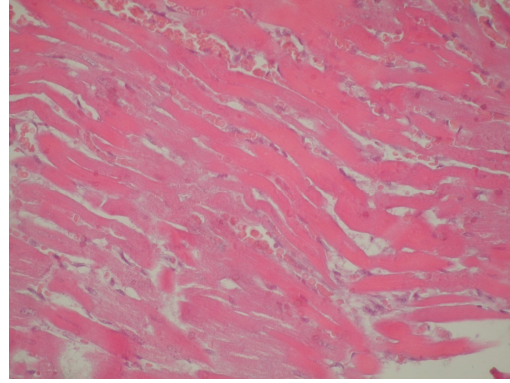
Од промена у срцу пацова Е2 групе уочавају се фокалне накупине масног ткива. Присутна су крварења у миокарду умереног интензитета. У поједним мишићним ћелијама се не уочава попречна пругавост, јер је саркоплазма хомогенизована, замућена и стакласто прозирна (слика 16). Зид крвних судова је задебљао и хомогенизован услед фибриноидне дегенерације.

Мишићне ћелије у срцу пацова Е3 групе су местимично хијализоване без видљиве попречне пругавости. У миокарду се уочавају крварења. Већи крвни судови су проширени, испуњени крвљу, са натеченим ендотелним ћелијама.

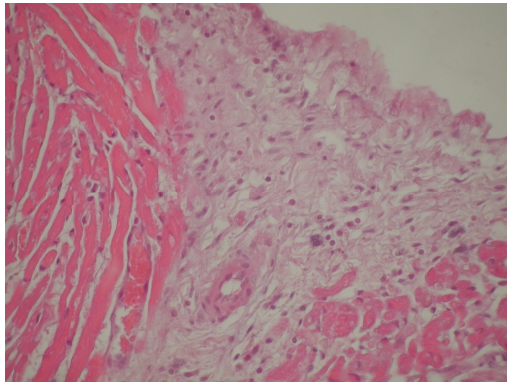
У исечцима ткива срца пацова Е4 групе такође се запажа местимичне хијалинизација саркоплазме. Крвни судови су хиперемични. У поједним исечцима се запајају везивно ткивна подручја инфилтрована лимфоцитима и макрофагима (слика 17).



Слика 15. Миокард пацова E1 групе десет дана након третмана, мање некротично подручје миокардиоцита праћено благим накупљањем лимфоцита и макрофага (ХЕ, 400Х).



Слика 16. Миокард пацова E2 групе десет дана после третмана, хомогенизација саркоплазме миокардиоцита услед чега они губе попречну пругавост, еритроцити између мишићних ћелија, ван крвног суда (ХЕ, 400Х).



Слика 17. Миокард пацова E4 групе десет дана после третмана, везивно-ткивно подручје инфилтровано ретким лимфоцитима и макрофагима (ХЕ, 400Х).

Плућа. У узорцима ткива плућа пацова апсолутне контролне групе видљиво је незнатно задебљање интералвеоларних септи и блага инфилтрација мононуклеарним ћелијама. Лумен алвеола је празан и у појединима се уочавају ретке алвеоларне макрофаге. У интерстицијуму и на крвним судовима се не запажају видљиве промене. Бронхије и бронхиоле су празне, са јасно видљивим епителом.

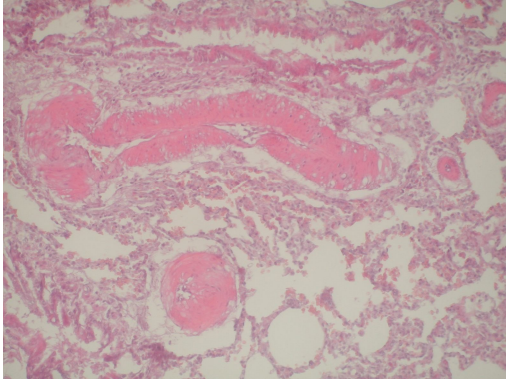
У плућима пацова контролне експерименталне групе изражен је едем интерстицијума. Крвни судови интерстицијума имају задебљао зид који је хијалинизован. Задебљање зида крвног суда у појединим доводи и до потупуне облитерације лумена. У лумену алвеола запажају се активирани алвеоларни макрофаге са панушавом цитоплазмом.

У узорцима плућа пацова Е1 групе запажају се крварења по интерстицијуму. Поред крварења везивно ткиво интерстицијума је едематозно и благо инфилтровано еозинофилним гранулоцитима. Зид крвних судова је задебљао, са израженом хијалинизацијом и отоком ендотелних ћелија, док је подручје око крвних судова захваћено периваскуларним едемом (слика 18). Поред ових промена на крвним судовима су изражени знаци васкулитиса и периваскулитиса у виду нагомилавања мононуклеарних ћелијских елемената (слика 18). Лумен алвеола је испуњен едемском течносту ружичасте боје.

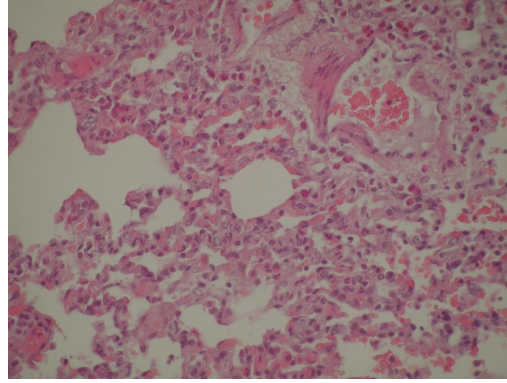
Промене у плућима код пацова Е2 групе по карактеру подсећају на оне описане код пацова Е1 групе, али су интензивније. Зид крвних судова је некротизован, са израженим периваскуларним едемом и инфилтрацијом лимфоцита, макрофага и плазма ћелија у и око зида крвних судова. Везивно ткивне септе, а нарочито перибронхијално везивно ткиво, је задебљало због инфилтрације мононуклеарним ћелијским елементима и еозинофилним гранулоцитима.

У плућима пацова Е3 групе најизраженије промене су установљене на крвним судовима интерстицијума. Зид крвних судова је некротизован, са делимичном хијалинизацијом и умножавањем глатко-мишићних ћелија у услед чега су поједини крвни судови потпуно облитерисани. Интерстицијум је инфилтрован еозинофилним гранулоцитима и лимфоцитима (слика 19) са местимично израженим крварењем, а у лумену алвеола запажају се активирани макрофаги са пенушавом цитоплазмом.

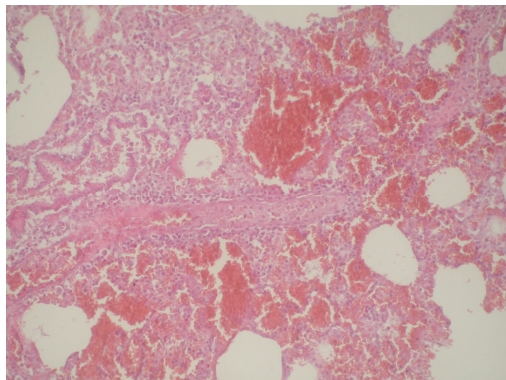
У узорцима плућа пацова Е4 групе запажају се масивна крварења у интерстицијуму и лумену алвеола (слика 20). Бронхиоле су захваћене десквамативним бронхиолитисом и њихов лумен је потпуно облитерисан и испуњен ћелијским детритусом.



Слика 18. Плућа пацова Е1 групе десет дана после третмана, зид крвних судова задебљан, са израженом хијалинизацијом и вакуолизацијом, око крвног суда запажа се периваскуларни едем и местимично нагомилавање лимфоцита, макрофага и плазма ћелија (ХЕ, 200Х).



Слика 19. Плућа пацова Е3 групе десет дана после третмана, задебљање интраалвеоларних септи услед инфилтрације лимфоцитима и еозинофилним гранулоцитима (ХЕ, 400Х).



Слика 20. Плућа пацова Е4 групе десет дана после третмана, масивне хеморагије у интерстицијуму и лумену алвеола (ХЕ, 200Х).

Б) Резултати патохистолошког прегледа узорака ткива унутрашњих органа четрнаест дана након третмана

Јетра. У исечцима јетре пацова контролне групе који нису третирани запажа се нормална структура која се не разликује од јетре контролне групе пацова после десетодневног третмана. У узроку јетре код једног пацова уочава се блага централобуларна хиперемја.

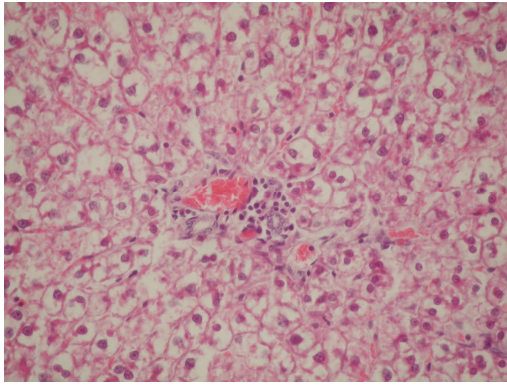
У узорцима јетре пацова Ке групе поједини хепатоцити показују благу вакуолизацију цитоплазме. Једра хепатоцита су очувана. Поједини лобулуси показују централобуларну хиперемiju.

