



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI



MEDICINSKI FAKULTET

Tatjana Milivojac

**UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA PARAMETRE
OKSIDATIVNOG STRESA, INFLAMATORNOG
ODGOVORA I ENDOTELNE DISFUNKCIJE
IZAZVANE ENDOTOKSINOM *E.coli* KOD PACOVA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2024. godine



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF MEDICINE



Tatjana Milivojac

**THE EFFECT OF BILE ACIDS ON PARAMETERS OF
OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATORY RESPONSE, AND
ENDOTHELIAL DYSFUNCTION INDUCED BY *E. coli*
ENDOTOXIN IN RATS**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2024.

Mentor: Prof. dr Ranko Škrbić, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Naslov doktorske disertacije: UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA, INFLAMATORNOG ODGOVORA I ENDOTELNE DISFUNKCIJE IZAZVANE ENDOTOKSINOM *E. Coli* KOD PACOVA

Rezime: Bakterijski lipopolisaharid (*Lipopolysaccharide, LPS*) izaziva upalu i ako imuni odgovor domaćina ne uspije da zaustavi infekciju, dolazi do sistemskog širenja infekcije (sepsa), što dovodi do oštećenja različitih tkiva i organa. Jedan od najčešće zahvaćenih i najosjetljivijih organa u sepsi su pluća. Cilj ove studije bio je da se istraže anti-inflamatorna, antioksidativna i citoprotektivna svojstva dvije strukturno različite žučne kiseline, ursodeoksiholne kiseline (*Ursodeoxycholic acid, UDCA*) i chenodeoksiholne kiseline (*Chenodeoxycholic acid, CDCA*), u eksperimentalnom modelu endotoksemije i akutnog oštećenja pluća izazvanih LPS-om. Studija je dizajnirana u dva dijela, u jednom dijelu su ispitivani efekti UDCA i CDCA na sistemske upalu, a u drugom efekti UDCA i CDCA na akutno oštećenje pluća. Eksperiment je obuhvatio šest različitih grupa *Wistar* pacova: 1) kontrolna grupa, koja je primala propilen glikol (kao rastvarač za žučne kiseline) tokom 10 dana, a fiziološki rastvor 10. dana. 2) LPS grupa, koja je primala propilen glikol tokom 10 dana, a LPS 10. dana. 3) UDCA grupa, koja je primala UDCA tokom 10 dana i fiziološki rastvor 10. dana. 4) UDCA+LPS grupa, koja je primala UDCA tokom 10 dana i LPS 10. dana. 5) CDCA grupa, koja je primala CDCA tokom 10 dana i fiziološki rastvor 10. dana. 6) CDCA+LPS grupa, koja je primala CDCA tokom 10 dana i LPS 10. dana.

Primjena UDCA i CDCA u endotoksemiji značajno smanjuje proizvodnju proinflammatoryh citokina i ekspresiju nuklearnog faktora- κ B (*Nuclear factor kappa B, NF- κ B*) u jetri, ima pozitivan uticaj na lipidni profil, smanjuje nivo intracelularnog adhezionog molekula 1 (*Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1*), povećava antioksidativne aktivnosti (katalaza i redukovani glutation), a smanjuje prooksidativne markere H_2O_2 i O_2^- u plazmi i ublažava oštećenje jetre izazvano LPS-om. Dok je predtretman sa UDCA i CDCA smanjio nivo homocisteina kod pacova tretiranih LPS-om, samo je predtretman sa UDCA pokazao smanjenje drugih biohemijskih markera u serumu, uključujući kreatin kinazu, laktat dehidrogenazu i troponin I.

Primjena UDCA i CDCA kod akutnog oštećenja pluća značajno povećava antioksidativnu zaštitu (katalaza i redukovani glutation) i smanjuje prooksidativne markere NO i supstance reaktivne sa tiobarbiturnom kiselinom (*Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS*) u bronhoalveolarnoj tečnosti, smanjuje ekspresiju NF- κ B i proapoptotskih markera X protein povezan sa BCL-2 (*BCL-2-associated X protein, BAX*) i kaspaze 3 u tkivu pluća, povećava ekspresiju akvaporina 1 i 5 i antiapoptotskog markera B-ćelijski limfom -2 (*B-cell lymphoma-2, BCL-2*) u plućima, te ublažava oštećenje pluća.

Ključne riječi: LPS-om indukovana endotoksemija i akutno oštećenje pluća, ursodeoksiholna kiselina, henodeoksiholna kiselina, inflamacija, oksidativni stres, endotelna disfunkcija, apoptoza, akvaporini

Naučna oblast: Medicinske i zdravstvene nauke

Naučno polje: Medicinske nauke

Uža naučna oblast: Patološka fiziologija

Klasifikaciona oznaka za užu naučnu oblast prema CERIF šifrniku:

Tip odabrane licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za način korištenja sadržaja doktorske disertacije: Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima

Mentor: Ranko Škrbić, MD, PhD, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Banja Luka

Doctoral thesis: THE EFFECT OF BILE ACIDS ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATORY RESPONSE, AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION INDUCED BY *E. Coli* ENDOTOXIN IN RATS

Summary: Bacterial lipopolysaccharide (*LPS*) induces inflammation, and if the host immune response fails to halt the infection, systemic dissemination (sepsis) occurs, leading to damage to various tissues and organs, with the lungs being one of the most frequently affected and sensitive organs in sepsis. The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory, antioxidant, and cytoprotective properties of two structurally different bile acids, ursodeoxycholic acid (*UDCA*) and chenodeoxycholic acid (*CDCA*), in an experimental model of endotoxemia and *LPS*-induced acute lung injury. The study was designed in two parts: one part examined the effects of *UDCA* and *CDCA* on systemic inflammation, and the other part examined the effects of *UDCA* and *CDCA* on acute lung injury. The experiment included six different groups of *Wistar* rats: 1) control group, which received propylene glycol (as a solvent for bile acids) for 10 days and saline on day 10. 2) *LPS* group, which received propylene glycol for 10 days and *LPS* on day 10. 3) *UDCA* group, which received *UDCA* for 10 days and saline on day 10. 4) *UDCA+LPS* group, which received *UDCA* for 10 days and *LPS* on day 10. 5) *CDCA* group, which received *CDCA* for 10 days and saline on day 10. 6) *CDCA+LPS* group, which received *CDCA* for 10 days and *LPS* on day 10.

The administration of *UDCA* and *CDCA* in endotoxemia significantly reduced the production of pro-inflammatory cytokines and the expression of nuclear factor- κ B (*NF- κ B*) in the liver, had a positive impact on lipid profile, decreased intercellular adhesion molecule 1 (*ICAM-1*) levels, increased antioxidant activities (catalase, reduced glutathione), and reduced prooxidant markers H_2O_2 and O_2^- in plasma, and alleviated *LPS*-induced liver injury. While pretreatment with *UDCA* and *CDCA* reduced homocysteine levels in *LPS*-treated rats, only pretreatment with *UDCA* showed reductions in other serum biochemical markers, including creatine kinase, lactate dehydrogenase, and troponin I.

The application of UDCA and CDCA in acute lung injury significantly increased antioxidant protection (catalase, glutathione) and reduced prooxidant markers NO and thiobarbituric acid reactive substances (*TBARS*) in bronchoalveolar fluid, decreased the expression of NF- κ B and proapoptotic markers BCL-2-associated X protein (*BAX*), and caspase 3 in lung tissue, increased the expression of aquaporins 1 and 5 and the antiapoptotic marker B-cell lymphoma - 2 (*BCL-2*) in the lungs, and alleviated lung injury.

Keywords: LPS-induced endotoxemia and acute lung injury, ursodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction, apoptosis, aquaporins.

Scientific area: Medical and health sciences

Scientific field: Medical Sciences

Narrow scientific area: Pathophysiology

Classification code of the scientific area by CERIF codebook:

Type of the selected licence of the Creative Commons how to use the content of the doctoral dissertation: Attribution - NonCommercial – ShareAlike

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Endotoksemija	1
1.1.1 Receptor za prepoznavanje patogena-TLR.....	1
1.1.2 LPS/TLR4 aktivacija	2
1.1.3 TLR4/MyD88/NF- κ B i TLR4/TRIF/IRF3 signalizacija	3
1.1.4 NF- κ B	4
1.2 SIRS i MODS	7
1.3 Apoptoza	10
1.3.1 Biohemijski putevi apoptoze	10
1.4 Endotelna (dis)funkcija	12
1.5 Oksidativni stres	13
1.5.1 Reaktivne vrste kiseonika i azota; antioksidativni mehanizmi.....	14
1.5.2 Regulator ćelijskog odgovora na oksidativni stres-Nrf2	15
1.6 Akvaporini	17
1.6.1 Strukturni aspekti akvaporina	18
1.6.2 Uloge akvaporina.....	18
1.7 Endotoksemija i akutno oštećenje jetre i bubrega	20
1.8 Endotoksemija i akutno oštećenje pluća	21

1.8.1 Patofiziologija akutnog oštećenja pluća u endotoksemiji.....	21
1.9 Žučne kiseline	26
1.9.1 Struktura i fizičko-hemijske osobine žučnih kiselina.....	26
1.9.2 Metabolizam žučnih kiselina	27
1.9.2.1 Sinteza žučnih kiselina.....	27
1.9.2.2 Konjugacija žučnih kiselina.....	28
1.9.2.3 Biotransformacija žučnih kiselina.....	29
1.9.2.4 Enterohepatička cirkulacija.....	30
1.9.3 Uloga žučnih kiselina	31
1.9.3.1 Receptori za žučne kiseline.....	31
1.9.3.2 Receptori za žučne kiseline i kinazni putevi.....	33
2. RADNE HIPOTEZE	36
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
4. MATERIJAL I METODE	38
4.1 Eksperimentalne životinje	38
4.2 Eksperimentalne grupe.....	38
4.3 Uzimanje uzoraka krvi i njihova analiza	39
4.4 Uzimanje bronhoalveolarne tečnosti (bronchoalveolar lavage fluid, BALF).....	40
4.5 Uzimanje uzoraka tkiva, patohistološka i imunohistohemijska analiza	41
4.5.1 Patohistološka analiza.....	41
4.5.2 Imunohistohemijska analiza	42

4.6 Statistička analiza.....	45
5. REZULTATI.....	46
5.1 Rezultati primjene UDCA i CDCA u endotoksemiji izazvanoj LPS-om.....	46
5.1.1 Efekti primjene UDCA i CDCA na produkciju proinflamatornih citokina u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a.....	46
5.1.2 Efekti primjene UDCA i CDCA na biokemijske parametre i serumske markere oštećenja jetre u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a.....	47
5.1.3 Efekti primjene UDCA i CDCA na lipidni profil u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a.....	48
5.1.4 Efekti primjene UDCA i CDCA na endotelnu disfunkciju u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a.....	48
5.1.5 Efekti primjene UDCA i CDCA na markere oksidativnog stresa u plazmi u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a.....	49
5.1.6 Efekti primjene UDCA i CDCA na tjelesnu težinu (TT), težinu jetre (TJ) i odnos TJ/TT u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a.....	50
5.1.7 Efekti primjene UDCA i CDCA na patohistološke karakteristike jetre u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a.....	51
5.1.8 Efekti primjene UDCA i CDCA na ekspresiju NF- κ B u hepatocitima u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a.....	53
5.2 Rezultati primjene UDCA i CDCA kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a	55
5.2.1 Efekti primjene UDCA i CDCA na markere oksidativnog stresa u BALF-u kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a	55

5.2.2 Efekti primjene UDCA i CDCA na patohistološke karakteristike pluća kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a	56
5.2.3 Efekti primjene UDCA i CDCA na ekspresiju NF-kB kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a	59
5.2.4 Efekti primjene UDCA i CDCA na markere apoptoze kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a	61
5.2.5 Efekti primjene UDCA i CDCA na ekspresiju akvaporina 1 i 5 kod akutng oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a.....	67
6. DISKUSIJA	71
7. ZAKLJUČCI.....	85
8. LITERATURA.....	86

LISTA SKRAĆENICA

BIOGRAFIJA

IZJAVA 1

IZJAVA 2

IZJAVA 3

1. UVOD

1.1 Endotoksemija

Endotoksemija se definiše kao akutni proinflamatorni odgovor cijelog organizma na invaziju patogena ili njegovih toksina, kao što je bakterijski lipopolisaharid (*Lipopolysaccharide, LPS*) koji je dio spoljašnje membrane ćelijskog zida gram-negativnih bakterija. Primjena LPS-a dovodi do akutne sistemske inflamatorne reakcije usljed aktivacije imunog sistema, a preko vezivanja LPS-a za njegove receptore slične Toll-u (*Toll-Like Receptors, TLR*) (1). Male količine LPS-a prisutne u krvi su dovoljne da izazovu upalni odgovor kroz interakciju sa TLR (2). Korištenjem genomskih tehnologija omogućeno je da se bolje razumije odgovor domaćina tokom sepse. Calvano i njegovi saradnici su 2005 god. identifikovali globalnu reprioritizaciju transkriptoma leukocita *in vivo* kod ljudi izloženih LPS-u, koja je uticala na više od 300 funkcionalnih puteva. Primjena LPS-a zdravim ispitanicima izazvala je promjene u ekspresiji više od 4000 gena u prvih 24 sata, sa iznenađujućim smanjenjem ekspresije kod više od polovine gena (3).