У јетри пацова Е1 групе изражена је хиперемја централне вене, крвних судова у портним просторима и синусоидних капиlara. Поједини хепатоцити имају замућену или ситнозрнасту цитоплазму, а поједини, нарочито они постављени централобуларно, имају изражену вакуолизацију цитоплазме. Портни простори су инфилтровани лимфоцитима и макрофагима.

Сви крвни судови у јетри пацова Е2 групе су хиперемични, испуњени крвљу. Дифузно у јетрином режњићу изражена је вакуолизација цитоплазме хепатоцита због чега је једро померено на периферију ћелије (слика 21). У појединим исечцима запажају се дисеминована некротична подручја инфилтрована лимфоцитима и макрофагима. У једном исечку приметно је умножавање жучних каналића у портним просторима.

У јетри пацова Е3 групе такође је изражена хиперемја крвних судова. Хепатоцити имају замућену или вакуолизовану цитоплазму и маскирано једро. У портним просторима се уочава лимфоплазмоцитни инфилтрат благог интензитета.

У узорцима јетри пацова Е4 групе примећује се хиперемја крвних судова. Хепатоцити су захваћени мутним бубрењем или вакуоларном дегенерацијом. У синусоидним капиларима се уочавају бројне Купферове ћелије у различитим фазама активације.



Слика 21. Јетра пацова Е2 групе четрнаест дана од завршетка третмана, изражена вакуолизација цитоплазме хепатоцита, портални простор благо инфилтрован лимфоцитима (ХЕ, 400Х).

Бубрези. У узорцима бубрега Ка групе после четрнаестодневног третмана запажа се уобичајена хистолошка грађа која одговара опису бубрега код контролних пацова после десетодневног третмана.

У бубрезима пацова Ке групе уочава се местимично замућење цитоплазме епитела супкортикалних тубула. У осталим структурама бубрега не запажају се патолошке промене.

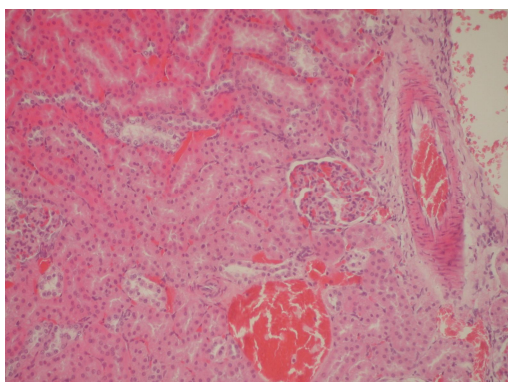
Код пацова Е1 групе уочава се вакуолизација цитоплазме епитела субкортикално постављених тубула. У интерстицијуму присутна је хиперемична крвних судова и периваскуларни едем. Глатко-мишићне ћелије крвних судова интерстицијума су умножене са вакуолизованом цитоплазмом. Крвни судови гломерула су хиперемични. У појединим узорцима бубрега пацова из ове групе јасно се уочавају цистична проширења у кортексу која су испуњена крвљу.

У узорцима бубрега пацова Е2 групе такође је присутна вакуолизација цитоплазме субкортикалних тубула услед чега је лумен тубула незнатно сужен. Интерстицијум је едематозан и местимично инфилтрован лимфоцитима, макрофагима и плазма ћелијама. У појединим узорцима се запажа крварење у пределу интерстицијума (слика 22). Крвни судови интерстицијума имају задебљао зид због умножавања глатко-мишићних ћелија у средишњем слоју (слика 22). Поједине глатко-мишићне ћелије имају вакуолизовану цитоплазму. Слично као и

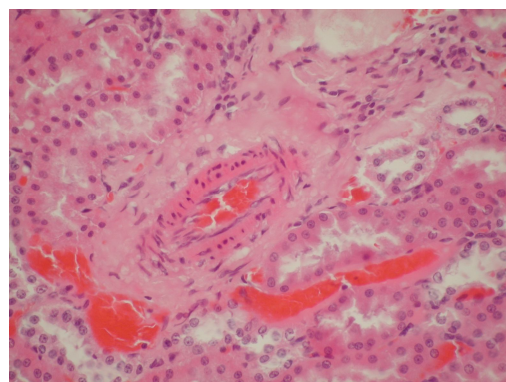
у узорцима бубрега пацова Е1 групе уочавају се корикалне хемоцисте и хиперемија крвних судова гломерула (слика 22).

У бубрезима пацова Е3 групе запажају се сличне промене као и оне описане у бубрезима пацова Е2 групе, само нешто већег интензитета. Приметна је вакуолизација цитоплазме тубулоцита и смањење лумена тубула. Сви крвни судови у бубрегу су хиперемични, а крвни судови интерстицијума имају изражен периваскуларни едем (слика 23). Крвни судови интерстицијума су задебљали и местимично хомогенизовани. У кори се запажају хемоцисте округлог до овалног облика, различите величине.

У узорцима бубрега пацова Е4 групе примећује се јака хиперемија крвних судова интерстицијума и гломерула. Тубулоцити су вакуолизовани. У интерстицијуму се запажа задебљање зида крвних судова због умножавања глатко-мишићних ћелија, а у везивно-ткивном подручју интерстицијума се запажају крварења.



Слика 22. Бубрег пацова Е2 групе четрнаест дана од завршетка третмана, хеморагије и хиперемија у интерстицијуму, задебљање зида крвних судова интерстицијума, хиперемија гломерула, кортикалне хемоцисте (ХЕ, 200Х).



Слика 23. Бубрег пацова Е3 групе четрнаест дана од завршетка третмана, хиперемија крвних судова интерстицијума праћена периваскуларним едемом (ХЕ, 400Х).

Тестиси. У тестисима пацова Ка групе уочава се нормална хистолошка грађа без изражених патолошких промена.

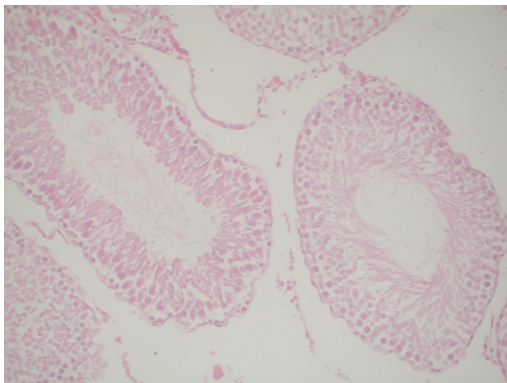
У тестисима пацова Ке групе видљива су блага крварења у интерстицијуму. Семени каналићи су очувани са стабилном базалном мембраном. У лумену се уочавају сперматозоиди у различитим фазама зрелости.

Тестиси пацова Е1 групе показују нешто интензивнија крварења у интерстицијуму. Поред еритроцита и непромењених Леудигових ћелија у интерстицијуму се уочавају и појединачне мултиједарне циновске ћелије. Крвни судови интерстицијума имају задебљао и хомогенизован зид, а појединим је услед тога потпуно облитерисан лумен. Периваскуларно ткиво је едематозно. Структура семених каналића је очувана, али су поједине Сертолијеве ћелије дегенерисане и отечене са замућеном цитоплазмом. У лумену семених каналића се налази уобичајен садржај.

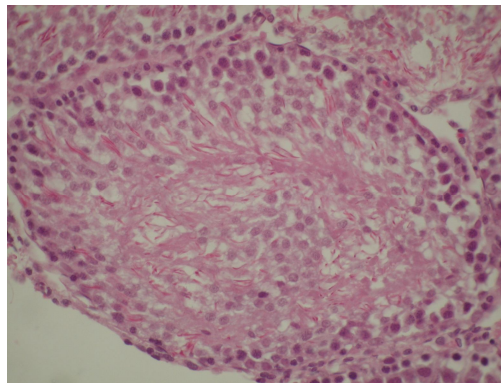
У узорцима тестиса пацова Е2 групе уочава се дегенерација појединих семених каналића. Зид крвних судова интерстицијума је задебљао и хијалинизован са бројним глатко-мишићним ћелијама. Лумен појединих семених каналића је потпуно празан (слика 24), а на Лајдиговим ћелијама се не запажају патолошке промене.

У тестисима пацова Е3 групе примећује се едем интерстицијума са налазом еритроцита у њему. На појединим семеним каналићима јасно се уочава дегенерација и некроза ћелија герминативног епитела и местимичним прекидом континуитета базалне мембране.

Поједини семени каналићи у тестисима пацова Е4 групе су очувани, док је у неким разорена базална мембрана. У лумену неких семених каналића запажа се некротични садржај, хомогеног изгледа и црвене боје измешан са задржаним сперматозоидима (спермостаза) (слика 25). Крвни судови интерстицијума су хиперемични и препуњени еритроцитима.