1.1.1 Receptor za prepoznavanje patogena-TLR

Receptori za prepoznavanje patogena (*Pattern Recognition Receptors, PRRs*), kao što je TLR, su centralni u odbrani domaćina od patogena. TLR ekspimiraju imune i neimune ćelije, prepoznajući različite stimulse koji se mogu svrstati u dvije kategorije: stimulusi izvedeni iz različitih mikroba (*Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*), kao što je LPS, i stimulusi izvedeni iz oštećenih ćelija (*Danger-associated molecular patterns, DAMPs*), kao što su proteini toplotnog šoka (4). Svaki TLR prepoznaje specifične mikrobne komponente izvedene iz invazijskih mikroorganizama, čime pokreću imuni odgovor i predstavljaju ključnu vezu između stečenog i urođenog imuniteta. Kod ljudi je identifikovano deset TLR članova (TLR1-TLR10), a na osnovu mjesta gdje se nalaze TLR se dijele u dvije grupe: oni koji se nalaze na površini ćelija i oni koji su unutar ćelije. Svaki TLR ima tri komponente (domena): vanćelijski domen za vezivanje (prepoznavanje) PAMP i DAMP, koji se sastoji od ponavljajućih sekvenci bogatih leucinom (*Leucine rich repeats (LRR) domain*); transmembranski dio i citoplazmatski domen koji inicira nizvodnu unutarćelijsku signalizaciju

(*Toll/IL-1 receptor (TIR) domain*) (5). Nakon prepoznavanja PAMP aktivirani TLR pokreću različite proinflamatorne signalne puteve.

1.1.2 LPS/TLR4 aktivacija

TLR4 je receptor na površini ćelije, a prepoznavanje minimalnih količina cirkulišućeg LPS-a putem TLR4 receptora inicira se na molekularnom nivou. Ova interakcija dovodi do formiranja dimerizovanog receptora na membrani ćelije, što dalje pokreće niz proteinskih interakcija koje rezultiraju proizvodnjom proinflamatornih citokina i interferona, aktivirajući tako inflamatorne i imunološke odgovore organizma (6). Ova strategija prepoznavanja je prva linija odbrane protiv bakterijskih infekcija, a LPS je najmoćniji do sada poznat imunostimulans. Lipidna komponenta A LPS-a je glavni PAMP (7).

TLR4 indirektno veže LPS preko adapterskog proteina-faktor diferencijacije mijeloidnih ćelija 2 (*Myeloid differentiation factor 2, MD-2*), koji formira poseban kompleks sa lipidnom komponentom A LPS-a, prepoznajući ga i direktno se vezuje za TLR4 stvarajući aktiviran heterodimer (LPS/MD-2/TLR4)₂. Aktivacija TLR4 od strane LPS-a uključuje seriju koraka u kojima različiti LPS-vezujući proteini (*Lipopolysaccharide binding protein, LBP*) prenose LPS na MD-2/TLR4. LBP se vezuje za monomer LPS-a i prenosi ga na protein klaster diferencijacije 14 (*Protein cluster of differentiation 14, CD14*), koji olakšava formiranje kompleksa LPS sa MD-2/TLR4. CD14 je izražen pretežno u makrofazima i monocitima. Kada se uzastopnim djelovanjem LBP i CD14 pokrene formiranje aktiviranog MD-2/TLR4 heterodimera na ćelijskoj površini, intracelularni signal može se usmjeriti ka dva glavna puta: TLR4/MyD88/NF-κB i TLR4/TRIF/IRF3, koji su konkurentni i međusobno se isključuju. Za dalju nishodnu signalizaciju u prvom putu neophodni su gen primarnog odgovora diferencijacije mijeloidnih ćelija 88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88*) i adapter protein koji sadrži TIR domen (*TIR domain-containing adaptor protein, TIRAP*), dok drugi put uključuje adapterske proteine indukcije interferona β (*Interferon beta, IFN-β*) sa TIR domenom, (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β, TRIF*) i TRIF-srodni adapter molekul (*TRIF-related adaptor molecule, TRAM*) (6).

1.1.3 TLR4/MyD88/NF- κ B i TLR4/TRIF/IRF3 signalizacija

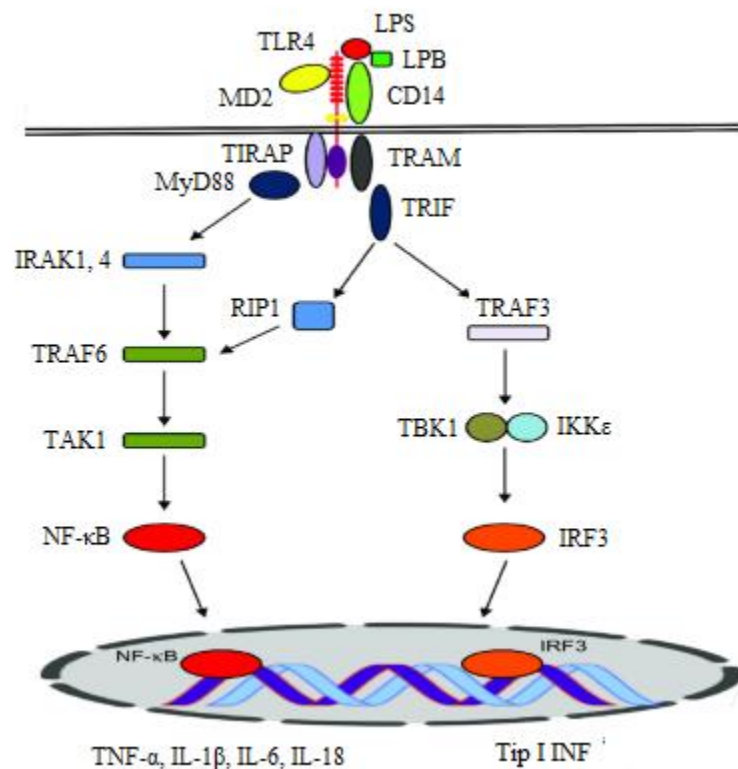
TLR4/MyD88 put započinje kompleksom (LPS/MD-2/TLR4)₂ smještenog na plazma membrani, dok TLR4/TRIF transdukcija počinje u endozomima nakon endocitoze receptorskog kompleksa. TLR4 adapter proteini, kao i sam TLR4, imaju TIR domene koje omogućavaju međusobne interakcije (6).

MyD88-zavisni signalni put se inicira kad se aktivirani TLR4 veže za TIRAP, koji zatim regrutuje MyD88, rezultirajući aktivacijom porodice IRAK kinaza (*Interleukin-1 receptor-associated kinases*), gdje IRAK4 aktivira IRAK1 koji se autofosforiliše i povezuje sa TRAF6 E3 ubikvitin ligazom, omogućavajući TRAF 6 (*TNF receptor associated factor 6*) da samopodliježe ubikvitinaciji i poveže ubikvitinske lance sa drugim signalnim molekulima koji su uključeni u aktivaciju ubikvitin-zavisne kinaze- TGF- β -aktivirana kinaza 1 (*TGF β -activated kinase 1, TAK1*). Po aktivaciji, TAK 1 aktivira nizvodnu kinazu IKK (*I-kappa-B kinase*) koja zatim fosforiliše I κ B α (inhibitor NF- κ B), dovodeći do aktivacije NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*), a zatim translokacije aktivirane forme u jezgro gdje aktivira brojne gene koji kodiraju proinflamatorne citokine, hemokine, faktore rasta i biomolekule za imunološku aktivaciju (5). Aktivacija TAK1 ne aktivira samo NF- κ B put, već i članove puta mitogenom aktivirane protein kinaze (*Mitogen activated protein kinase, MAPK*): put kinaze regulisane vanćelijskim signalom (*Extracellular-signal-regulated kinase pathway, ERK*), put p38 mitogenom aktivirane protein kinaze (*p38 Mitogen activated protein kinases, p38MAPK*) i put c-jun N-terminalnih kinaza (*C-jun N-terminal kinases, JNK*), koji regulišu aktivaciju transkripcionih faktora porodice aktivatora proteina 1 (*Activating protein-1, AP-1*) i stabilizaciju mRNA, igrajući ključnu ulogu u kontroli inflamatornog odgovora (8) (Slika 1).

TRIF zavisni TLR signalni put je odgovoran za posredovanje u TLR4-zavisnoj produkciji IFN- β i aktivaciji NF- κ B. Ovaj put ima ključnu ulogu u indukciji IFN tipa I i IFN-inducibilnih gena i on se inicira kada se endozomski TLR4, putem adapterskog proteina TRAM, veže za TRIF. Ovaj put uključuje aktivaciju TRAF proteina, posebno TRAF3 i TRAF6.

TRIF interakcijom sa TRAF3 dovodi do aktivacije TANK-vezujuće kinaze 1 (*TANK-binding kinase 1, TBK1*) i IKK ϵ (*I-kappa-B kinase epsilon*). Aktivirane TBK1 i IKK ϵ fosforilišu transkripcioni interferon regulatorni faktor 3 (IRF3), nakon čega IRF3 formira dimer i prelazi iz citoplazme u jezgro, gdje pokreće ekspresiju gena IFN tipa I, kao što je IFN- β (9).

Interakcijom sa TRAF6, TRIF aktivira NF- κ B i članove MAPK puta stimulacijom adaptorskog proteina, kinaza receptor-interreagujućeg proteina 1 (*Receptor-interacting protein 1*, *RIP1*), što indirektno regrutuje RIP-1 kinazu koja dalje interaguje sa TAK1 kompleksom i aktivira ga, omogućavajući tako aktivaciju IKK, što dovodi do indukcije gena inflamatornih citokina (10) (Slika 1)



Slika 1. Šematski prikaz TLR4 signalnih puteva

1.1.4 NF- κ B

NF- κ B predstavlja porodicu transkripcionih faktora koji, kada su aktivirani, pokreću transkripciju gena povezanih sa različitim inflamatornim i imunološkim procesima. Ova porodica ima pet članova: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB i c-Rel. U mirovanju, NF- κ B proteini su zadržani u citoplazmi od strane inhibitornih proteina, koji pripadaju porodici I κ B, pri čemu je I κ B α najvažniji i najbolje proučen (11).

NF- κ B igra ključnu ulogu u pokretanju proinflamatornih gena, djelujući kako u ćelijama urođenog, tako i u ćelijama stečenog imunog sistema. Aktivacija NF- κ B utiče na upalu ne samo direktno povećanjem proizvodnje upalnih citokina, hemokina i adhezivnih molekula, nego reguliše i apoptozu i proliferaciju ćelija, kontroliše aktivaciju, diferencijaciju i efektorsku funkciju inflamatornih T ćelija i reguliše aktivaciju inflamazoma (12).

Proinflamatorna funkcija NF- κ B detaljno je proučena u makrofazima, koji eksprimiraju PRR i tako prepoznaju različite PAMP i DAMP; a koji su i prva linija odbrane protiv infekcije. Aktivirani makrofazi luče proinflamatorne citokine i hemokine. Oni se mogu diferencirati u M1 makrofage (klasično aktivirani) koji proizvode citokine poput TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12; a takođe promovišu i diferencijaciju inflamatornih T-ćelija, uključujući Th1 i Th17 ćelije (8). Th1 ćelije luče IFN- γ , podržavajući ćelijski imunitet i inflamatorni odgovor. Th17 ćelije, koje se karakterišu lučenjem porodice IL-17, privlače monocite i neutrofile na mjesto upale kao odgovor na invaziju patogena i podstiču proizvodnju drugih važnih citokina kao što su IL-1, IL-6 i TNF- α . Tako da ovi citokini omogućavaju komunikaciju između limfocita i fagocita (13, 14). Sa druge strane, M2 makrofazi proizvode anti-inflamatorne citokine, poput IL-10 i IL-13. Vezivanje LPS-a za TLR4 promoviše diferencijaciju makrofaga ka M1 fenotipu (8).

NF- κ B se aktivira putem dva ključna signalna puta - kanonskog i nekanonskog (alternativnog) puta. Iako se razlikuju u mehanizmu signalizacije, oba puta imaju važnu ulogu u regulaciji imunoloških i inflamatornih odgovora, iako je u funkcionalnom smislu kanonski put NF- κ B taj koji ima široku ulogu u imunološkim odgovorima, a nekanonski služi kao dopuna i saraduje s kanonskim putem u regulaciji specifičnih funkcija urođenog imunološkog sistema.

Kanonski put reaguje na različite stimulanse poput liganda za citokinske receptore (*TNF- α receptor*, *TNFR*), liganda za PRR i liganda za T-ćelijski i B-ćelijski receptor. Ovaj put se aktivira kroz degradaciju I κ B α putem fosforilacije od strane kompleksa I κ B kinaza (IKK), koji ima katalitičke podjedinice (IKK α i IKK β) i regulatornu podjedinicu (NEMO/IKK γ). Različiti stimuli, uključujući citokine, faktore rasta i mikrobne komponente, mogu aktivirati IKK. Aktivirani IKK fosforiliše I κ B α , pokrećući njegovu ubikvitin-zavisnu degradaciju u proteazomu. To rezultira brzim i prolaznim nuklearnim translokacijama kanonskih NF- κ B članova, uglavnom dimera p50/RelA i p50/c-Rel. TAK1 ključna je komponenta signalizacije u integraciji različitih puteva aktivacije NF- κ B putem PRR. TAK1 nakon aktivacije aktivira

nizvodnu kinazu IKK. To rezultira fosforilacijom I κ B α i aktivacijom NF- κ B (8, 11). Signalni događaj TLR4 nakon njegove stimulacije sa LPS-om je aktivacija kanonskog puta. Dokazi sugeriraju da je MyD88-zavisni TLR put ključan za polarizaciju M1 makrofaga i indukciju proinflamatornih citokina (15).

Nekanonski put reaguje selektivno na određene stimulse poput liganda za članove TNFR superfamilije, uključujući *LT β R*, *BAFFR*, *CD40* i *RANK* (aktivator receptora NF- κ B). U ovom putu nema degradacije I κ B α , već se signalizacija oslanja na obradu prekursorskog proteina NF- κ B2, p100, čija struktura liči na strukturu I κ B i ima NF- κ B inhibicijske funkcije. Ključni molekularni signal ovog puta je NF- κ B-inducibilna kinaza (*NF- κ B-inducing kinase*, *NIK*), koja aktivira i saraduje sa IKK α kataličkom podjedinicom IKK, za fosforilaciju p100. Ovaj proces izaziva degradaciju p100, stvaranje zrelog NF- κ B2 p52 i nuklearnu translokaciju nekanonskog NF- κ B kompleksa p52/RelB (16).