Слика 24. Тестис пацова Е2 групе четрнаест дана након завршетка третмана, дегенерација герминативног епитела, лумен семених каналића потпуно празан (ХЕ, 200Х).



Слика 25. Тестис пацова Е4 групе четрнаест дана од звршетка третмана, лумен семених каналића испуњен некротичним садржајем и сперматозоидима (ХЕ, 400Х).

Срце. У срцу пацова Ка групе уочава се блага хиперимија крвних судова. Мишићне ћелије су правилно поређане и на њим, као и на ендомизијуму се не уочавају патолошке промене.

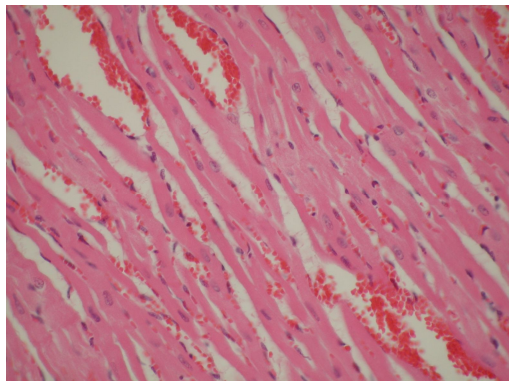
У узорцима срца пацова Ке групе запажа се блага инфилтрација перивакуларних простора лимфоцитима и макрофагима. У миокарду и перикарду уочава се налаз еритроцита ван крвног суда.

У срцу пацова Е1 групе уочавају се хеморагије у миокарду (слика 26) и перикарду благог интензитета. У миокарду мишићне ћелије су местимично отечене и губе попречну пругавост. Цитоплазма ових ћелија је хомогена, беструктурна и еозинофилна. У периваскуларним просторима се уочавају ретки мононуклеарни ћелијски елементи.

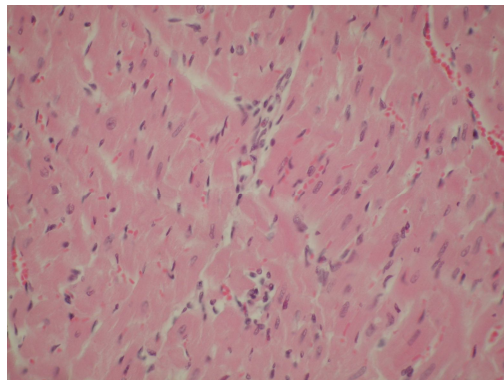
У миокарду и перикарду пацова Е2 групе се такође уочавају благе хеморагије. Између миокардиоцита уочавају се лимфоцити, макрофаги и плазма ћелије (слика 27). Крвни судови интерстицијума су хиперемични.

Налаз на срцу код пацова Е3 групе у многоме подсећа на налаз на срцу код пацова из Е2 групе. Мишићне ћелије су отечене, са местимично хомогенизованом цитоплазмом услед чега се не уочава попречна пругавост. Присутне су хеморагије по миокарду, док се између мишићних ћелија уочавају инфилтрати мононуклеарним ћелијским елементима и хиперимија крвних судова интерстицијума.

У срцу пацова Е4 групе изражена је местимична хомогенизација саркоплазме мишићних ћелија. У миокарду, између мишићних ћелија запажа се мноштво еритроцита изашлих из крвних судова.



Слика 26. Миокард пацова Е1 групе четрнаест дана од завршетка третмана, еритроцити између мишићних влакана (ХЕ, 400Х).



Слика 27. Миокард пацова Е2 групе четрнаест дана од завршетка третмана, дифузно нагомилавање мононуклеарних ћелијских елемената између мишићних ћелија (ХЕ, 400Х).

Плућа. У плућима пацова Ка групе уочава се уобичајена хистолошка грађа која се не разликује од оне која је описана код пацова после десетодневног третмана. У узорку плућа код једног пацова запажа се хиперемија крвних судова интерстицијума и интералвеоларних септи.

У узорцима плућа пацова Ке групе присутно је благо задебљање интералвеоларних септи због инфилтрације мононуклеарним ћелијским елементима. Крвни судови интерстицијума и интералвеоларних септи су хиперемични са израженим периваскуларним едемом.

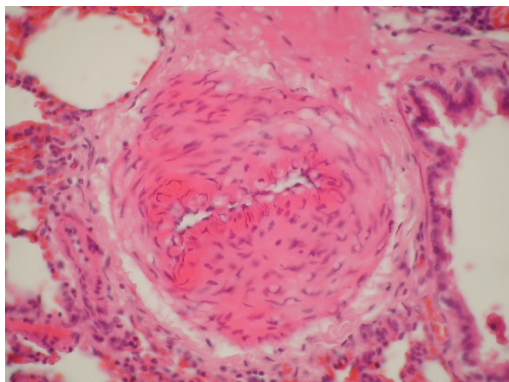
Плућа пацова Е1 групе имају изражено задебљање зида крвних судова интерстицијума због умножавања глатко-мишићних ћелија. Интералвеоларне септе су задебљале и инфилтроване лимфоцитима и макрофагима. Исти инфилтрат је присутан и у периваскуларним просторима. У лумену појединих алвеола присутна је едемска течност.

У плућима пацова Е2 групе зид крвних судова интерстицијума је задебљао и у њему се уочава да су глатко-мишићне ћелије умножене са делимично

вакуолизованом саркоплазмом. У лумену бронхиола и алвеолама се уочава едемска течност.

Интерстицијум интералвеоларних септи у плућима пацова Е3 групе је обилно инфилтриран моноклеарним ћелијама. У перивакуларним и перибронхијалним просторима је приметно повећано присуство везивног ткива које је инфилтрирано лимфоцитима и макрофагима. Крвни судови интерстицијума су изразито задебљали због умножавања глатко-мишићних ћелија тако да је лумен појединих крвних судова потпуно облитерисан (слика 28).

Плућа пацова Е4 групе имају хиперемичне крвне судова интерстицијума и интералвеоларних септи. У зиду крвних судова запажа се хиперплазија глатко-мишићних ћелија у средишњем слоју као и местимична хијалинизација зида крвних судова. Интерстицијум интералвеоларних септи, перивакуларних и перибронхијалних простора је инфилтриран моноклеарним ћелијским елементима.



Слика 28. Плућа пацова Е3 групе четрнаест дана од завршетка третмана, облитерација крвног суда интерстицијума због умножавања глаткомишићних ћелија (ХЕ, 400Х).

6. ДИСКУСИЈА

Тулатромицин је први члан триамилида, релативно нове класе макролидних антибиотика, првенствено намењен за третман бактеријских респираторних инфекција код говеда и свиња (Benchaoui и сар., 2004; Nowakowski и сар., 2004; Evans, 2005). Акумулира се у полиморфонуклеарним леукоцитима и алвеоралним макрофагима, укључује у имуни одговор на инфекцију у плућима, и полако ослобађа у екстрацелуларни простор где директно утиче на патогене микроорганизме, узрочнике респираторних обољења (Zhanel и сар., 2001; Evans, 2005; Kilgore и сар., 2005). Поред тулатромицина, у ветеринарској медицини, следећи макролиди су дозвољени за употребу у Европској унији: еритромицин, гамитромицин, спирамицин, тилдипирозин, тилозин, тилмикозин и тилвалозин (ЕМЕА, 2011).

Макролиди су антибиотици који се релативно добро подносе, али могу имати и значајне нежељене ефекте. Најчешће су описани поремећаји функције гастроинтестиналног тракта (мучнина, повраћање, абдоминални бол, дијареја).

Бројна истраживања показују да супкутана апликација тулатромицина у терапијској дози може да изазиве пролазни бол и оток на месту убризгавања лека код говеда, који може перзистирати до 30 дана (ЕМЕА, 2004). Истраживања показују да дозе које су 5 и више пута веће од терапијске могу довести до конгестије, едема, фиброзе, хеморагија, грануломатозне инфламације, субакутне инфламације и васкуларне тромбозе на месту убризгавања лека (Freedom of Information Act, 2005). Код свиња доза од 12,5 mg/kg доводи до црвенила на месту апликације лека које касније нестаје (Zhao и сар., 2011). Код коза доза од 25 mg/kg такође изазива пролазни бол на месту убризгавања лека (Washburn и сар., 2007). У нашем истраживању, доза од 75 mg/kg довела је до промена на месту убризгавања лека у виду влажних некротичних подручја, неправилног облика, сланинастог изгледа и чврсте конзистенције, величине 1 до 3 cm. Претпостављамо да су наведене промене настале због убризгавања велике количине лека на једном месту или због чињенице да је тулатромицин слаба база при физиолошком рН (Freedom of Information Act, 2005; Washburn и сар., 2007).

Веома значајни нежељени ефекти макролида су хепатотоксичност (Eisenberg и сар., 1994; Ег и сар., 2011; Zhihui Hao и сар., 2012), ототоксичност и кардиотоксичност (Anadon и сар., 1999; Abu-Gharbieh и сар., 2004; Daihong и сар., 2010; Ег и сар., 2011).

6.1. Генотоксични ефекти тулатромицина код пацова

Подаци о цитотоксичним ефектима макролидних антибиотика, врло су оскудни. У једном истраживању, цитотоксични тест је изведен на култури хуманих ћелија јетре (*Chang* ћелије јетре) са три полусинтетска макролидна антибиотика (рокситромицин, кларитромицин и азитромицин) и три стара макролида (еритромицин карбонат, еритромицин естолат и еритромицин база). Цитотоксичност поменутих лекова, примењеним у клинички релевантним концентрацијама, испитивана је МТТ тестом (способност ћелија да редукују МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид). Резултати указују да су макролиди старије генерације цитотоксичнији него полусинтетски макролиди (кларитромицин и рокситромицин), док се азитромицин показао као једнако или чак мање токсичан од еритромицин базе (Viluksela и сар., 1996).

У другом истраживању, изршена је евалуација цитотоксичности макролидних антибиотика (тилмикозин, тилозин и спирамицин), примењеним у различитим концентрацијама, на различитим културама ћелија *in vitro*. Експеримент је изведен на *VERO* ћелијама – ћелије бубрега *Macacus rhesus*, *FE* ћелијама (ембрионалне ћелије мачке) и *BHK 21* ћелијској линији бубрега младог хрчка. Резултати указују на негативан ефекат макролидних антибиотика на вијабилност и услове живота ћелија, као и да су *BHK* ћелије најосетљивије од тестираних ћелија (Fülörová и сар., 2012).

Генотоксичне супстанце су оне које испољавају свој нежељени ефекат тако што доводе до оштећења молекула ДНК што може да проузрокује мутације, а настанак мутација може да води ка малигној трансформацији ћелије (Galloway, 1994).

У овом истраживању, применом *in vitro* комет теста као релативно нове методе за анализу ДНК оштећења и поравки, утврђено је да највише

концентрације (50 μM и 100 μM) тулатромицина доводе до генотоксичних ефеката тако што значајно повећавају ниво ДНК оштећења у поређењу са негативном контролом. Ови резултати у сагласности су са налазима Washburn и сарадника (2007), који су показали да тулатромицин поседује генотоксични потенцијал. Оглед је вршен на козама, а тулатромицин је апликован субкутано у дози од 25 mg/kg (доза десет пута већа од терапијске). Узорци крви прикупљани су седам дана пре почетка огледа, дан пре почетка огледа, дан након апликације лека и седам дана након апликације лека. Употребом проточне цитометрије праћена је разлика у садржају ДНК молекула у ћелијама и вршена евалуација генотоксичности. Коефицијент варијације коришћен је као главни параметар, јер је у доброј колерацији са другим мерама индукције хромозомских аберација. Резултати указују на пораст коефицијента варијације садржаја ДНК са сваким наредним узорковањем и значајно вишу средњу вредност у поређењу са контролом. Њихови резултати сугеришу потребу за даљим генотоксиколошким испитивањима овог лека (Washburn и сар., 2007).

Неки литературни подаци указују да тулатромицин доводи до оксидативног стреса (Ег и сар., 2011). Оксидатини стрес представља стање ћелије које настаје при надвладавању ћелијских одбрамбених механизма производњом реактивних кисеоничних врста (ROS). ROS могу изазвати оштећења ДНК молекула, есенцијалних ензима и структурних протеина, али и покренути неконтролисани ланац реакција (као што је липидна пероксидација или реакције ауто-оксидације) (Ejchart, 2001; Covarrubias и сар., 2008). Антиоксидативни ензими имају улогу у уклањању различитих ROS (O'Brien, 2000; Maier и сар., 2002; Kirkman и сар., 2007). Показано је да тулатромицин повећава концентрацију серум малондиалдехида, азот оксида и супероксид дисмутазе, као и да смањује концентрацију антитромбина III у крви зечева и тиме доводи до поремећаја у коагулацији (Ег и сар., 2011).

Са циљем да се испита способност ћелија да поправе оштећења ДНК настала дејством тулатромицина, извели смо ко-третман са два ДНК инхибитора репарације: хидроксиуреа (HU) и цитозин арабинозид (AraC). AraC је инхибитор ДНК полимеразе која је укључена у процесе поправке ДНК, док је HU инхибитор рибонуклеотид редуктазе што даље доводи до пражења нивоа интрацелуларних

дезоксирибонуклеотида (Gedik и сар., 1991). Наши резултати сугеришу да нема значајне разлике између ефеката третмана са самим тулатромицином и третмана са инхибиторима, што значи да тулатромицин у лимфоцитима пацова не изазива оштећења ДНК молекула која се могу поправити ћелијским механизмима репарације. Сматрамо могућим да инхибиторно дејство НУ и АгаС опада након 30 минута или да су ћелије биле способне да компензују ову инхибицију и поправе прекиде у ДНК молекулу. Ово се можда догодило захваљујући брзом одговору ћелија који су омогућили заштиту путева поправке ДНК молекула од оксидативних оштећења посредованих тулатромицином.

У наставку истраживања, изведен је ко-третман са каталазом са циљем да се утврди да ли је ОН[•] индуковао оштећења ДНК молекула. Познато је да су каталазе ензими који штите ћелију од оштећења узрокованих дејством реактивних кисеоникових врста и то деградацијом водоник пероксида. На тај начин каталазе превенирају акумулацију ROS и њихово токсично дејство (Ejchart, 2001). Показали смо да каталаза не редукује оштећења ДНК настала дејством тулатромицина, што указује на то да каталаза не испољава протективни ефекат у овом случају. Међутим, постоји могућност да се водоник пероксид није формирао у реакцији тулатромицина и молекула кисеоника, и да је настала нека друга реактивна кисеонична врста (на пример супероксид анјон). Предлажемо даља истраживања, са неким другим антиоксидативним ензимом као што је супероксид дисмутаза, у циљу утврђивања неког другог механизма одговорног за оштећења ДНК молекула узрокована дејством тулатромицина.

Поређење резултата добијених у овом истраживању са раније објављеним подацима је врло тешко, због недовољно података о генотоксичном потенцијалу макролидних антибиотика, нарочито тулатромицина. Његов генотоксични ефекат установљен на лимфоцитима пацова не омогућава поређење *in vitro* и *in vivo* ефеката, јер је познато да се супстанце у живим организмима понашају другачије него при лабораторијским условима. Очекује се да ће употреба нових метода повећати осетљивост и специфичност већ постојећих.

6.2. Патоморфолошке промене код пацова након апликације тулатромицина

До сада је спроведен мали број студија безбедности примене тулатромицина на циљним врстама животиња. Код телади је забележена кардиотоксичност након једнократне примене тулатромицина у дозама од 12 mg/kg и 15 mg/kg. Ова кардиотоксичност праћена је мултифокалним дегенеративним променама на миокарду (ЕМЕА, 2004). Једно истраживање изведено на кунићима, показало је да доза од 10 mg/kg телесне масе доводи до значајног повећања концентрације серумског тропонина I (TnI) и изоензимске форме креатин киназе (СК-МВ), специфичних маркера оштећења срца. У истом истраживању сугерише се да ова кардиотоксичност тулатромицина вероватно настаје услед блокаде K^+ канала у срцу (Ег и сар., 2011). У овом докторату установљене хистопатолошке промене на срцу потврђују раније показан кардиотоксичан ефекат тулатромицина када се примени у високим дозама. Крвни судови срца пацова свих експерименталних група били су изразито хиперемични, док је степен оштећења кардиомиоцита растао са порастом примењене дозе лека.

Једно истраживање са азитромицином, који је хемијски врло сличан тулатромицину (ЕМЕА, 2004), показало је да азитромицин у дози од 5,6 mg/kg доводи до благе перипорталне инфилтрације мононуклеарних ћелија, док у дози од 11,2 mg/kg доводи до синусоидалне и порталне конгестије са благом инфилтрацијом монуклеарних ћелија код пацова (Olayinka и сар., 2013). У нашем истраживању, код група које су примала тулатромицин у дози од 2,5 mg/kg и 7,5 mg/kg установљен је најнижи степен хистопатолошких промена у виду едема хепатоцита уз умерено присуство мононуклеарног инфилтрата и хиперемije синусоидних капилара, док је у групи која је примала дозу од 75 mg/kg установљен највиши степен промена у виду вакуоларне дегенерације, па чак и некрозе појединих хепатоцита и изразите хиперемije крвних судова. До сада није објашњено на који начин макролидни антибиотици доводе до оштећења јетре. У обзир се узимају претпоставке да до оштећења долази услед цитотоксичног дејства макролида (Periti и сар., 1993; Fülöpová и сар., 2012) и хиперсензитивне реакције организма на ову групу лекова (Periti и сар., 1993). Сматра се да основни механизам хепатоцелуларног оштећења представља способност макролида да

смање површинску активност и на тај начин доведу до оштећења ћелијске мембране (Dujovne, 1978).