NF- κ B signalni put doprinosi pokretanju inflamacije i regulisanjem inflamazoma, intracelularnog multiproteinskog kompleksa nazvanog nukleotid-vezujući domen oligomerizacije nalik domenu receptora pirina (*Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3*, *NLRP3*), aktiviranog odgovorom na PAMP i DAMP, a karakteriše ga aktivacija inflamatornih kaspaza. Nepravilna aktivacija inflamazoma povezana je s autoimunim i inflamatornim bolestima. NLRP3 sadrži NLRP3-tačkasti apoptotski protein koji sadrži domen za vezivanje kaspaze (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*, *ASC*) i prokaspazu 1. Kad se NLRP3 aktivira, on pretvara prokaspazu 1 u kaspazu 1 preko ASC. Kaspaza 1 potom cijepa pro-IL-1 β i pro-IL-18 u zrele forme, uzrokujući oslobađanje ovih proinflamatornih citokina. Za aktivaciju NLRP3 (najdetaljnije proučenog inflamazoma) potreban je signal koji indukuje transkripciju NLRP3 i pro-IL. Tipični induktori signala su mikrobnе komponente (ligandi za TLR) i citokini poput TNF- α i IL-1 β , za koje se zna da aktiviraju NF- κ B, koji je transkripcioni aktivator i NLRP3 i pro-IL-1 β gena. Aktivacija NLRP3 proizlazi iz različitih ćelijskih događaja, uključujući efluks K⁺, Ca²⁺ signalizaciju, mitohondrijsko i lizozomsko oštećenje, pri čemu se oslobađaju supstance poput reaktivnih vrsta kiseonika (*Reactive oxygen species*, *ROS*) i lizozomskih proteaza (8).

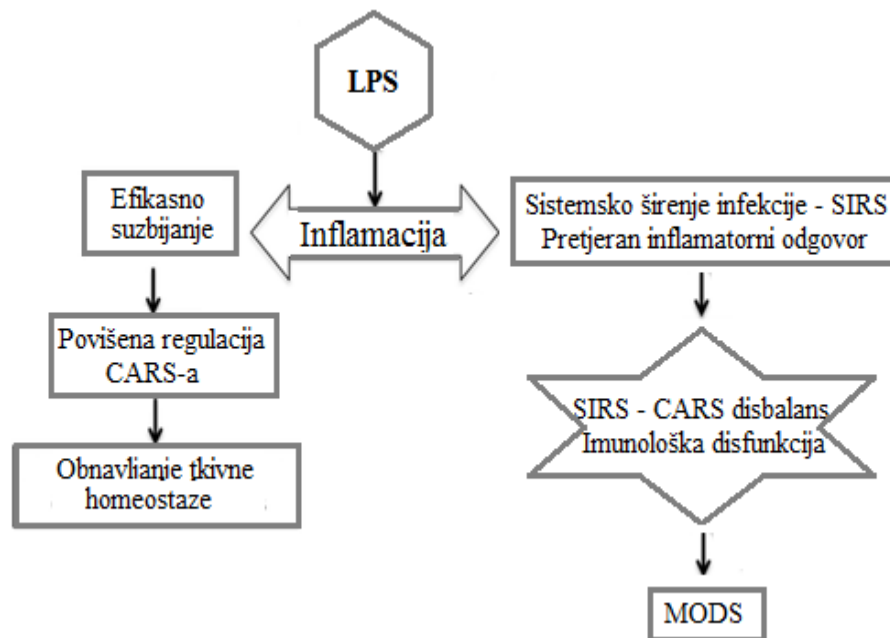
1.2 SIRS i MODS

Za uklanjanje infekcije potrebni su proinflamatorni citokini i aktivacija mikrocidnih odgovora, međutim prekomjerna signalizacija putem TLR4 može izazvati sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (*Systemic inflammatory response syndrome, SIRS*) (17). Osnovu patofiziologije SIRS-a čini citokinska oluja, jer u nekom trenutku borbe protiv štetnog agensa dolazi do stvaranja pozitivne povratne sprege između citokina i imunih ćelija koje ih proizvode. Sistemski proinflamatorni odgovor uključuje aktivaciju više puteva, uključujući citokine, sistem koagulacije krvi, sistem komplementa i oslobađanje proteina akutne faze; dok su najvažnije ćelijske komponente leukociti i endotelne ćelije (18). Kao posljedica pokretanja nekontrolisanog SIRS-a nastaje progresivni poremećaj funkcije dva ili više organskih sistema, tzv sindrom multiorganske disfunkcije (*Multiple organ dysfunction syndrome, MODS*), koji predstavlja najtežu formu nepovoljnog toka sepse i koji je u osnovi svojih patofizioloških dešavanja obilježen promjenama koje se dešavaju na nivou kapilara, prije svega u endotelu (19). Neki citokini su poznati po inducovanju proizvodnje ROS, što dovodi do oštećenja mitohondrija. U slučaju sepse, proizvodnja proinflamatornih medijatora direktno može uzrokovati pad funkcije organa putem stvaranja azot-monoksida (*Nitric-oxide, NO*), što dovodi do mitohondrijalne disfunkcije i citopatske hipoksije. Takođe, aktivacija koagulacije izazvana sepsom, nedostatak kontrole fizioloških antikoagulantnih puteva i oštećena fibrinoliza doprinose razvoju diseminovane intravaskularne koagulopatije (DIK), što ima bitnu ulogu u patogenezi mikrovaskularne disfunkcije i zatajenju organa (18).

Roger Bone je predložio petostepenu kaskadu sepse koja počinje sa SIRS-om i napreduje do MODS-a, ako se organizam na odgovarajući način ne suprostavi kompenzatornim antiinflamatornim odgovorom (*Compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS*) (20). **Faza 1** je lokalna reakcija na mjestu povrede, sa ciljem da ograniči povredu i spriječi širenje. Imune efektorske ćelije oslobađaju citokine koji zauzvrat stimulišu retikuloendotelni sistem promovirajući mehanizam lokalne upale. **Faza 2** je rani CARS u pokušaju da se održi imunološka ravnoteža i uključuje stimulaciju faktora rasta i regrutovanje makrofaga i trombocita kako bi se smanjio nivo proinflamatornih medijatora. **Faza 3** je faza u kojoj se ravnoteža okreće prema proinflamatornom SIRS-u, što dovodi do progresivne endotelne disfunkcije, koagulopatije i aktivacije koagulationog puta. To dovodi do nastanka mikrotromboza u organima i progresivnog povećanja propusnosti kapilara, što može na kraju

rezultirati gubitkom cirkulatornog integriteta. **Fazu 4** karakteriše preuzimanje CARS-a nad SIRS-om, što rezultira stanjem relativne imunosupresije. CARS je posredovan IL-4 i IL-10, koji imaju tendenciju da inhibišu proizvodnju TNF- α , IL-1, IL-6 i IL-8. **Faza 5** se manifestuje nastankom MODS-a sa perzistentnom disregulacijom odgovora i SARS-a i CARS-a. U suštini, ravnoteža između SIRS-a i CARS-a odlučuje gdje je završna tačka u kontinuumu SIRS-a prema MODS-u (21).

Ukratko, ako imuni odgovor domaćina ne uspije da zaustavi infekciju dolazi do sistemskog širenja infekcije, dovodeći do imunološke disfunkcije i progresije inflamatornih procesa na nekontrolisan način, što vodi otkazivanju više organa i na kraju smrti (Slika 2).



Slika 2. Pregled razvoja sepse

Uloga TNF- α i IL-1 je od najveće važnosti u naganjanju ravnoteže ka proinflamatornom preopterećenju. Njihovo djelovanje se može podijeliti u dvije kategorije:

1. *Propagiranje citokinskog puta.* Citokini, iako imaju kratak poluživot od nekoliko minuta do nekoliko sati, imaju centralnu ulogu u septičkom odgovoru. Tokom sepse njihove koncentracije mogu dostići vrijednosti i do nanograma ili čak mikrograma po mililitru (18).

Moćne regulatorne sposobnosti TNF- α , kao glavnog posrednika inflamatornih imunih odgovora, se prenose pomoću dva različita receptora na ćelijskoj površini: Tip I sa relativnom molekulskom težinom od 55 kD i Tip II, sa 75 kD. Većina poznatih ćelijskih odgovora na TNF- α se pripisuje aktivaciji tipa I TNF- α receptora (22). Biološke aktivnosti članova familije IL-1 (IL-1 α , IL-1 β) su vrlo slične. Jedna jedinstvena osobina u porodici IL-1 je da se pro IL-1 u slučaju upale implementira u ćelijsku membranu i može da djeluje kao potpuno aktivan citokin vezan za membranu (23). Oslobođanjem TNF- α i IL-1 dolazi do razdvajanja NF- κ B od njegovog inhibitora što dovodi do oslobađanja drugih proinflamatornih citokina uključenih u patogenezu sepse (24).

2. *Promjena koagulacije koja izaziva abnormalnosti mikrocirkulacije.* Aktivacija koagulacije sa istovremenim poremećajem regulacije antikoagulantnih mehanizama i fibrinolize su skoro univerzalno prisutni u SIRS-u. Kao i većina ranih odgovora u SIRS-u, promjenu koagulacionog puta takođe pokreću TNF- α i IL-1 (25). Oštećenje endotela izaziva otpuštanje tkivnih faktora, ključnih pokretača aktivacije koagulacionog procesa. Osim oštećenja endotela, poremećaju koagulacije doprinosi i poremećena fibrinoliza i to prvenstveno zbog pretjeranog oslobađanja i aktivacije inhibitora aktivatora plazminogena-1. Takođe, postoje sve veći broj dokaza o važnoj međusobnoj komunikaciji između upale i koagulacije, pri čemu ključnu ulogu imaju receptori aktivirani proteazom (*Protease-activated receptors, PARs*). Ova receptorska porodica obuhvata četiri člana (PAR-1 do PAR-4) smještenih na endotelnim ćelijama, mononuklearnim ćelijama, trombocitima, fibroblastima i glatkim mišićnim ćelijama. Proteolitičko cijepanje aktiviranim faktorom koagulacije ili drugim proteazama pokreće transmembransku signalizaciju. Npr. aktivacija PAR-1 trombinom izaziva značajno povećanje proinflamatornih citokina i hemokina *in vitro*. LPS i inflamatorni citokini podstiču ekspresiju PAR-2 i PAR-4 u kultivisanim endotelnim ćelijama. Primjećeno je i povećanje LPS-om indukovane ekspresije IL-6 u kultivisanim endotelnim ćelijama aktivacijom PAR-1 i PAR-2. Sve ovo sugerše da aktivacija više PAR putem koagulacionih proteaza pojačava upalni odgovor tokom sepse (18).

1.3 Apoptoza

Apoptoza je vrsta ćelijske smrti (nazvana i programirana smrt) u kojoj niz molekularnih procesa u ćeliji dovodi do njene smrti. Dokumentovana je kao važan faktor u regulaciji imunološkog sistema, ali i u patološkim stanjima. To je jedan od mehanizama koji organizam koristi da se oslobodi nepotrebnih ili abnormalnih ćelija, a poremećaji u fiziološkim putevima apoptoze mogu dovesti do nastanka brojnih bolesti. Ćelije koje umiru apoptozom pokazuju niz morfoloških promjena (kondenzacija hromatina, smanjenje citoplazme, izbočenje membrane i stvaranje malih apoptotskih vezikula koje sadrže netaknute citoplazmatske organele i nuklearne ostatke), a pored njih apoptotske ćelije prolaze i kroz niz biohemijskih događaja koji uključuju gubitak mitohondrijalnog membranskog potencijala, fragmentaciju DNK i cijepanje proteina (26).

Glavni izvršiocu u apoptotskom putu su proteaze poznate kao kaspaze. Kaspaze se nalaze kao latentni prekursori. Jednom aktivirane pokreću ćelijsku smrt uništavajući ključne komponente ćelije i tako posreduju u oštećenju ćelija. Do sada je identifikovano 11 članova porodice kaspaza u ljudskom organizmu. One se kategorizuju kao inicijatorske (pokretačke) ili efektorske (izvršne), zavisno od njihovog položaja u apoptotskim signalnim kaskadama. Kaspaze su u suštini i pokretači i izvršiocu apoptoze (27). Inicijatorske se aktiviraju apoptotskim signalima i aktiviraju efektorke kaspaze, koje onda direktno utiču na apoptozu ćelije (28).

1.3.1 Biohemijski putevi apoptoze

Proces apoptoze se može odvijati unutrašnjim putem (koji uključuje mitohondrije) i spoljašnjim putem (koji se aktivira putem receptora smrti na ćelijskoj membrani). Ova dva apoptotska puta jesu nezavisna, ali mogu da intereaguju putem usklađenih komunikacija koje uključuju ključne proteine zajedničke za oba puta. Oba puta kombinuju aktivaciju inicijatorske kaspaze kako bi pokrenuli efektorske kaspaze 3 i 7 (26).

Unutrašnji put apoptoze pokreću različiti stresovi unutar i izvan ćelije, uključujući oksidativni stres koji je usmjeren prema mitohondrijama, što dovodi do proboja membrane, oslobađanja apoptogenih proteina i poremećaja mitohondrijalnog membranskog potencijala, što vodi aktivaciji kaspaza i konačnoj smrt ćelije. Ovaj put, a posebno permeabilnost

mitohondrijske spoljašnje membrane, je regulisan proteinima koji pripadaju porodici proteina BCL-2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2*) koja se dijeli na pro- i antiapoptotske članove (29). Antiapoptotski članovi su B-ćelijski limfom-2 (*B-Cell Lymphom-a 2, BCL-2*), BCL-2 X-vezani protein (*BCL2 X-linked protein; BCL-XL*), BCL-2 kao 2 (*BCL2 like 2, BCL-W*), mijeloidna leukemija 1 (*Myeloid cell leukemia 1, MCL-1*) i BCL2 povezan protein A1 (*BCL2 related protein A1, BFL-1*). Oni su sastavni dio spoljašnje membrane mitohondrija. Proapoptotski članovi BCL-2 porodice proteina podjeljeni su u dvije podgrupe: (a) oni koji sadrže kombinacije domena BH1, BH2 i BH3: BCL-2-vezani X protein (*BCL-2-associated X protein, BAX*), BCL-2 antagonist (*BCL-2 antagonist/killer, BAK*), (b) proapoptotski članovi koji se zovu i „proteini samo za BH3“ : *BID, BIM, BIK, BAD, BMF, HRK, NOKA, PUMA, BLK, BNIP3 i SPIKE* (30). Proapoptotski članovi BAX i BAK se obično nalaze u citosolu kao inertne forme. Nakon indukcije apoptoze oni prolaze kroz konformacione promene, oligomerizuju se i translociraju u mitohondrijalnu membranu, gdje formiraju specifične pore za oslobađanje apoptogenih faktora, poput citohroma c. Citohrom c se oligomerizuje sa faktorom aktivacije apoptotičke proteaze 1 (*Apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1*) i prokaspazom 9 da bi formirali apoptosom. Apoptozom cijepa i aktivira kaspazu 9, koja dalje aktivira efektorsku kaspazu 3 koja dovodi razaranja ćelije i apoptoze (27). Suprotno tome, antiapoptotski proteini BCL-2 i BCL-XL sprečavaju translokaciju citohroma c u citoplazmu i time sprečavaju apoptozu (31).

Spoljašnji put apoptoze ili put receptora smrti je put u kojem je kaspaza 8 dominantna inicijatorska kaspaza. U ćelijama tipa I ovaj enzim direktno aktivira efektorske kaspaze održavajući apoptotski proces. Međutim, u tipu II ćelija koje koriste signalne puteve, poput hepatocita, napredak apoptotske kaskade se u potpunosti oslanja na njegovo pojačavanje od strane mitohondrija. U ovom slučaju, kaspaza 8 cijepa neaktivni citoplazmatski BH3 protein poput BAK-a (*Bax-Like BH3 Protein, BID*) čime ga aktivira, a kada je aktiviran on izaziva konformacione promene u proapoptotskim BAX i BAK, koji zauzvrat prenose smrtonosne podražaje mitohondrijama. Ova koordinacija između oba puta naglašava ključnu ulogu mitohondrija tokom programirane ćelijske smrti (26, 27).

Spoljašnji put apoptoze započinje kada se ekstracelularni ligandi poput TNF- α , Fas ligand (*Fas ligand, FasL*) i ligand koji indukuje TNF-vezanu apoptozu (*TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL*) vežu i aktiviraju svoje transmembranske „receptore smrti“-TNFR1,

Fas i TRAIL receptor. Zatim ovi receptori regrutuju domen smrti vezan za Fas (*Fas associated death domain, FADD*) i prokaspazu, što rezultira formiranjem smrtonosnog indukujućeg signalnog kompleksa (*Death-inducing signaling complex, DISC*) koji aktivira kaspazu 8. Kaspaza 8 potom pokreće kaskadu efektorskih kaspaza, pokrećući unutrašnji put apoptoze (27).

TNFR1 je glavni receptor za transdukciju signala iz TNF- α koji indukuje apoptozu preko TNFR. Međutim, ovaj signalni put aktiviran vezivanjem TNF- α za TNFR1 je zapravo indukcija faktora transkripcije NF- κ B, koji je u većini slučajeva odgovoran za opstanak i rast ćelija (28).

Aktivirane kaspaze 9 ili 8 indukuju aktivaciju efektorskih kaspaza 3, 6 i 7 što dovodi do smrti ćelije. U slučaju SIRS-a izazvanog LPS-om makrofazi imaju štetne efekte dovodeći do progresivnog oslobađanja proinflamatornih citokina poput IL-8, IL-1 β i IL-6, ali eksperimentalni dokazi ukazuju na TNF- α i NO kao primarne posrednike u patogenezi SIRS-a, a apoptoza je uključena u krajnji MODS tokom SIRS-a. TNF- α indukuje rane apoptotske događaje (3-6 sati), dok se apoptotski događaji zavisni od inducibilne sintaze azot-monoksida (*Inducible nitric-oxide synthase, iNOS*) javljaju kasnije (12-24 sata) (22).

1.4 Endotelna (dis)funkcija

Najznačajnije funkcije endotela su: kontrola vaskularnoga tonusa, inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita, regulacija proliferacije glatkih mišićnih ćelija i moduliranje propustljivosti zida krvnog suda (32). Svojim autokrinim, parakrinim i endokrinim lučenjem endotelne ćelije djeluju na niz ćelijskih linija: trombocite, leukocite i glatke mišićne ćelije, ali i na druga, različito udaljena tkiva (33). Izraz “endotelna funkcija” se koristi kako bi se opisala sposobnost endotela da otpušta vazoaktivne supstance i na taj način reguliše krvni protok. Do sada su otkriveni brojni endotelni faktori relaksacije (*Endothelium-derived relaxing factors, EDRF*), koji se većinom otpuštaju u odgovoru na povećanu koncentraciju unutarćelijskog kalcija. Najvažniji EDRF su NO, prostaciklin I2 (*PGI2*) i endotelni hiperpolarizirajući faktori (*Endothelial-derived hyperpolarization factors, EDHF*). Nadalje, endotelne ćelije su mjesto proizvodnje i važnih endotelnih faktora kontrakcije (*Endothelial-derived constricting factors, EDCF*), od kojih su najmoćniji endotelin 1 (*Endothelin 1, ET-1*) i tromboksan A2 (*Thromboxane A2, TX-A2*) (34).

Endotelna disfunkcija je termin koji opisuje stanje oštećenog endotela, odnosno njegove poremećene funkcije (35). Dok je fenotip neaktivirane, “mirne” endotelne ćelije antikoagulantni, antiinflamatorni i vazodilatacijski, endotelna disfunkcija je promjena koju karakteriše inflamatorni, protrombotski i vazokonstriksijski fenotip (36). Neadekvatna raspoloživost NO jedna je od glavnih obilježja endotelne disfunkcije. Nesrazmjer raspoloživosti NO i aktivnosti vazokonstriksijskih faktora je temelj sklonosti vazokonstrikciji u endotelnoj disfunkciji. Osim oštećenja endotel-zavisne vazodilatacije krvnih sudova, patofiziološke posljedice razvoja endotelne disfunkcije su: abnormalna vaskularna reaktivnost i spazam krvnih sudova; povećana propusnost endotela za makromolekule; povećana ekspresija hemotaktičkih i adhezionih molekula: intracelularni adhezioni molekul 1 (*Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1*), vaskularni adhezioni molekul 1, (*Vascular adhesion molecule 1; VCAM-1*) i E-selektin; regrutovanje i akumulacija monocita/makrofaga u intimi krvnih sudova; smanjena regeneracija endotelnih ćelija; povećana proliferacija i migracija glatkih mišićnih ćelija i ekspresija prokoagulantnih molekula (stvaranjem trombina, agregacijom i adhezijom trombocita i odlaganja fibrina) (37). Faktori koji dovode do nastanka endotelne disfunkcije su aktivacija citokina u upalnim procesima, ROS, povišena koncentracija plazmatskih oksidiranih lipoproteina male gustine, infekcije bakterijama, virusima ili drugim patogenima, hiperhomocisteinemija itd (38).

1.5 Oksidativni stres

Ako se stepen oštećenja ćelije poveća preko neke određene granice, da li zbog neadekvatne antioksidativne zaštite ili povećane produkcije slobodnih radikala, dolazi do nastanka oksidativnog stresa. Tokom oksidativnog stresa povećano je prisustvo ROS i smanjen je nivo antioksidativnih mehanizama (39). Važne osobine slobodnih radikala su velika hemijska reaktivnosti i niska specifičnosti za reaktante (40). U biološkim sistemima nastaju spontano, a koncentracija im se drastično povećava usljed neadekvatne antioksidativne zaštite. Po nastanku, dolazi do brze reakcije slobodnih radikala sa primarnim biomolekulima, kao što su proteini, nukleinske kiseline, lipidi i ugljeni hidrati, a efekti mogu biti povoljni ili nepovoljni po organizam (41). Oštećenje izazvano slobodnim radikalima, zavisno od intenziteta i obima, može voditi ka adaptaciji (indukcija antioksidativnih mehanizama odbrane), ili ozbiljnom poremećaju metabolizma ćelije (prekid DNK lanca, povećanje intracelularnog slobodnog Ca^{2+} , oštećenja membranskih jonskih transportera i/ili drugih specifičnih proteina i lipidne

peroksidacije) i posljedične aktivacije signalnih puteva koji vode do ćelijske smrti, bilo mehanizmom apoptoze ili nekroze (42).

1.5.1 Reaktivne vrste kiseonika i azota; antioksidativni mehanizmi

Reaktivne vrste kiseonika su: superoksid anjon radikal (O_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksil radikal ($HO\bullet$), a reaktivne vrste azota (*reactive nitrogen species, RNS*) su NO, koji se stvara od strane azot-monoksid sintaze, i peroksinitrit anjon ($ONOO^-$), koji nastaje reakcijom NO sa O_2^- . Peroksinitrit anjon reaguje sa drugim molekulima da bi nastali drugi RNS, poput $\bullet NO_2$ i N_2O_3 . ROS se proizvode normalno, ili kao rezultat toksičnih napada u više odjeljaka unutar ćelije. Mitochondrije se smatraju primarnim mjestom proizvodnje ROS u toku aerobnog disanja u fiziološkim, ali i patofiziološkim uslovima (43). Značajna uloga kao izvora ROS pripisuje se i endoplazmatskom retikulumu i peroksisomima, pogotovo u jetri (44).

U organizmu ROS i RNS neprestano se stvaraju kao posljedica unutrašnjih metaboličkih procesa i izloženosti spoljašnjim faktorima. Da bi se očuvala ravnoteža redoks stanja u ćelijama, postoje antioksidativni sistemi koji djeluju protiv ROS i RNS. Glavni antioksidanti uključuju redukovani glutation (*Reduced glutathione, GSH*), vitamine C i E, kao i nekatalitičke antioksidantne proteine poput tioredoksina (*Thioredoxin, Trx*), glutationa (*Glutathione, Grx*) i metalotionina (*Metallothionein, MT*). Pored toga, enzimi kao što su superoksid dismutaza (*Superoxyde dismutase, SOD*), katalaza (*Catalase, CAT*), peroksid reduktaza (*Peroxide reductase, Prx*), glutation peroksidaza (*Glutathione peroxidase, GPx*) i hem-oksigenaza 1 (*Heme oxygenase-1, HO-1*) takođe igraju ključnu ulogu u neutralizaciji ROS i održavanju homeostaze. Redoks reakcije u ćelijama podržavaju se kroz aktivnosti nukleotidnih parova Nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat u oksidovanom i redukovanom obliku, $NADP^+/NADPH$, i nikotinamid adenin dinukleotid u oksidovanom i redukovanom obliku, $NAD^+/NADH$. Mnogi od ovih antioksidativnih enzima/proteina nalaze se u specifičnim odjeljcima unutar ćelije kako bi regulisali redoks signalizaciju i ćelijsku homeostazu u lokalnom okruženju (43).

Iako se ROS i RNS smatraju štetnim, jer izazivaju oksidativni stres, važno je napomenuti da imaju i korisne funkcije. Naime, u fiziološkim uslovima, koji se nazivaju oksidativni eustres, redoks signalizacija igra važnu ulogu u održavanju ravnoteže u ćelijama. Ona utiče na brzinu rasta ćelija, procese diferencijacije i razvoja matičnih ćelija, imunološku

funkciju, upalu i adaptivne odgovore (45). Sa druge strane, nekontrolisana proizvodnja oksidanata dovodi do oksidativnog stresa, što može da naruši funkciju ćelija i da doprinese ćelijskom propadanju i razvoju bolesti i toksičnosti. Ravnoteža između adaptivnog odgovora i progresije oštećenja vjerovatno zavisi od veličine oštećenja ćelija i intenziteta posljedične aktivacije puta (46).

1.5.2 Regulator ćelijskog odgovora na oksidativni stres-Nrf2

Nuklearni eritroidni faktor 2 (*Nuclear factor erythroid 2- related factor 2, Nrf2*) je ključni kontrolor otpornosti ćelija na oksidativni stres. On upravlja ekspresijom gena koji su aktivirani putem elemenata antioksidativnog odgovora, kako u normalnim uslovima tako i tokom izloženosti oksidantima. Na taj način Nrf2 utiče na širok spektar fizioloških i patofizioloških procesa povezanih sa oksidativnim stresom. Ova njegova uloga je dokazana brojnim istraživanjima (47).

U normalnim uslovima Nrf2 je povezan sa svojim inhibitorom, proteinom Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), koji ga usmjerava ka procesu ubikvitinacije putem enzima Keap1-Cullin3 E3 ubikvitin ligaze, što zatim dovodi do njegove proteazomske razgradnje. Kao rezultat toga Nrf2 se brzo razgrađuje, sa relativno kratkim poluživotom od oko 20 minuta, što rezultira niskim nivoima Nrf2 u mnogim tipovima ćelija. Međutim, pod uticajem oksidativnog stresa dolazi do modifikacije ključnih cisteinskih tiola Keap1 i Nrf2 i posljedične promjene strukture Nrf2/Keap1 kompleksa, što rezultira inhibicijom ubikvitinacije Nrf2 i njegovom translokacijom u jezgro. U jezgrou, Nrf2 formira heterodimer sa malim proteinima muskuloaponeurotičnog fibrosarkoma (*musculoaponeurotic fibrosarcoma, MAF*): MafF, MafK i MafG koji su transkripcioni faktori, članovi superfamilije aktivatora proteina-1 (*Activator protein-1, AP-1*) i koji su neophodni za povećanje ekspresije gena zavisnih od elementa antioksidativnog odgovora, što dalje utiče na oksidativnu (pato)fiziologiju (48). Kao odgovor na oksidativni stres oko 200 citoprotektivnih gena regulisano je putem Nrf2. Na ovaj način Nrf2 učestvuje u kontroli nekoliko programskih funkcija poput apoptoze, signalizacije inflamazoma, autofagije i biogeneze mitohondrija (49).