У истом истраживању Olayinka и сарадници (2013) потврдили су налаз протеинских формација у лумену тубула бубрега након примене азитромицина у дози од 5,6 mg/kg, док су озбиљна конгестија кортекса и присуство хеморагија као и налаз протеинских формација у лумену тубула потврђени након примене азитромицина у дози од 11,2 mg/kg код пацова (Olayinka и сар., 2013). Прегледом узорака бубрега пацова из нашег огледа установљене су сличне хистопатолошке промене. Тако су у групама која је примала тулатромицин у дози од 2,5 mg/kg и 7,5 mg/kg установљене хеморагије по интерстицијуму и хиперемија крвних судова, интрацелуларни едем епителних ћелије тубула субкортекса са тенденцијом ширења ка кортикалним тубулима, док је у групама које су добијале лек у дози од 25 mg/kg и 75 mg/kg установљена изразита хиперемија крвних судова гломерула и интерстицијума са периваскуларним едемом уз налаз цистичних проширења у кори бубрега.

Према резултатима истраживања Xiugong и сарадника, као последица примене макролидних антибиотика у високим дозама током дужег временског периода могу се испољити нежељени ефекти на респираторном систему (Xiugong и сар., 2011) праћени повећаном количином ексудата у трахеи, некрозом епитела и инфилтрацијом неутрофилних гранулоцита. У нашем истраживању утврђено је задебљање крвних судова плућа са изразитом хијалинизацијом и вакуолизацијом уз периваскуларни едем и нагомилавање мононуклерног инфилтрата код пацова из групе која је добијала 2,5 mg/kg тулатромицина, а у групи која је добијала 25 mg/kg тулатромицина некроза зида крних судова, задебљање интраалвеоларних септи услед инфилтрације еозинофилним гранулоцитима и лимфоцитима са местимичним крварењем. Код групе пацова која је добијала највишу дозу лека (75 mg/kg) установљене су најдрастичније хистопатолошке промене (масивна крварења у интерстицијуму и лумену алвеола и десквамативни бронхиолитис са потпуном облитерацијом њиховог лумена). Присуство еозинофилних гранулоцита би могле бити последица хиперсензитивне реакције организма на овај лек (Periti и сар., 1993).

Хистопатолошке промене на тестисима које смо установили у нашем раду, због недостатка литературних података није могуће поредити са резултатима других истраживача. Према резултатима до којих смо дошли тулатромицин већ у терапијској дози доводи до дегенеративних промена на семеним каналићима пацова уз оштећење базалне мембране. Са порастом примењене дозе, утврђен је виши степен оштећења герминативног епитела. Сматрамо значајним да се помену изражене промене крвних судова интерстицијума тестиса који су код групе пацова која је добијала дозу од 25 mg/kg тулатромицина били захваћени фибриноидном дегенерацијом, док су код групе која је добијала 75 mg/kg тулатромицина били захваћени некрозом.

Четрнаест дана након завршетка десетодневног огледа, извршена је евалуација потенцијалних процеса репарације на оштећеним органима. Установљене хистопатолошке промене код пацова указују да до репарације није дошло, већ су се промене задржале у степену који је био и по самом завршетку огледа. Ови резултати у складу су са чињеницом да је концентрација тулатромицина у унутрашњим органима и ткивима (јетра, бубрези, мишићи, масно ткиво, место апликације лека) код свиња и говеда две недеље након примене дупло нижа од оне која се постигне пет дана након примене лека (ЕМЕА, 2004), али је она и даље висока и довољна да доведе до промена које смо забележили код пацова.

Установљено је да тулатромицин може да изазове оксидативни стрес и поремећај коагулације. Његова примена доводи до повећања малондиалдехида, оксида нитрата, супероксид дисмутазе и креатин киназе (СК-МВ), као и до смањења концентрације антитромбина III (Ег и сар., 2011). На тај начин, може се претпоставити да су установљене хистопатолошке промене на испитиваним органима последица формирања високо реактивних кисеоникових врста. Реактивне кисеоникове врсте нарушиле су нормалну функцију ћелија или дошло до нарушавања функција антиоксидативног система.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу експерименталних резултата евалуације потенцијалних генотоксичних ефеката и патоморфолошких промена код пацова након примене тулатромицина, можемо извести следеће закључке:

- највише концентрације (50 μM и 100 μM) тулатромицина доводе до генотоксичних ефеката након 30 минута тако што значајно повећавају ниво ДНК оштећења у лимфоцитима пацова у поређењу са негативном контролом;
- с обзиром да инхибитори репарације (хидроксиуреа и цитозин арабинозид) нису повећали степен оштећења ДНК молекула у котретману са негативном контролом, инхибитори репарације нису повећали сензитивност комет теста у овом релативно кратком (30 мин) временском периоду њиховог дејства;
- антиоксиданс (каталаза) не редукује оштећења ДНК настала дејством тулатромицина, односно не испољава протективни ефекат;
- тулатромицин примењен у највишој дози (75 mg/kg) субкутано током десет дана доводи до значајних некротичних промена на месту апликације;
- тулатромицин примењен у испитиваним дозама (2,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 25 mg/kg и 75 mg/kg) доводи до едема, вакуоларне дегенерагације и некрозе ћелија, хиперемije крвних судова, хијалинизације и вакуолизације зида крвних судова, хеморагија по интерстицијуму на унутрашњим органима (јетра, бубрези, срце, плућа и тестиси) код пацова. На основу установљених хистопатолошких промена, може се претпоставити да са порастом примењене дозе лека расте и степен оштећења на испитиваним органима;

- хистопатолошке промене на јетра, бубрези, срце, плућа и тестисима указују да не долази до репарације након две недеље после апликације тулатромицина;
- резултати наших истраживања указују да постоји вероватноћа да до оштећења ћелија долази услед цитотоксичног дејства овог лека.

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Abo-El-Sooud K., N. A. Afifi, A. M. Abd-El-Aty (2012) Pharmacokinetics and bioavailability of tulathromycin following intravenous, intramuscular and subcutaneous administrations in healthy rabbits, *Veterinary World*, 5(7): 424-428
2. Abu-Gharbieh E., Vasina V., Poluzzi E., De Ponti F. (2004) Antibacterial macrolides: a drugs class with a complex pharmacological profile, *Pharmaceutical Research* 50: 211-222
3. Anadon A., Reeve-Johnson L. (1999) Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implication for veterinary medicine, *Research in Veterinary Science* 66: 197-203
4. Andreoli K., Leopardi P., Rossi S., Crebelli R. (1999) Processing of DNA damage induced by hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate in human lymphocytes: analysis by alkaline single cell gel electrophoresis and cytogenetic methods, *Mutagenesis* 14 (5): 497-503
5. AFFSA (2009) French antimicrobial resistance monitoring program for bacteria of animal origin, Report 2007-2008, In Programme français 1999-2008 (AFFSA)
6. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) Peroxisomes, *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.), New York: Garland Science, ISBN 0-8153-3218-1
7. Al-Jumaily E.F., Al-Safar M.A. (2014) Hydrogen peroxide (H₂O₂) produced by *E. faecalis* in causing genomic instability determined by using comet assay, *International Journal of current microbiology and applied sciences* 3 (5): 919-925
8. Alvarez-Elcoro S., Enzler M.Z. (1999) The macrolides: erythromycin, clarithromycin and azithromycin, *Mayo Clinic Proceedings*, 74, 613-634.

9. Andini N., Nash K.A., (2006) Intrinsic macrolide resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is inducible, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 2560-2562.
10. Amsden G.W. (2001) Advanced-generation macrolides: tissue directed antibiotics, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, S11-S15.
11. Aoshiba K., Nagai A., Konno K. (1995) Erythromycin shortens neutrophil survival by accelerating apoptosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39:872–877
12. Ashby J. A., Tinwell H., Lefevre P. A., Browne M. A. (1995) The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* 10, 85
13. Bai J., Cederbaum A. I. (2003) Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53, *Journal of Biosciences* 278: 4660-4667
14. Bearden D.T., Rodvold K. A (1999) Penetration of macrolides into pulmonary sites of infection, *Infection in Medicine Journal* 16:480A–484A
15. Benchaoui H.A., Nowakowski M., Sherington J., Rowan T.G., Sunderland S.J. (2004) Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin in swine, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27: 203-210
16. Bijlani R.L. (1995) *Physiology of aging*, ed. Understanding Medical Physiology New Delhi, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, 1995: 38-42
17. Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhler S., Speit G. (2005) The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis* 20 (4) 245-54