Osim interakcije sa cisteinskim tiolom postoje i drugi mehanizmi regulacije Nrf2. Npr. direktna interakcija između proteina p21 i Nrf2, pri čemu p21 mijenja konformaciju kompleksa Keap1-Nrf2. Kada se ekspresija p21 smanji, to značajno smanjuje nivo Nrf2 i njegovih ciljnih

gena. Takođe, protein fosfoglicerat mutaza 5 (PGAM5), koji interreaguje sa BCL-XL, formira kompleks koji uključuje i Nrf2 i Keap1. U ovom kompleksu, homodimerični Keap1 istovremeno veže kako Nrf2, tako i PGAM5. Gubitak bilo Keap1 ili PGAM5 aktivira Nrf2-zavisnu ekspresiju gena (50). Na regulaciju Keap1-Nrf2 puta utiče i protein p62, koji je ključna veza između autofagije i Nrf2 (51). Gubitak autofagije uzrokuje značajnu akumulaciju p62, što dalje potiskuje Keap1 i aktivira Nrf2 i povećava ekspresiju gena elemenata antioksidativnog odgovora. Protein p62 se pojačano reguliše i u TLR4 posredovanoj autofagiji, a akumulacija p62 zahtjeva aktivaciju Nrf2 putem TLR4/MyD88 signalizacije zavisne od ROS-p38 ose (52).

Nrf2 reguliše homeostazu ROS u mitohondrijama putem indukcije katabolizma superoksida i peroksida putem SOD, Prx i GPx; regeneracije oksidovanih koenzima i proteina Trx2, GSH i Prx3-SO₂H, od strane TrxR, GSR i Srx; sinteze redukujućih faktora, tj. GSH i NADPH; ekspresije antioksidativnog proteina Trx i inhibicije njegovog inhibitora. Osim toga, Nrf2-Keap1 formira kompleks sa PGAM5, koji se lokalizuje na spoljašnjoj membrani mitohondrija i ova mitohondrijska lokalizacija omogućava Nrf2 da direktno odgovori na ROS u mitohondrijama (43).

Oksidansi stimulišu nekoliko programiranih funkcija ćelije, a pokazano je da Nrf2 ima ulogu u regulaciji ovih funkcija, među kojima su upala i apoptoza. Brojna istraživanja su potvrdila da je Nrf2 anti-inflamatoran. U odgovoru na inflamatorne stimuluse Nrf2 inhibiše aktivaciju NF- κ B i produkciju proinflammatornih citokina i hemokina, te smanjuje ekspresiju adhezionih molekula (ICAM-1, VCAM-1). Dodatno, brojne studije istraživale su potencijalne mehanizme i Nrf2-regulisane kontrole NLRP3 inflamazoma i pokazano je da Nrf2 inhibiše aktivaciju NLRP3 prvenstveno blokirajući proizvodnju ROS. Takođe, Nrf2 smanjuje ekspresiju gena koji učestvuju u formiranju inflamazoma, kaspazu 1, IL-1 β i IL-18, što dovodi do inhibicije aktivnosti NLRP3 inflamazoma (53).

Nrf2 ima ključnu ulogu na spoju između ROS signalizacije, odgovora na stres endoplazmatskog retikuluma, metabolizma i autofagije i zbog toga nije iznenađujuće što su Nrf2 ciljni geni uključeni u različite procese kao što su antioksidativni sistem, detoksikacija i izlučivanje ksenobiotika, odgovor na oštećenje DNK, autofagija i antiapoptotski mehanizmi. Nrf2 utiče i na fiziologiju i patologiju mitohondrija, koje osim što su glavno mjesto proizvodnje ROS one su i mjesto gdje se presjecaju apoptotski putevi. Pokazano je da ćelije bez Nrf2 pokazuju povećanu spontanu apoptozu (54).

1.6 Akvaporini

Akvaporini (*Aquaporins, AQPs*), ili vodeni kanali, nazvani „vodovodni sistem ćelije“, su porodica malih, hidrofobnih transmembranskih proteina (proteinskih kanala), čija je glavna uloga u osmotski vođenom, selektivnom transportu vode unutar i iz ćelije, kroz ćelijske membrane različitih organskih sistema (pluća, bubrezi, centralni nervni sistem, srce, koža, oči itd), istovremeno sprečavajući transport jona i rastvora koji zahtjevaju odvojene membranske kanale, čime regulišu vodenu homeostazu. Transport tečnosti kroz ćelijske membrane može biti pokrenut osmotskim gradijentom u normalnim fiziološkim uslovima i/ili diferencijalnim hidrostatskim pritiskom, kao što može biti slučaj u određenim patološkim stanjima poput edema (55). Da bi se zadovoljili ovi različiti procesi transporta tečnosti, AQP pokazuju raznolikost u distribuciji u različitim ćelijama i tkivima u različitim organskim sistemima, u zavisnosti od potreba za transportom vode. Npr. četiri AQP su izražena u plućima, dok bubrezi, koji ima kontinuiranu potrebu za većom propustljivošću za vodu i brzim transportom vode, izražava šest AQP. Što se tiče ćelijske distribucije, AQP eksprimiraju one ćelije koje zahtjevaju od nekoliko do oko 50 puta veću osmotsku propustljivost za vodu (56).

U ljudskom tijelu je otkriveno 13 tipova AQP, od kojih su AQP1, 3, 4 i 5 eksprimirani u respiratornom sistemu (57). AQP1 i AQP5 se pretežno javljaju u endotelu krvnih sudova i alveolarnom epitelu, omogućavajući tako kretanje tečnosti između alveolarnog prostora i pripadajuće vaskularne mreže. AQP1 se izražava i u fibroblastima i mezotelijalnim ćelijama (pleura). AQP3 se izražava u bazalnim epitelnim ćelijama nazofarinksa i velikih disajnih puteva, dok se AQP4 pojavljuje u ćelijama cilijarnog epitela nazofarinksa, traheje i bronha. AQP5 nalazi se u alveolarnim ćelijama tipa I i acinusnom epitelu submukoznih žlijezda (55). Specifična ekspresija i lokalizacija četiri AQP u plućnom tkivu olakšavaju transport vode kroz različite dijelove pluća. Npr. ekspresija AQP u epitelu submukoznih žlijezda i vazdušnih puteva omogućava lučenje tečnosti, održavajući tanak sloj tečnosti na površini vazdušnih puteva. (58). Nekoliko studija na životinjskim modelima pokazalo je regulaciju AQP tokom razvoja pluća. Pokazano je da se AQP1 eksprimira neposredno prije rođenja, dramatično se povećava u perinatalnim i odraslim plućima glodara (59), dok je AQP5 pokazao postepeno povećanje ekspresije od rođenja do odraslog doba.

Nekoliko članova AQP (poput 3, 7, 9 i 10) su pokazali sposobnost transporta glicerola, te se stoga nazivaju akvagliceroporinima (*Aquaglyceroporins*), a dodatni dokazi ukazuju na

potencijalnu ulogu određenih AQP, kao što je AQP9, u transportu drugih neutralnih molekula, uključujući gasove (CO₂, NH₃, NO, O₂) i male rastvore (H₂O₂, urea), pa čak i jone (K⁺, Cl⁻), kao što je slučaj sa AQP6. Osim toga, javljaju se sugestije o nekonvencionalnim funkcijama određenih AQP u procesima kao što su migracija i adhezija ćelija i regulacija drugih kanala (57).

1.6.1 Strukturni aspekti akvaporina

AQP su homo-tetrameri u biološkoj membrani, koji se sastoje od četiri identična monomera od približno 30 kDa, od kojih svaki ima sposobnost da funkcioniše nezavisno kao kanal. Monomeri AQP se sastoje od šest transmembranskih α -heliksa i dva kratka heliksna segmenta koja omogućavaju formiranje vodene pore u membrani. Heliksi su povezani ekstra i intracelularnim petljama sa amino- i karboksilnim krajevima monomera. U poređenju sa AQP koji selektuju vodu (AQP1, 2, 4, 5 i 8), akvagliceroporini sadrže više hidrofobnih amino kiselina koje oblažu pore i pokazuju manje suženje pore (60).

1.6.2 Uloge akvaporina

Konvencionalna uloga AQP je funkcija transporta vode. U vazдушnim putevima i plućima normalni fiziološki procesi, uključujući hidrataciju vazdušnog prostora, apsorpciju tečnosti u slučaju plućnog edema i sekreciju tečnosti iz submukoznih žlijezda u vazдушnom prostoru, zahtjevaju precizan transport tečnosti kroz različite dijelove pluća. AQP u plućima posreduju u transportu tečnosti kroz endotelne i epitelne slojeve transćelijskim, a ne paraćelijskim putem. Većina AQP ima ključnu ulogu u prenošenju vode kroz ćelijske membrane u odgovoru na osmotski gradijent formiran putem aktivnog transporta rastvora. Membrane često sadrže visoku koncentraciju AQP, ponekad i do 10.000 po kvadratnom mikronu. Simulacije molekularne dinamike ukazale su da su sterički faktori i elektrostatičke interakcije u vodenom kanalu ključni za selektivnost AQP u prenosu vode (61).

Regulacija transporta vode kroz AQP se reguliše putem tri različita mehanizma: pomoću translokacije, regulacija na nivou transkripcije/translacije i regulacija putem konformacionih promjena (62). Najefikasniji način regulacije je translokacija AQP na plazma membranu u odgovoru na određene podsticaje, npr AQP5 u epitelnim ćelijama pluća može biti translociran pod uticajem LPS-a (63).

Osim u plućima istraživane su i ekstrapulmonarne konvencionalne uloge AQP. U studijama sa miševima bez određenih AQP primjećeno je sljedeće: miševi sa nedostatkom AQP1-4 pokazali su nedostatak sposobnosti koncentracije mokraće u bubrezima; sa nedostatkom AQP3 smanjenje hidratacije kože zbog smanjenog nivoa glicerola u epidermu i rožnatom sloju kože; sa nedostatkom AQP5 pokazali su oštećenje u sekreciji tečnosti u pljuvačnoj žlijezdi; sa nedostatkom AQP7 pokazali su hipertrofiju adipocita i veću masu masti zbog nakupljanja intracelularnog glicerola i povećanih triglicerida (55).

Nekonvencionalne uloge AQP. Pokazalo se da AQP,osim konvencionalne, imaju i druge uloge uključujući migraciju/proliferaciju ćelija (AQP3), permeaciju gasova (AQP9) i inflamatorni odgovor (AQP5). Pokazano je da AQP5 igra ključnu ulogu kao pojačivač inflamatornog odgovora (64). Oni su pokazali da slabljenje siRNK ekspresije AQP5 u ćelijskoj liniji alveolarnih epitelnih ćelija rezultira smanjenjem transkripcione ekspresije hemokina KC indukovane sa TNF- α . Obrnuto, povećana ekspresija AQP5 u ćelijskoj liniji fibroblasta povećala je ekspresiju hemokina KC. Ova uloga AQP5 kao pojačivača inflamatornog signala vjerovatno se ostvaruje kroz aktivaciju ERK i NF- κ B signalnih puteva. Istraživanja su identifikovala ulogu AQP u inflamatornom odgovoru vezanom i za inflamazom. Blokada AQP *in vitro* u makrofazima aktiviranim NLRP3 aktivatorima rezultirala je smanjenom proizvodnjom IL-1 β (65).

1.7 Endotoksemija i akutno oštećenje jetre i bubrega

Jetra je ključna za brojne fiziološke i patološke procese, kao što su imuni odgovor, detoksikacija, metabolizam i ćelijska homeostaza, zbog čega je posebno podložna uticaju cirkulišućih antigena, opasnih signala i endotoksina poput LPS-a (66). Hepatički odbrambeni mehanizmi imune aktivacije kod pacijenata sa sepsom su važni za eliminaciju mikrobnih produkata; međutim, prekomjerni sistemski inflamatorni odgovor izaziva oštećenje hepatocita i otkazivanje organa (67).

Interakcija LPS-a sa Kupferovim ćelijama igra odlučujuću ulogu u nastanku akutnog oštećenja jetre. LPS aktivira Kupferove ćelije klasičnim CD14 zavisnim putem, gdje LBP prenosi LPS na receptor CD14 na membrani Kupferovih ćelija, i alternativnim putem preko sCD14, koji se vezuje za receptor na Kupferovim ćelijama uz pomoć drugih proteina (npr. LDL). Ovi putevi aktiviraju signalnu transdukciju i sintezu citokina i hemotaksijskih supstanci koje privlače neutrofile. Aktivirani neutrofili povećavaju ekspresiju adhezionih receptora (CD11b/CD18) i vezuju se za endotel jetrenih sinusoida. Istovremeno, raste ekspresija ICAM-1 na endotelnim ćelijama, omogućavajući migraciju neutrofila u sinusoidne. ROS koje proizvode ovi neutrofili izazivaju lipidnu peroksidaciju ćelija. Toksični medijatori, poput NO, koje oslobađaju Kupferove ćelije, dodatno pogoršavaju oštećenje jetre, izazivajući agregaciju trombocita u mikrotrombe, što usporava protok krvi i dovodi do hipoksije. Nekroza jetre se u ovom kontekstu uglavnom pripisuje poremećenoj mikrocirkulaciji. Tako, oštećenje jetre predstavlja rezultat interakcija između Kupferovih ćelija, akumuliranih neutrofila i hepatocita (68).

Bubrezi su takođe među organima koji su često pogođeni i oštećeni sepsom, zbog njihove ključne uloge u hemodinamskoj i ćelijskoj homeostazi. Oštećenje bubrega izazvano endotoksemijom povezano je sa produženim inflamatornim odgovorima, oksidativnim stresom, smrću ćelija tubula i metaboličkom disfunkcijom, što na kraju dovodi do otkazivanja bubrega. Ove abnormalnosti su glavne karakteristike za inicijaciju akutnog oštećenja bubrega, kao i ključni faktori rizika za razvoj hronične bubrežne bolesti (69).

Inhibicija aktivnosti NF- κ B smanjuje inflamatorni odgovor i signalizaciju povezanu sa smrću ćelija u mnogim bolestima, uključujući akutno oštećenje jetre i bubrega (70, 71). Pokazano je da suzbijanjem aktivacije NF- κ B dolazi do smanjene ekspresije proinflamatornih medijatora u LPS-tretiranim hepatocitima i ćelijama bubrežnih tubula, kao i u makrofagima (72).

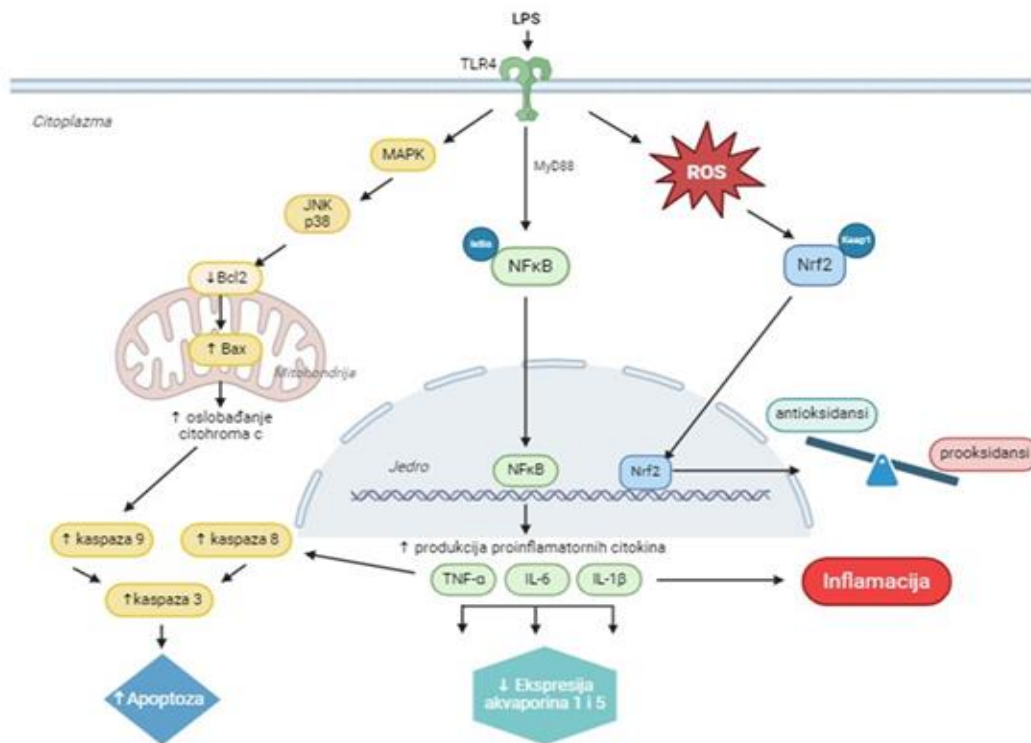
1.8 Endotoksemija i akutno oštećenje pluća

Iako je upala ključni mehanizam za uklanjanje patogena, njena pretjerana aktivacija može izazvati štetne posljedice kao što je oštećenje tkiva. Po definiciji Američko-Evropskog komiteta za konsenzus indirektna akutna povreda pluća je „sekundarni ili ekstrapulmonalni događaj koji proizilazi iz akutnog sistemskog inflamatornog odgovora“ (73). Nakon pokretanja SIRS-a, sistemski cirkulišući medijatori ciljaju parenhim ili vaskulaturu pluća dovodeći do njihovog oštećenja, a to je jedna od najčešćih komplikacija sepse, jer su pluća najosjetljiviji, najizloženi i najvulnerabilniji organ u sepsi (74).

Akutno oštećenje pluća je stanje koje karakteriše oštećenje alveolarno-kapilarnog zida, intersticijalni i alveolarni edem, infiltracija neutrofila i abnormalna apoptoza ćelija (75). Naime, nakon što dođe do infekcije, dolazi do oštećenja kapilarnih endotelnih i alveolarnih epitelnih ćelija i posljedičnog narušavanja integriteta endotelne i epitelne barijere pluća. Ovo narušavanje rezultira njenom povećanom permeabilnošću za tečnost i proteine, što dovodi do formiranja edema u alveolama. Paralelno s tim, primjećuje se i intenzivna regrutacija i akumulacija neutrofila, monocita, inflamatornih citokina i eritrocita u alveolarnom prostoru (76).

1.8.1 Patofiziologija akutnog oštećenja pluća u endotoksemiji

Različiti patofizioloških mehanizama imaju ulogu u nastanku akutnog oštećenja pluća u endotoksemiji, uključujući inflamaciju, oksidativni stres, apoptozu, poremećaje koagulacije i plućnog surfaktanta (77) (Slika 3).



Slika 3. Patogeneza akutnog oštećenja pluća u endotoksemiji

U patogenezi akutnog oštećenja pluća TLR4 receptor ima ključnu ulogu. Ekspresija TLR4 je zapažena u različitim tipovima plućnih ćelija, uključujući endotelne ćelije krvnih sudova i epitelne ćelije respiratornih puteva. Svojim istaživanjem Guillot i saradnici su pokazali da su alveolarne epitelne ćelije tipa II aktivirane LPS-om putem TLR4 signalizacije, te da pojačavaju inflamatorni proces u plućima (78). Dodatno, inhibicija p38 MAPK puta, nakon indukcije LPS-om, rezultira blokadom upalnog procesa u plućima, kako je pokazano u radu Schnyder-Candrian-a i saradnika (79). Nivo ekspresije TLR4 direktno je povezan sa ozbiljnošću inflamatorne reakcije. Zapaženo je da oštećenje mikroarhitekture, oštećenje alveolarnog epitela i vaskularnog endotela, kao i regrutacija polimorfonuklearnih leukocita zavise od nivoa ekspresije Tlr4 gena (80).

U eksperimentalnim modelima akutnog oštećenja pluća izazvanog LPS-om, dokumentovana je aktivacija NF-κB, uz istovremeno značajno povećanje ekspresije gena citokina, kao što su TNF-α, IL-6 i IL-1β (81). Kada se LPS veže za plućne TLR4 receptore pokreće se fosforilacija i degradacija IκBα, što rezultira nuklearnom translokacijom i aktivacijom puta NF-κB, što dalje dovodi do prekomjernog oslobađanja proinflamatornih

citokina. Studija Noulin-a i saradnika je pokazala da MyD88 signalni put ima ključnu ulogu u upali pluća izazvanoj LPS-om. Kod miševa bez MyD88 primjećeno je smanjenje produkcije citokina, curenja proteina i regrutacije neutrofila; i TIRAP, a ne TRIF, je neophodan za LPS-indukovanu inflamatornu reakciju u plućima (82).

Plućni vaskularni endotel je esencijalna meta koja ima kritičnu ulogu u patogenezi akutnog oštećenja pluća izazvanog LPS-om. Nakon izloženosti LPS-u i aktivacije endotelnih ćelija putem TLR4 signalizacije, one pojačano eksprimiraju adhezione molekule i oslobađaju vazoaktivne supstance, inflamatorne medijatore i hemokine te posreduju u infiltraciji i zadržavanju polimorfonukleara i time pogoršavaju oštećenje pluća (83, 84). Endotelne ćelije koje su aktivirane na lokalnom nivou imaju ulogu u odbrani organizma od infekcije, ali kada dođe do sistemske aktivacije ovih ćelija to rezultira mikrovaskularnom trombozom, smanjenjem krvnog pritiska, hipoksijom i na kraju oštećenjem tkiva (85). Studija Andoneguita i saradnika je pokazala da su endotelne ćelije u akutnom oštećenju pluća izazvanom LPS-om važnije kao ćelije stražari nego regrutovani polimorfonukleari (86).

Osim u plućnim endotelnim ćelijama TLR4 je eksprimiran i u bronhijalnim i alveolarnim epitelnim ćelijama. Očuvanje integriteta epitelne barijere je od ključnog značaja za održavanje normalnog plućnog stanja. Oštećenje integriteta epitela rezultira pojačanim prodiranjem tečnosti u alveole, dok se smanjuje sposobnost tkiva za reapsorpciju tečnosti (87).

U akutnom oštećenju pluća nakon vezivanja LPS za TLR4, dolazi i do indukcije aktivacije nizvodnih signalnih puteva odgovornih za infiltraciju neutrofila u pluća (88). Osim akumulacije neutrofila u alveolarnom prostoru dolazi i do nakupljanja aktiviranih trombocita putem interakcije sa neutrofilima. Ovi agregati neutrofila i trombocita pokazuju veći kapacitet fagocitoze, adhezivne funkcije i sposobnost proizvodnje ROS, čime doprinose oštećenju pluća. Endotelni TLR4 i CD14 zavisni odgovori u LPS indukovanom oštećenju pluća su odgovorni za nakupljanje neutrofila (78).

Oksidativni stres ima značajnu ulogu u nastanku inflamacije i progresiji oštećenja pluća u slučaju sepse. U normalnim okolnostima, antioksidativni sistem neutrališe ROS i RNS, čime se spriječava oštećenje tkiva. Međutim, u slučaju akutnog oštećenja pluća dolazi do poremećaja u ravnoteži redoks sistema, koji se ogleda u prekomjernoj produkciji ROS, što doprinosi oštećenju pluća. Kod pacijenata sa akutnim oštećenjem pluća primjećena je povećana

peroksidacija lipida u plazmi i sniženi nivoi antioksidanata. Slobodni radikali nastaju usljed aktivnosti prooksidativnih enzima, lipidne peroksidacije, oštećenja mitohondrija, promjena u hemodinamici i aktivacije proteina kinaze C (89). Neutrofili su bitan izvor ROS-a, koristeći NADPH oksidazni kompleks koji može redukovati kiseonik u superoksidni anjon koji se oslobađa izvan ćelije i pretvara u H₂O₂ koji se dalje transformiše u hidroksilne radikale i HOCl, uz pomoć enzima mijeloperoksidaze (MPO) prisutnog u neutrofilnim granulama. Prekomjerna proizvodnja ROS može oštetiti ćelije na više načina. Npr. epitelne ćelije pluća ROS oštećuje kroz reakciju sa DNK, mijenjajući funkciju i strukturu ćelija. Takođe, ROS može izazvati oksidativni stres putem peroksidacije arahidonske kiseline prisutne u membrani ćelije i time doprinese upali indukcijom proizvodnje upalnih medijatora (76). Studija Johnsona i saradnika na pacovima pokazala je da intrapulmonalno ubrizgavanje enzima koji generišu ROS rezultira akutnim oštećenjem pluća (90), čime je omogućeno bolje razumijevanje toksičnosti ROS u plućima.

U patogenezi akutnog oštećenja pluća u endotoksemiji, važnu ulogu ima i apoptoza plućnih ćelija. Ključan faktor u ovom procesu je JNK signalni put koji igra kritičnu ulogu u indukciji apoptoze pod uticajem LPS-a. Aktivacija fosforilacije JNK podstiče fosforilaciju anti-apoptotskih proteina BCL-2/BCL-XL i reguliše proapoptotski protein BAK. Povećanje odnosa između BAK i BCL-2 rezultira promjenom potencijala mitohondrijalne membrane, što dovodi do oslobađanja citohroma c u citosol iz mitohondrija. Ovaj proces dalje aktivira kaspazu 9, a zatim kaspazu 3, što rezultira indukcijom apoptoze (88). Poremećaji u regulaciji apoptotskih puteva su pokazali doprinos oštećenju i epitela i endotela, koje su karakteristične promjene u akutnom oštećenju pluća (91). Primjećeno je povećanje stope preživljavanja životinja na modelu LPS-om indukovano akutnog oštećenja pluća nakon inhibicije apoptoze (92).

Lipoksin receptor (*Lipoxin receptor, ALX*), iz grupe receptora povezanih sa G proteinom (*G protein-coupled receptors, GPCRs*), posreduje u ćelijsko-specifičnim signalnim putevima, od kojih je cAMP jedan od dominantnih sekundarnih glasnika koja pretvaraju vanćelijske signale u unutarćelijske odgovore. Vezivanje liganda sa GPCR aktivira adenil ciklazu i utiče na nivoe unutarćelijskog cAMP-a, a istraživanje su pokazala da je stimulacija klirensa alveolarne tečnosti posredovana cAMP-om glavni mehanizam u smanjenju plućnog edema izazvanog LPS-om (93).

Pored normalne fiziološke uloge u plućima rezultati nekoliko istraživanja su ukazali na promjene u ekspresiji AQP, posebno AQP1 i 5 u različitim patološkim modelima pluća, naročito onim povezanim sa infekcijom i upalom (83). Ovi nalazi sugeriraju na ulogu ovih AQP u razvoju plućnih bolesti. U kontekstu upalnih procesa AQP1 i 5 podliježu modulaciji različitim signalnim putevima i medijatorima upale (94). Stoga koncept terapijskog ciljanja AQP postaje sveprisutna tema, posebno u kontekstu ublažavanja različitih oblika bolesti, uključujući i indukovano oštećenje pluća, kako je istaknuto u istraživanjima Gua i saradnika (95) i Lia i saradnika (96). Modulacija AQP pod uticajem upalnih medijatora i signalnih puteva upale uključuje transkripcionu represiju, kovalentne modifikacije i promjene u transportu vodenih kanala. Ovi mehanizmi regulišu upalne procese i bolesti koje imaju upalnu osnovu (65).