18. Bryskier A., Butzler J.-P., (2003) Macrolides, In: Finch R.G., Greenwood D., Norrby S.R., Whitley R.J. (Eds.) Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy. Churchill Livingstone, Edinburgh.
19. Catry B., Haesebrouck F., Vlieghe S.D., Feyen B., Vanrobaeys M., Opsomer G., Schwarz S., Kruif A.D. (2005) Variability in acquired resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from the nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types, *Microbial Drug Resistance* 11, 387-394
20. Cartwright A.C., Mathews B.R. (1994) International pharmaceutical product registration: aspects of quality, safety and efficacy, New York: Ellis Horwood Limited; 1994
21. Chan K.M., Decker E.A. (1994) Endogenous skeletal muscle antioxidants, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34: 403-426
22. Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. (2004) Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (2): 192–208
23. Clothier K.A., Jordan D.M., Loynachan A.T., Griffith R.W. (2010) Safety evaluation of tulathromycin use in the caprine species: tulathromycin assessment in goats, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, doi 10.1111/j.1365-2885.2010.01178.x
24. Clothier K.A., Leavens T., Griffith R.W., Wetzlich S.E., Baynes R.E., Riviere J.E., Tell L.A. (2011) Pharmacokinetics of tulathromycin after single and multiple subcutaneous injections in domestic goats (*Capra aegagrus hircus*), *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34: 448–454
25. Cochrane C.G. (1991) Cellular injury by oxidants, *The American Journal of Medicine* 91:23S–30S

26. Collins A.R., Gedik C.M., Olmedilla B., Southon S., Bellizzi M. (1998) Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates, *The FASEB Journal* 12, 1397–140
27. Collins A.R. (2002) The comet assay. Principles, applications and limitations, *Methods in Molecular Biology* 203: 163-177
28. Collins A.R. (2004) Comet assay for DNA damage and repair, *Molecular Biotechnology* 26: 249–261
29. Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *The FASEB Journal* 17:1195–1214
30. Covarrubias L., Hernández-García D., Schnabel D., Salas-Vidal E., Castro-Obregón S. (2008) Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active?, *Developmental Biology* 320: 1–11
31. Daihong G., Yun C., Dong C., Beibei L., Nan B., Rui W. (2010) The cardiotoxicity of macrolides: a systematic review, *Pharmazie* 65: 631-640
32. Demolis J.L., Vacheron F., Cardus S. (2003) Effect of single and repeated oral doses of telithromycin on cardiac QT interval in healthy subjects, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 73: 242–52
33. Diaz-Llera S., Gonzalez-hernandez Y., Prieto-Gonzalez E.A., Azoy A. (2002) Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes, *Mutation Research*, 517: 13-20
34. Dizdaroglu M. (1998) Mechanisms of free radical damage to DNA, In *DNA & Free Radicals: Techniques, Mechanisms & Applications* (Aruoma, O. I. H., edition) pp. 3–26, OICA International, Saint Lucia

35. Djelić N., Anderson D. (2003) The effect of the antioxidant catalase on oestrogens, triiodothyronine and noradrenaline in the Comet assay, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 23: 69-81
36. Dujovne C.A. (1978) Hepatotoxic and cellular uptake interaction among surface active components of erythromycin preparation, *Biochemical Pharmacology* 27: 1925-30
37. Eisenberg E., Barza M. (1994) Azithromycin and clarithromycin, *Current Clinical Topics in Infectious Disease* 1994
38. Ejchart A. (2001) Genotoxicity of bleomycin in human cell line differing in catalase activity, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 58: 25-29
39. EMEA (2004) Tulathromycin, Summary report (2), EMEA/MRL/894/04-Final 1-9
40. EMEA (2011) Reflection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/11/WC500118230.pdf
41. EMEA (European Medicines Agency) (2013) VICH topic GL23(R): Studies to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in human food: Genotoxicity testing, EMA/CVMP/VICH/526/2000
42. Er A., Ulutas E., Altan F., Cetin G., Bulbul A., Elmas M, Yazar E. (2011) Tulathromycin disturb blood oxidative and coagulation status, *African Journal of Biotechnology*, 10(16): 3243-3247

43. Er A., Altan F., CetinG., Dik B., Elmas M., Yazar E. (2011) Assessment of the cardiotoxicity of tulathromycin in rabbits, *Acta Veterinaria Hungarica*, 59 (3): 327-335
44. Evans N.A. (2005) Tulathromycin: an overview of a new triamilide antibiotic for livestock respiratory disease, *Veterinary Therapeutics: research in applied veterinary medicine*, 6: 83-95
45. FDA (Food and Drug Administration, Center for Biological Evaluation and Research) (2005) Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers
46. Fischer C. D., Beatty J. K., Zvaigzne C. G., Morck D. W., Lucas M. J., Buret A. G. (2011) Anti-inflammatory benefits of antibiotic-induced neutrophil apoptosis: tulathromycin induced caspase-3-dependent neutrophil programmed cell death and inhibits NF-kappaB signaling and CXCL8 transcription, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55:338-348.
47. Fischer C.D., Beatty J.K., Duquette S.C., Morck D.W., Lucas M.J., Buret A.G. (2013) Direct and indirect anti-inflammatory effects of tulathromycin in bovine macrophages: inhibition of CXCL-8 secretion, induction of apoptosis, and promotion of efferocytosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* doi:10.1128/AAC.01598-12
48. Frankfurt O.S., Seckinger D., Sugarbaker E.V. (1993) Inhibition of DNA repair in cells treated with a combination of alkylating agents, *Anticancer Research* 13:947–52
49. Ho C.C., Siu W.Y., Lau A., Chan W.M., Arooz T., Poon R.Y. (2006) Stalled replication induces p53 accumulation through distinct mechanisms from DNA damage checkpoint pathways, *Cancer Research* 66:2233–41
50. Franklin M. R. (1991) Cytochrome P450 metabolic intermediate complexes from macrolide antibiotics and related compounds, *Methods in Enzymology* 206, 559-73.

51. Freedom of Information Act (2005) Original New Drug Application: Draxxin Injectable Solution (Tulathromycin), NADA 141–244, Pfizer Inc., New York, NY
52. Friedberg E.C., Walke G.C., Siede W. (1995) DNA repair and mutagenesis, Washington, DC: ASM Press
53. Fülöpová D., Kováčik A., Kováčová R., Čupka P., Massányi P. (2012) Effect of macrolide antibiotics on various cell cultures *in vitro*: 1. Cell morphology, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 2 (1) 194-208
54. Gaetani G., Ferraris A., Rolfo M., Mangerini R., Arena S., Kirkman H. (1996) Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes, Blood 87 (4): 1595–9
55. Galer D., Hessong S., Beato B., Risk J., Inskeep P., Weerasunghe C., Scheinder R.P., Langer C., LaPerle J., Renouf D., Bessire A., Espanol E., Rafka R., Ragan C., Boettner W., Murphy T., Killer D., Benchaoul H., Nowakowski M.A. (2004) Analytical method for the analysis of tulathromycin, an equilibrating triamilide in bovine and porcine plasma and lung, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 2179-2191
56. Galloway S.M. (1994) Report of the International workshop on standardisation of genotoxicity test procedures, Mutation Research 312: 195-322
57. Garey K.W., Amsden G.W. (1999) Intravenous azithromycin, Annals of Pharmacotherapy 33: 218–28
58. Gedik C.M., Collins A.R. (1991) The mode of action of 1- β -Darabinofuranosylcytosine in inhibiting DNA repair: New evidence using a sensitive assay for repair DNA synthesis and ligation in permeable cells, Mutation Research 254: 231–237.

59. Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. (2006) Antimicrobial therapy in veterinary medicine, Fourth Edition, Oxford: Blackwell Publishing, 2006, 626 p. ISBN-13: 978-0-8138-0656-3
60. Giguère S. (2006) Macrolides, azalides and ketolides, In: Giguère S., Prescott J.D., Baggot R.D. (Eds.) Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine Blackwell publishing, Oxford pp. 191-205.
61. Gilbert D.A.N., Moellering R.C., Eliopoulos G.M., Chambers H.F., Saag M.S. (2009) The Sanford guide to antimicrobial therapy, 39th Edition Sperryville, VA: Antimicrobial Therapy
62. Greaves P., Williams A., Eve M. (2004) First dose of potential new medicines to humans: how animals help, Nature Reviews Drug Discovery 3:226-236
63. Guay D.R., Gustavson L.E, Devcich K.J. (2001) Pharmacokinetics and tolerability of extended-release clarithromycin, Clinical Therapeutics 23:566–77
64. Gutierrez-Martin C.B., del Blanco N.G., Blanco M., Navas J., Rodriguez-Ferri E.F. (2006) Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade, Veterinary Microbiology 115: 218-222
65. Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease, The American Journal of Medicine 91, 14S-22S
66. Halliwell B., Cross C.Eo (1994) Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress, Environmental Health Perspectives 102 (Suppl): 5-12
67. Hidalgo A., Carvajal A., Garcia-Feliz C., Osorio J., Rubio P. (2009) Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*, Research in Veterinary Science 87: 7-12

68. Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. (1998) The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins, *Mutagenesis* 13:89–94
69. Herington A.C. (1986) Effect of disulfide bond reducing agents on the specific-binding of growth hormone to microsomal membrane preparation from rabbit liver, *Biochemical Pharmacology* 35: 1359-1364
70. Holmgren A., Johansson C., Berndt C., Lonn M.E., Hudemann C., Lilliq C.H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems, *Biochemical Society Transactions* 33: 1375–1377
71. Hook S.E., Lee R.F. (2004) genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stage of the grass shrimp *paleomonetes puigio* embryo as measured by the comet assay, *Aquatic Toxicology* 66: 1-14
72. Hopkins S. (1991) Clinical toleration and safety of azithromycin, *American Journal of Medicine* 91:40S–5S
73. Horvathova E., Slamenova D., Gabelova A. (1999) Use of single gel electrophoresis (comet assay) modifications for analysis of DNA damage, *General Physiology and Biophysics* 18: 70-74
74. HPB (Health Protection Branch) (1993) Health Protection Branch Mutagenicity Guidelines, Health Protection Branch Genotoxicity Committee, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 21:15-37
75. Huang X., Zhao Y., He L., Liang Z., Guo L., Zeng Z., Chen Z., Zang M., Fang B. (2012) Development of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of tulathromycin in swine plasma, *Journal of Integrative Agriculture* 11:465-473.