U često korištenom modelu oštećenja pluća izazvanog LPS-om, uloga određenog AQP zavisi od mjesta povrede, tj. da li se radi o epitelu ili endotelu (83). Dodatno, regulatorni mehanizmi AQP u LPS-om indukovanoj endotoksemiji čine se da su tkivo i AQP specifični. Npr. dokazano je da je AQP8 smanjen u hepatocitima nakon primjene LPS-a, putem TNF- α , dok ekspresija AQP9 ostaje nepromijenjena. Ukratko, izgleda da se ekspresija AQP mijenja u različitim patološkim mehanizmima sepse i oni mogu biti ključni proteini u inflamaciji (97).

AQP5 u alveolarnim ćelijama tipa I i AQP1 u endotelnim ćelijama predstavljaju ključne igrače u prenosu vode putem osmotske aktivnosti kroz ove barijere u plućima. Njihovo odsustvo rezultira smanjenom propustljivošću za vodu u eksperimentalnom modelu izolovanih perfundiranih mišijih pluća (98). Istraživanja na miševima bez AQP1, ključnog AQP u pleuralnim barijerama, ukazala su da ovaj AQP, poput uloge u plućima, doprinosi brzom osmotskoj ravnoteži duž površine pleure (99). Smanjenje ekspresije AQP5 nakon izloženosti LPS-u humanih bronhijalnih epitelnih ćelija povezano je sa signalnim putem p38/JNK (94). Smanjenje ekspresije AQP5 nakon tretmana LPS-om pokazale su i ćelije submukoznih žlijezda ljudskih disajnih puteva (100), a isto tako miševi bez AQP5 pokazali su više od dvostrukog smanjenja stimulisane sekrecije tečnosti (58). Ekspresija AQP1 u plućima pacova takođe se smanjuje nakon izlaganja LPS-u (97). TNF- α je pokazao smanjenje ekspresije AQP5 u humanim bronhijalnim epitelnim ćelijama (101). Studije su pokazale smanjenje ekspresije AQP5 u plućima pacova nakon indukcije sepse putem cecalne ligaturne punkcije, kao i smanjenje ekspresije AQP1 i AQP5 u modelu inflamatornog pankreatitisa (97).

1.9 Žučne kiseline

Žučne kiseline čine veliku grupu steroidnih molekula koje nastaju sintezom iz holesterola u jetri i koje se aktivno otpuštaju zajedno sa holesterolom, fosfolipidima i bilirubinom u žučnu kesu. Nakon sinteze u jetri primarne žučne kiseline, holna (*Cholic acid, CA*) i henodeoksiholna kiselina (*Chenodeoxycholic acid, CDCA*), se konjuguju sa glicinom ili taurinom čime se povećava njihova rastvorljivost, a zatim se izlučuju u žuč, koncentrišu u žučnoj kesi i kao odgovor na obrok izlučuju u crijeva, gdje djelujući kao deterdženti pomažu u emulzifikaciji masti i tako olakšavaju njihovo varenje i apsorpciju. U debelom crijevu podliježu procesu biotransformacije pod uticajem crijevne mikroflore, pri čemu nastaju sekundarne žučne kiseline, pretežno deoksiholna (*Deoxycholic acid, DCA*) i litholna kiselina (*Lithocholic acid, LCA*). Iz crijeva se minimalno gube fecesom jer se oko 95% žučnih kiselina reapsorbuje u distalnom ileumu, a zatim ponovo preuzimaju od strane jetre iz portalne krvi (enterohepatička cirkulacija). Kod ljudi, žučni bazen se sastoji od CA, CDCA i DCA, u približnom odnosu od 40:40:20 i ima visok stepen hidrofobnosti (102).

1.9.1 Struktura i fizičko-hemijske osobine žučnih kiselina

Hemijski posmatrano žučne kiseline su steroidne molekule sastavljene od dva ključna segmenta: rigidnog steroidnog jezgra i alifatičnog bočnog lanca. Steroidno jezgro se sastoji od 17 atoma ugljenika organizovanih u četiri povezana prstena (tri cikloheksanska/šestočlanaprstenovi A, B i C i jedan ciklopentanski/petočlani-prsten D). Bočni lanac je povezan sa prstenom D i sastoji se od pet ili osam ugljenika, završavajući karboksilnom grupom. Na osnovu toga, žučne kiseline se klasifikuju u dvije osnovne grupe: C27, koje sadrže C8 bočni lanac holesterola i C24 žučne kiseline, koje imaju skraćeni C5 bočni lanac i koje dominiraju kod sisara. Dodatni supstituenti se potom dodaju osnovnoj strukturi, na jezgru i/ ili na bočnom lancu. Sadrže hidroksilne (OH) grupe na pozicijama C3, C7 i često C12, kao i metil grupe na pozicijama C18 i C19 (103).

Steroidni skelet pokazuje konkavnu (α) i konveksnu (β) površinu. Strukturne varijacije ovih kiselina javljaju se u stereochemiji spoja A/B prstena u steroidnom jezgru, na mjestima i orijentaciji OH grupa, odnosno da li su α ili β u odnosu na prsten. OH grupe uglavnom su usmjerene prema α strani (konkavna ili donja strana) što čini tu stranu hidrofilnom, odnosno polarnom, dok β strana (konveksna ili gornja strana), na kojoj se nalaze metil grupe, ima

hidrofobne karakteristike (104). Zbog razdvojenosti hidrofilnih i hidrofobnih grupa na jezgu žučne kiseline su amfifilne molekule sa izraženim svojstvima deterdženta. Amfifilnost omogućava formiranje micelarnih agregata u vodenim rastvorima. Pri odgovarajućoj koncentraciji žučne kiseline se samostalno udružuju i formiraju micide, uključujući jednostavne (primarne) ili sekundarne (nastale agregacijom primarnih micela). Ova koncentracija naziva se kritična micelarna koncentracija i specifična je za svaku pojedinačnu žučnu kiselinu. Vrijednost kritične micelarne koncentracije raste sa povećanjem broja OH grupa, što rezultira smanjenjem hidrofobne dodirne površine između molekula. Balans između hidrofobnog i hidrofilnog dijela varira među različitim tipovima žučnih kiselina, što objašnjava razlike u njihovim interakcijama s drugim supstancama (105).

1.9.2 Metabolizam žučnih kiselina

Proces metabolizma žučnih kiselina sastoji se iz tri ključne faze. Prva faza obuhvata sintezu u jetri, druga faza uključuje konjugaciju u jetri, dok se u trećoj fazi vrši transport ovih kiselina u jetri, bubrezima i crijevima. Svaki korak u metaboličkom putu žučnih kiselina strogo je regulisan kompleksnim signalnim putevima između jetre i crijeva, u kojima same žučne kiseline igraju ključnu ulogu kroz djelovanje na receptore za žučne kiseline, prisutne kako u hepatocitima, tako i u enterocitima (106).

1.9.2.1 Sinteza žučnih kiselina

Sinteza žučnih kiselina predstavlja kompleksan put koji uključuje tri hidrosilacione reakcije uz posredovanje enzima citohrom P450 (*CYP*) monooksigenaza-holesterol 7 α -hidrosilaza (*CYP7A1*), mikrozomalna sterol 12 α -hidrosilaza (*CYP8B1*), mitohondrijalna sterol 27-hidrosilaza (*CYP27A1*) i mikrozomalna oxisterol 7 α -hidrosilaza (*CYP7B*), epimerizaciju, izomerizaciju i reakcije oksidativnog cijepanja (107). Ovaj proces se odvija klasičnim ili alternativnim putem.

Klasični ili neutralni put je najvažniji biosintetski mehanizam odgovoran za proizvodnju oko 90% ukupne količine žučnih kiselina, proizvedeći CA i CDCA u približno jednakim količinama. Ova konverzija holesterola u žučne kiseline je multienzimski proces i uključuje 17 različitih enzima koji se nalaze u citosolu, endoplazmatskom retikulumu, mitohondrijama i peroksizomima, a jetra je jedini organ uključen u sintezu primarnih žučnih

kiselina (108). Ovaj put inicira holesterol 7α -hidroksilaza, koja vrši hidroksilaciju holesterola u 7α -hidroksi-holesterol u endoplazmatskom retikulumu, i to je enzim koji ograničava brzinu sinteze žučnih kiselina. Mikrosomalna sterol 12α -hidroksilaza je potrebna za sintezu CA. Naime, ako se na položaju C12 odvije hidroksilacija pomoću CYP8B1 kao finalni proizvod nastaje CA, ali ukoliko ne dođe do hidroksilacije na ovom položaju nastaje CDCA, što ukazuje na to da aktivnost CYP8B1 determiniše ukupnu hidrofobnost bazena žučnih kiselina (budući da je CA hidrofilnija od CDCA). Zatim slijedi modifikacija steroidnog prstena. 3β -hidroksi- Δ^5 -C27-steroid oksidoreduktaza konvertuje 7α -hidroksiholesterol u 3-okso- Δ^4 -oblik, nakon čega Δ^4 -3-oksosteroid- 5β -reduktaza redukuje Δ^4 -dvostruku vezu dovodeći do stvaranja 5β -vodonične konfiguracije. Krajnji korak u modifikaciji strukture prstena je redukcija 3-okso grupe u 3α -hidroksilnu grupu pomoću enzima 3α -hidroksisteroid dehidrogenaze. Nakon modifikacije strukture prstena dolazi do steroidne oksidacije i formira se karboksilna grupa na poziciji C27 pomoću mitohondrijalne sterol 27-hidroksilaze, formirajući C27 žučne intermedijere: $3\alpha,7\alpha$ -dihidroksi- 5β -holestanoična kiselina (*Dihydroxycholestanoic acid, DHCA*), koja je prekursor za CDCA i $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi- 5β -holestanoična kiselina (*Trihydroxycholestanoic acid, THCA*), koja je prekursor za CA (109, 110).

Alternativni put sinteze žučnih kiselina počinje u mitohondrijama, gdje CYP27A1, ključni enzim u ovom putu zajedno sa CYP7B, omogućava skraćivanje bočnog lanca u C24 žučne kiseline i 7α -hidroksilaciju u hepatocitima, pri čemu se najvećim dijelom stvara CDCA. Nakon početnog koraka u mitohondrijama, proces se nastavlja u endoplazmatskom retikulumu i citoplazmi. Specifični transportni mehanizmi uključeni u svaki korak ovog biosintetskog puta još nisu u potpunosti razjašnjeni. Ovaj put doprinosi manje od 10% ukupnog formiranja žučnih kiselina kod ljudi (110).

1.9.2.2 Konjugacija žučnih kiselina

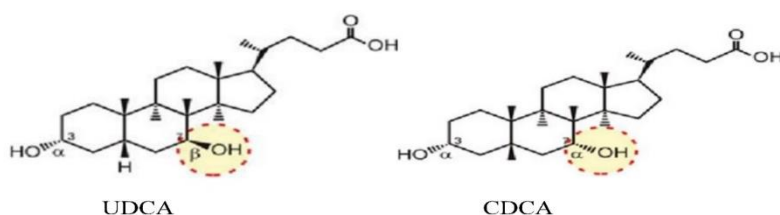
U sljedećem koraku metabolizma žučnih kiselina, C27 žučni intermedijeri (DHCA i THCA) se aktiviraju u odgovarajući ester koenzima A (CoA) pomoću CoA sintaze žučnih kiselina (*Bile acid CoA synthetase, BACS*), te se aktivirani CoAC27 žučni estri transportuju u peroksizome, koristeći peroksizomalni membranski protein 70 (*70-kDa Peroxisomal membrane protein, PMP 70*), gdje se bočni lanac skraćuje peroksizomalnom β -oksidacijom. Nastali CA-CoA i CDCA-CoA se zatim konjuguju na C24 pomoću enzima za prenos amino kiselina žučnih kiselina (*Bile acid amino transferase, BAAT*), da bi proizveli C24 glicin ili taurin konjugovane

žučne kiseline. Kod ljudi, odnos između glicinskih i taurinskih konjugata je oko 3:1. U malim količinama žučne kiseline mogu biti konjugovane i sa sulfatom na 3-hidroksilnoj grupi putem enzima sulfotransferaze (*Sulfotransferase 2A1*, *SULT2A1*) (111). Sulfatacija posredstvom SULT2A1 predstavlja glavni put detoksikacije hidrofobnih žučnih kiselina kod ljudi (112).

Proizvodi nastali nakon 7 α -hidroksilacije, modifikacije sterolnog prstena, skraćivanja bočnog lanca i konjugacije nazivaju se primarnim konjugovanim žučnim kiselinama: glicin/taurin konjugati CA i CDCA u klasičnom putu, dok se u alternativnom putu formira samo CDCA. CDCA se može dodatno metabolisati pomoću enzima CYP3A4, što dovodi do stvaranja hioholne kiseline (*Hyocholic acid*, *HCA*) (106).

1.9.2.3 Biotransformacija žučnih kiselina u crijevima

Crijevna mikroflora ima veliki uticaj na metabolizam žučnih kiselina, prvenstveno u smislu smanjenja njihove antibakterijske aktivnosti. U distalnom dijelu crijeva, pod uticajem bakterijskih hidrolaza, neke konjugovane žučne kiseline se dekonjuguju, a pod dejstvom bakterijskih 7 α -dehidroksilaza primarne žučne kiseline, CA i CDCA, se konvertuju u sekundarne žučne kiseline DCA i LCA, koje su teško rastvorljive i toksične, što može dovesti do štetnih efekata na jetru ili crijeva. DCA se ponovo apsorbuje u kolonu, dok se većina LCA izlučuje putem stolice. U procesima biotransformacije u crijevima CDCA se pod uticajem sojeva klostridija epimerizuje u ursodeoksiholnu kiselinu (*Ursodeoxycholic acid*, *UDCA*), koja je visoko rastvorljiva i netoksična i za domaćina i za intestinalnu mikrofloru (102).