76. Ianaro A., Ialenti A., Maffia P., Sautebin L., Rombolà L., Carnuccio R., Iuvone T., D'Acquisto F., Di Rosa M. (2000) Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292(1):156-63.
77. Inamura K., Ohta N., Fukase S., Kasajima N., Aoyagi M. (2000) The effects of erythromycin on human peripheral neutrophil apoptosis, *Rhinology* 38:124–129
78. James R.W. (1993) The relevance of clinical pathology to toxicology studies, *Comparative Haematology International* 3: 190-195
79. Jena G.B., Kaul C.L., Ramarao P. (2002) Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: Impact of ICH guidelines, *Indian Journal of Pharmacology* 34: 86-99
80. Kalluri Subba Rao (2009) Free radical induced oxidative damage to DNK: Relation to brain aging and neurological disorders, *Indian Journal Biochemistry and Biophysics* 46: 9-15
81. Kamagai Y., Asimoto T., Shinyashipi M., Shimojo W., Yoshikawa T., Sagai M. (1997) Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust-particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage, *Free Radical Biology and Medicine* 22: 479-487
82. Kang C., Lee H., Yoo Y.S., Hah D.Y., Kim C.H., Kim E., Kim J.S. (2013) Evaluation of oxidative DNA damage using an alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) comet assay and the protective effects of N-acetylcysteine amide on zearalenone-induced cytotoxicity in chang liver cells, *Toxicological Research* 29: 43-52

83. Kaspar H., Schroer U., Wallmann J. (2007) Quantitative resistance level (MIC) of *Pasteurella multocida* isolated from pigs between 2004 and 2006: national resistance monitoring by the BVL, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120, 442-451

85. Kawauchi S., Nakamura T., Yamamoto A., Honda G., Sasaki YF. (2010) Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity?, *Journal of Nucleic Acid* 2010: 541050

86. Keller D. A., Juberg D. R., Catlin N., Farland W. H., Hess F. G., Wolf D. C., Doerrer N. G. (2012). Identification and characterization of adverse effects in 21st century toxicology, *Toxicological Sciences* 126, 291–297

87. Kilgore W.R., Spensley M.S., Sun F., Nutsch R.G., Rooney K.A., Skogerboe T.L. (2005) Clinical effectiveness of tulathromycin, an novel triamilide antimicrobial, for the control of respiratory disease in cattle at high risk for developing bovine respiratory disease, *Veterinary Therapeutics: research in applied veterinary medicine* 6, 143-153

88. Kirkman H.N., Gaetani G.F. (2007) Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries, *Trends in Biochemical Sciences* 32, 44–50

89. Kumar V, Harjai K, Chhibber S. (2008) Effect of clarithromycin on lung inflammation and alveolar macrophage function in *Klebsiella pneumoniae* B5055-induced acute lung infection in Balb/C mice, *Journal of Chemotherapy* 20:609-614

90. Kuzin B., Roberts I., Peunova N., Enikolopov G. (1996) Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development, *Cell* 87, 639–649

91. Lambeth, J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen, *Nature Reviews Immunology* 4, 181–189

92. Liao W., McNutt M.A., Zhu W.G. (2009) The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, *Methods* 48:46–53
93. Levert H., Gressier B., Moutard I., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Cazin M., Cazin J. C. (1998) Azithromycin impact on neutrophil oxidative metabolism dependent on exposure time, *Inflammation* 22:191–201
94. Maier C.M., Chan P.H. (2002) Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders, *The Neuroscientist* 8: 323–334
95. Martin F.L., Cole K.J., Orme M.H., Grover P.L., Phillips D.H., Venitt, S. (1999) The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis ('comet') assay in metabolically competent MCL-5 cells, *Mutation Research* 445 (1): 21-43
96. Martin F. L., Cole K. J., Weaver G., Williams J. A., Millar B. C., Grover P. L., Phillips, D. H. (1999) Genotoxicity of human milk extracts and detection of DNA damage in exfoliated cells recovered from breast milk, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 259, 319–326.
97. Mazzei T., Mini E., Novelli A., Perti P. (1993) Chemistry and mode of action of macrolides, *Journal of Antimicrobiology and Chemotherapeutics* 31(Suppl. C):1–9
98. Mecocci P., Polidori M. C., Ingegneri T., Cherubini A., Chionne F., Cecchetti R., Senin, U. (1998) Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients, *Neurology* 51, 1014–1017
99. Mihailović M.B. (2000) *Biohemija*, četvrto izdanje, ITP „Naučna“, Beograd, 660-684
100. Moss P. (2003) Infections of the gastro-intestinal tract, In: Edinburgh, C.L. (Ed.) *Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy* Finch, R. G., pp. 665-681

101. Nakamura H. (2005) Thioredoxin and its related molecules: update 2005, *Antioxidants and redox signaling* 7, 823–828
102. Nash K.A., Andini N., Zhang Y., Brown-Elliott B.A., Wallace R.J.Jr. (2006) Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 3476-3478
103. Neilsen F., Mikkelsen B.B., Neilsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P. (1997) Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors, *Clinical Chemistry* 47: 1209-1214
104. Nowakowski M.A., Inskeep P.B., Risk J.E., Skogerboe T.L., Benchaoui H.A., Meinert T.R., Sherington J., Sunderland S.J. (2004) Pharmacokinetics and lung tissue concentration of tulathromycin, a new triamilide antibiotic, in cattle, *Veterinary Therapeutics* 5:60-74
105. Nutsch R.G., Skogerboe T.L., Rooney K.A., Weigel D.J., Gajewski K., Lechtenberg K.F. (2005) Comparative efficacy of tulathromycin, tilmicosin, and florfenicol in the treatment of bovine respiratory disease in stocker cattle, *Veterinary Therapeutics* 6:167–179
106. OIE (2007) OIE list of antimicrobials of veterinary importance. OIE international committee. 75th General Session, May 2007 (Resolution No. XXVIII)
107. Olayinka E.T., Ore A. (2013) Influence of azithromycin treatment on hepatic lipid peroxidation and antioxidant defence systems of rats, *British Journal of Pharmaceutical Research* 4(2): 240-256
108. Olsen H., Betton G., Robinson D., Thomas K., Monro A., Kolaja G, Lilly P., Sanders J., Sipes G., Bracken W., Dorato M., Van Deun K., Smith P., Berger B., Heller

- A. (2000) Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and animals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32: 56-67
109. Oliveira G., Oliveira C., Dorado A. (2013) cellular and plasma oxidative stress biomarkers are raised in adults with bronchiectasis, *Clinical Nutrition* 32, 112-117
110. O'Brien P.J. (2000) Peroxidases, *Chemico-Biological Interactions* 129, 113–139.
111. O'Brien P.J. (2008) Cardiotroponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity, *Toxicology* 245: 206-218
112. Otoguro K., Komyiama K., Omura S., Tyson C.A. (1991) An in vitro cytotoxicity assay using rat hepatocytes and MTT and Coomassie blue dye as indicators, *Alternatives to Laboratory Animals* 19, 352-60.
113. Park H.S., Kim S.R., Lee Y.C. (2009) Impact of oxidative stress on lung diseases, *Respirology* 14, 27-38
114. Parnham M. J., Culić O., Eraković V., Munić V., Popović-Grle S., Baristić K., Bosnar M., Brajsa K., Cepelak I., Cuzić S., Glojnarčić I., Manojlović Z., Novak-Mircetić R., Oresković K., Pavčić-Beljak V., Radosević S., Sucić M. (2005) Modulation of neutrophil and inflammation markers in chronic obstructive disease by short-term azithromycin treatment, *European Journal of Pharmacology* 517:132–143
115. Periti P., Mazzei T., Mini E., Novelli A. (1992) Pharmacokinetic drug interactions of Macrolides, *Clinical Pharmacokinetics* 13, 106-31.
116. Periti P., Mazzei T., Mini E., Novelli A. (1993) Adverse effects of macrolide antibacterials, *Drug Safety* 9, 346-64

117. Pessayre D., Larrey D., Funck-Brentano C., Benhamou J.P. (1985) Drug interactions and hepatitis produced by some macrolide antibiotics, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 16 (A) 181-94
118. Radaković M., Stevanović J., Djelić N., Lakić N., Knežević-Vukčević J., Vuković-Gaćić B., Stanimirović Z. (2013) Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay, *Journal of Biosciences* 38(1) 53-62
119. Regulski M., Stasiv Y., Tully T., Enikolopov G. (2004) Essential function of nitric oxide synthase in *Drosophila*, *Current Biology* 14, R881–882
120. Roberts M.C. (2008) Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes, *FEMS Microbiology Letters* 282, 147-159
121. Romanet J., Smith G.W., Leavens T.L., Baynes R.E., Wetzlich S.E., Riviere J.E., Tell L.A. (2012) Pharmacokinetics and tissue elimination of tulathromycin following subcutaneous administration in meat goats, *American Journal of Veterinary Research* 73(10): 1634-1640
122. Rosenfeldt H., Kropp T., Benson K., Stacey Ricci M., McGuinn W.D., Leigh Verbois S. (2010) Regulatory aspects of oncology drug safety evaluation: Past practice, current issues, and the challenge of new drugs, *Toxicology and Applied Pharmacology* 243, 125–33
123. Saadat zadeh M. R., Bijangi-Vishehsaraei K., Hong P., Bergmann H., Haneline L.S. (2004) Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway, *Journal of Biological Chemistry* 279, 16805-16812
124. Scheuch E., Spieker J., Venner M., Siegmund W. (2007) Quantitative determination of the macrolide antibiotic tulathromycin in plasma and broncho-alveolar

cells of foals using tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 850: 464-470

125. Seral C., Van Bambeke F., Tulkens P.M. (2003) Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 2283-2292

126. Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175, 184-191

127. Soichiro K., Rubin B.K. (2010) Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications, *Clinical Microbiology Review*, 23(3):590, DOI: 10.1128/CMR.00078-09

128. Smith M.A., Rottkamp C.A., Nunomura A., Raina A.K., Perry G. (2000) Oxidative stress in Alzheimer's disease, *Biochimica et Biophysica Acta* 1502, 139–144

129. Speit G., Schütz P. (2008) The effect of inhibited replication on DNA migration in the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity, *Mutation Research* 655, 22–27

130. Speit G., Rothfuss A. (2012) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, *Methods in Molecular Biology* 920: 79-90

131. Takayama S., Akaike M., Kawashima K., Takahashi M., Kurokawa Y. (1995) A collaborative study in Japan on optimal treatment period and parameters for detection of male-fertility disorders in rats induced by drugs in rats, *Journal of The American College of Toxicology* 14: 266-292

132. Tice R. R. (1995) The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoresis technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, Phillips D. H. Venitt S. eds. Environmental and Molecular Mutagenesis, 315-339, Bios Scientific Publishers Oxford, United Kingdom
133. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F. (2000) The single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, Environmental and Molecular Mutagenesis 35:206-221
134. Vaara M. (1993) Outer membrane permeability barrier to azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin in gram-negative enteric bacteria, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37, 354-356
135. Venner M., Kerth R., Klung E. (2007), Evaluation of tulathromycin in the treatment of pulmonary abscesses in foals, The Veterinary Journal 174(2): 418-21
136. Viluksela M., Vainio P., Tuominen R. (1996) Cytotoxicity of macrolide antibiotics in a cultured human liver cell line, Indian Journal of Antimicrobial Chemotherapy 38: 465-473
137. Vliet A.V.D., Bast A. (1992) Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission, Chemico-Biological Interactions 85: 95-116
138. Vyt P., Hommez J. (2006) Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates compared with the clinical effect of treatment, Flemish Veterinary Journal 75, 279-285.
139. Wang X., Tao Y.F., Huang L.L., Chen D.M., Yin S.Z., Ihsan A., Zhou W., Su S.J., Liu Z.L., Pan Y.H., Yuan Z.H. (2012) Pharmacokinetics of tulathromycin and its metabolite in swine administered with an intravenous bolus injection and a single gavage, Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 35(3):282-289

140. Washburn K.E., Bissett W., Fajt V., Clubb F., Fosgate G.T., Libal M., Smyre K.E., Cass K.L. (2007) The safety of tulathromycin administration in goats, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30, 267-270.
141. Wellman N.G., O'Connor A.M. (2007) Metanalysis of treatment of cattle with bovine respiratory disease with tulathromycin, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30: 234-241
142. Williams J.D., Sefton A.M. (1993) Comparison of macrolide antibiotics, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31: 11-26
143. WHO (2007) Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non human antimicrobial use report of the second WHO expert meeting Copenhagen, 29–31 May 2007
144. Wong V.W.C., Szeto Y.T., Collins A.R., Benzie I.F.F. (2005) The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research, *Current Topics in Nutraceutical Research*, 3(1): 1-14
145. Woodward KN. (2005) Veterinary pharmacovigilance, Part 6, Predictability of adverse reaction in animal from laboratory toxicology studies, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28: 213-231
146. Wu G., Fang Y.Z., Jang S., Lupton J.R., Turner N.D. (2004) Glutathione metabolism and its implications for health, *Journal of Nutrition* 134: 489–492
147. Xiugong G., Anderson D.R, Brown A.W., Lin H., Amnuaysirikul J., Chua A.L., Holmes W.W., Ray P. (2011) Pathological Studies on the Protective Effect of a Macrolide Antibiotic, Roxithromycin, against Sulfur Mustard Inhalation Toxicity in a Rat Model, *Toxicologic Pathology* 39: 1056

148. Yazar E., Oztekin E., Sivrikaya A., Col R., Elmas M., Bas A.L. (2004) Effects of different doses of tilmicosin on malondialdehyde and glutathione concentrations in mice, *Acta Veterinaria Brno* 3:69–72.
149. Yazar E., Altunok V., Elmas M., Tras B., Bas Al, Ozdemir V. (2002) The effect of tilmicosin on cardiac superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, *Journal of Veterinary Medicine B* 49: 209-210
150. Young G., Smith G.W., Leavens T.L., Wetzlich S.E., Baynes R.E., Mason S.E., Riviere J.E., Tell L.A. (2010) Pharmacokinetics of tulathromycin following subcutaneous administration in meat goats, *Research in Veterinary Science* 90:477-479
151. Zhanel G.G., Dueck M., Hoban D.J., Vercaigne L.M., Embil J.M., Gin A.S., Karlowsky J.A (2001) Review of macrolides and ketolides, focus on respiratory tract infections, *Drugs* 61(4):443-498
152. Zhao Y.D., Jiao X.J., Liu S.S., Ni H.J., He X.R., Wang S.F., Zeng Z.L., Huang X.H. (2011) The physiological and biochemical evaluation of tulathromycin injection in pigs, *Journal of South China Agricultural University* 32(3) 101-104
153. Zhihui H., Yongda Z., Haoting W., Lihua H., Zhaopeng D., Fenfang Y., Baohan Q. (2012) The physiological and biochemical evaluation of tulatromycin premix in pigs, *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11(22): 4161-4166
154. Zunino A., Degan P., Vigo T., Abbondadolo A. (2001) Hydrogen peroxide effects on DNA, chromosomes, cell cycle and apoptosis induction in Fanconi anemia cell lines, *Mutagenesis* 16: 283-288

Биографија аутора:

Јелена Малетић је завршила основну школу и гимназију у Лозници. Уписала се на Пољопривредни факултет Универзитета у Новом Саду, Департаман за ветеринарску медицину 2001. године, а дипломирала 18. 9. 2006. године, прва у својој генерацији, са просечном оценом 8,31. Докторске студије Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду уписала је школске 2006/07 године. У наредне три године положила све испите предвиђене наставним планом и програмом са просечном оценом 9,40. До сада је објавила као аутор или коаутор један рад категорије М23, један рад категорије М51, један рад категорије М63 и један рад категорије М64. Током докторских студија обавила је приправнички радни стаж у Самосталној ветеринарској амбуланти „Комарчевић“ у Лозници и положила стучни испит за дипломираног ветеринара, након чега се запослила у компанији Noack & Co South East d.o.o. Нови Сад где је радила 5 година, а затим у компанији Elixir Feed Additives d.o.o. Шабац где и данас ради.

Удата, мајка две девојчице.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јелена В. Малетић _____

број индекса _____ 14/4 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Евалуација генотоксичних ефеката и патоморфолошких промена код пацова
након апликације тулатромицина

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2015.године

Јелена В. Малетић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена В. Малетић

Број индекса 14/4

Студијски програм докторске академске студије Факултета ветеринарске
медицине Универзитета у Београду

Наслов рада Евалуација генотоксичних ефеката и патоморфолошких промена
код пацова након апликације тулатромицина

Ментори проф. др Нинослав Ђелић и проф. др Невенка Алексић

Потписани/а Јелена В. Малетић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2015. године

Јелена В. Малетић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Евалуација генотоксичних ефеката и патоморфолошких промена код пацова након апликације тулатромицина

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2015. године

Јелена В. Манцић