Slika 4. Hemijska struktura UDCA (3 α ,7 β -dihidroksi-5 β -holanoična kiselina) i njenog strukturnog izomera- CDCA (3 α ,7 α -dihidroksi-5 β -holanoična kiselina)

1.9.2.4 Enterohepatična cirkulacija

Konjugovane žučne kiseline se izlučuju u žuč pomoću specifičnih transportera smještenih u kanalikularnoj membrani hepatocita, a zatim se skladište u žučnoj kesi. Nakon obroka, hormon holecistokinin podstiče kontrakciju žučne kese, čime se žuč izbacuje u duodenum preko žučnih kanala. Ovako izbačene žučne kiseline efikasno se reapsorbuju u ileumu i transportuju nazad u jetru putem portalne cirkulacije. Ova cirkulacija žučnih kiselina između jetre i crijeva poznata je kao enterohepatična cirkulacija. Kod ljudi, ova cirkulacija je visoko efikasna, jer se oko 95% žučnih kiselina reapsorbuje u ileumu, dok se samo oko 5%, (0.2-0.6 g/dan) izlučuje fecesom i vrlo malo urinom (oko 0.5 mg/dan), što se nadoknađuje de novo sintezom iz holesterola u jetri. Recikliranje se dešava 4 do 12 puta dnevno, a veličina bazena žučnih kiselina definiše se kao ukupna količina žučnih kiselina koja cirkuliše u enterohepatičkoj cirkulaciji (107).

Četiri vrste transporta su uključene u reapsorpciju žučnih kiselina: aktivni transport, pasivna jonska difuzija, pasivna nejonska difuzija i pasivna micelarna difuzija (113). Enterohepatična cirkulacija žučnih kiselina uključuje nekoliko njihovih transportera u hepatocitima, koji preuzimaju žučne kiseline kroz bazolateralnu membranu, koja je u direktnom kontaktu sa krvi i izlučuju ih u žuč preko kanalikularne membrane hepatocita. Koncentracija žučnih kiselina u žuči je znatno veća nego u hepatocitima, pa je kanalni transport ovih kiselina aktivan proces koji zahtjeva energiju, obezbjeđenu hidrolizom adenozin trifosfata (*Adenosine triphosphate*, *ATP*) ili kotransportom sa drugim molekulima. Ključni transporter za izlučivanje žučnih kiselina u žuč je pumpa za izvoz žučne soli (*Bile salt export pump*, *BSEP*). U žuči, žučne kiseline, fosfolipidi i holesterol formiraju miješane micelle kako bi poboljšali rastvorljivost holesterola i smanjili toksičnost žučnih kiselina u žučnim kanalima. Pri prolasku kroz crijevni trakt, male količine dekonjugovanih žučnih kiselina se pasivno reapsorbuju u gornjem dijelu crijeva, dok se oko 95%, reapsorbuje u terminalnom ileumu putem apikalnog natrijum-zavisnog transportera žučnih kiselina (*Apical sodium-dependent bile acid transporter*, *ASBT*) u apikalnoj membrani enterocita. Nakon apsorpcije žučne kiseline prolaze kroz enterocit pomoću intestinalnog vezujućeg proteina za žučne kiseline (*Intestinal bile acid binding protein*, *IBABP*) i transportuju se do bazolateralne membrane enterocita, gde se izlučuju u portalnu krv putem heterodimernih transportera organskih rastvora α i β (*Organic solute transporter α and β* , *OST α i OST β*) (114). Vezane za albumine, žučne kiseline se

transportuju do hepatocita, koji ih preuzimaju pomoću Na^+ -zavisnog kotransportera žučnih kiselina (*Na^+ -taurocholate cotransporting polypeptid, NTCP*), dok se nekonjugovane preuzimaju pomoću Na^+ -nezavisnih multispecifičnih transportera organskih anjona (*Organic anion transporting polypeptide, OATP*) i SLC21A transportnog proteina, koji su lokalizovani u membrani sinusoidalnog pola hepatocita (107).

1.9.3 Uloga žučnih kiselina

Preuzimanje žučnih kiselina iz portalne cirkulacije nije potpuno. Vrlo mala frakcija tih kiselina (2-10 μM) prelazi u sistemska cirkulaciju i dovoljna je za aktiviranje različitih nuklearnih i membranskih receptora za žučne kiseline u različitim tkivima, omogućavajući tako sistemski uticaj žučnih kiselina na tkiva izvan enterohepatičkog sistema. Uopšteno, ključne fiziološke uloge žučnih kiselina su regulacija homeostaze holesterola, emulzifikacija lipida u prehrani i apsorpcija liposolubilnih vitamina, antimikrobna aktivnost i regulatorne funkcije (103).

Žučne kiseline imaju dugotrajnu reputaciju u olakšavanju procesa varenja i apsorpcije lipida i liposolubilnih vitamina u tankom crijevu, istovremeno igrajući ključnu ulogu u regulaciji sopstvenog metabolizma i homeostaze holesterola. Ipak, u protekle dvije decenije postalo je očigledno da one prevazilaze ulogu jednostavnih digestivnih deterdženata i osnovnog puta za katabolizam holesterola. Današnje shvatanje žučnih kiselina naglašava njihov status hormona, aktivnih u regulaciji raznovrsnih metaboličkih procesa. Aktiviranjem različitih signalnih puteva, a preko receptora za žučne kiseline, one održavaju homeostazu triglicerida, holesterola, glukoze i energetskog metabolizma. Ovo kompleksno djelovanje čini ih bitnim regulatorima metaboličkih procesa u organizmu i ukazuje na sveobuhvatnu moć žučnih kiselina kao metaboličkih i imunoloških signalnih molekula, dodatno proširujući razumijevanje njihove uloge izvan tradicionalnog koncepta probave i apsorpcije (115).

1.9.3.1 Receptori za žučne kiseline

Žučne kiseline imaju sposobnost aktiviranja različitih receptora ne samo u ćelijama jetre, već i u drugim tkivima izvan jetre. One su endogeni ligandi za nuklearne receptore: farnezoid X receptor (*Farnesoid X receptor, FXR*), pregnan X receptor (*Pregnane X receptor, PXR*), receptor vitamina D (*Vitamin D receptor, VDR*) i indirektnim putem za konstitutivni

androstanski receptor (*Constitutive androstan receptor, CAR*); te ligandi za membranske receptore, G-protein-spregnuti receptor žučnih kiselina 1 (*G protein-coupled bile acid receptor 1, GPBAR1*). Interakcijom sa ovim receptorima žučne kiseline aktivno utiču na regulaciju mnogih bioloških reakcija (116).

Nuklearni receptori aktivirani u prisustvu žučnih kiselina imaju ključnu ulogu u regulaciji vlastitog metabolizma. Takođe, njihova sinhronizovana akcija koordiniše metabolizam lipida, glukoze, energije i smanjuje upalu. FXR i PXR su visoko ekspimirani u jetri i crijevima, dok je VDR široko prisutan u većini tkiva. CDCA se ističe kao najefikasniji ligand za FXR, dok su studije o hidrofilnoj UDCA pokazale varijabilne efekte prema FXR ili slabe modulacije funkcije ovog nuklearnog receptora (117).

Djelujući preko jetrenih i crijevnih FXR većina žučnih kiselina vrši regulaciju negativne povratne sprege na sopstvenu sintezu i enterohepatičnu cirkulaciju, uglavnom kroz inhibiciju aktivnosti i ekspresije ključnog enzima CYP7A1, ali reguliše transkripciju i niza drugih ciljanih gena uključenih u ovaj proces, u jetri i/ili crijevima: *BSEP, NTCP, OST α i β , I-BABP, FGF 15/19* i *SHP* (107) Osim ove uloge, FXR utiče na regulaciju metabolizma lipida i glukoze, regulaciju biosinteze triacilglicerola i proizvodnju lipoproteina veoma niske gustine u jetri, snižavajući nivo triacilglicerola u plazmi. Signalizacija putem FXR/RXR (*Retinoid X receptor*) igra ključnu ulogu u regulaciji metabolizma glukoze, podstičući toleranciju na glukozu i povećavajući osetljivost na insulin (118).

Žučne kiseline su povezane i sa regulacijom i modulacijom aktivnosti određenih receptora vezanih za G-proteine, a među njima najdetaljnije proučavan u kontekstu žučnih kiselina je Takeda G protein-spregnuti receptor 5, (*Takeda G protein-coupled receptor 5, TGR5*). Ljudski TGR5 aktiviraju različite kiseline, pri čemu se LCA izdvaja kao najjači prirodni agonist. Ostale kiseline koje aktiviraju TGR5 su konjugovani i nekonjugovani oblici DCA, CDCA, CA i UDCA (119). TGR5 je prisutan u mnogim organima i ćelijama sa različitim nivoima ekspresije, uključujući ćelije jetre, alveolarne makrofage, epitel žučne kese, crijeva, slezenu, monocite, mršavo masno tkivo, skeletne mišiće te određene dijelove centralnog nervnog sistema. Biološka svojstva TGR5 su uglavnom zapažena na životinjskim modelima i snažno ukazuju na to da je ovaj receptor povezan sa povoljnim svojstvima žučnih kiselina (120). TGR5 je metabolički regulator koji takođe održava homeostazu žučnih kiselina, energije i glukoze, što nagovještavaju fiziološke promjene primjećene kod miševa bez TGR5. U

enteroendokrinim ćelijama aktivacija TGR5 može podstaći stvaranje cAMP-a i aktivirati put proteina za razmjenu direktno aktiviranog cAMP-om (*Exchange protein directly activated by cAMP pathway, Epac*), što rezultira povećanim oslobađanjem glukagonu sličanog peptida-1 (*Glucagon-like peptide-1, GLP-1*) i tako doprinosi efektima TGR5 na održavanje ravnoteže glukoze u organizmu (119).

1.9.3.2 Receptori za žučne kiseline i kinazni putevi

Žučne kiseline putem svojih receptora regulišu različite kinazne signalne puteve. Posebno se ističe JNK put, koji je jedan od glavnih signalnih kaseti MAPK puta, i koji čestvuje u regulaciji različitih ćelijskih procesa, uključujući apoptozu i proliferaciju (121).

Pored JNK puta, žučne kiseline aktiviraju i p38MAPK, koji kontroliše apoptozu i oslobađanje citokina iz makrofaga i neutrofila. Kao i JNK put, p38 signalizacija se snažno aktivira inflamatornim citokinima, što doprinosi upalnim procesima, apoptozi, diferencijaciji ćelija i regulaciji ćelijskog ciklusa (122).

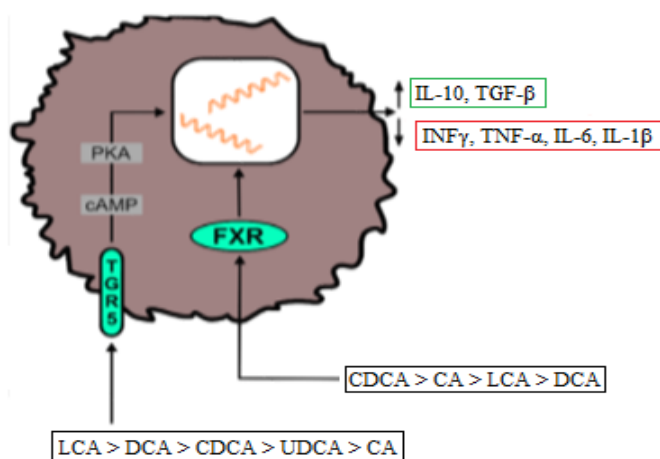
ERK signalni put je takođe regulisan putem receptora za žučne kiseline i ima važnu ulogu u preživljavanju, diferencijaciji i proliferaciji ćelija (123).

Takođe je pokazana veza između receptora za žučne kiseline i fosfoinozimid-3-kinaze/protein kinaze B puta (*Protein kinase B ili Phosphoinositide-3-kinase-Protein kinase B, AKT or PI3/Akt*) koji je važan za apoptozu, diferencijaciju, proliferaciju i metabolizam ćelija. Na plazma membrani, fosforilacija AKT blokira aktivnost proapoptotskih članova porodice BCL-2, što doprinosi preživljavanju ćelije (119). Iako još uvijek nisu sasvim razjašnjeni tačni mehanizmi uključeni u ove procese, istraživanje je otkrilo da je fosforilacija ERK i AKT indukovana putem ROS i TGR5 zavisnih puteva (124). Aktiviranje ovih kaskada fosforilacije putem žučnih kiselina nije samo povezano sa smanjenjem ekspresije CYP7A1 gena, već takođe ima ulogu u upravljanju procesima apoptoze i pruža citoprotektivne efekte (125).

Signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 signalni put (*Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3*) djeluje kao pojačivač u promotorskom regionu gena akutne faze i kao faktor transkripcije koji reguliše razvoj, diferencijaciju, imunitet, invaziju i metabolizam ćelija. Brojna istraživanja ukazuju na aktivaciju STAT3 u različitim tumorskim ćelijskim linijama. Guo i saradnici su identifikovali TGR5 kao supresor proliferacije i migracije

ćelija raka želuca, inhibišući fosforilaciju STAT3 i smanjujući njegovu transkripcijsku aktivnost indukovanu LPS-om ili IL-6 (119).

Novija istraživanja ističu angažman receptora za žučne kiseline u procesima upale (126) i njihovu ulogu u regulaciji signalnog puta NF-κB (119). Jedno od prvih istraživanja o ulozi TGR5 odnosilo se na njegovu ulogu u imunološkim ćelijama i povezalo je TGR5 sa imunomodulatornim osobinama žučnih kiselina. U skladu sa izvještajem da cAMP inhibiše lučenje citokina indukovano LPS-om, utvrđeno je da žučne kiseline aktivacijom TGR5 povećavaju produkciju cAMP-a (127) i inhibišu produkciju proinflamatornih citokina kao odgovor na LPS-om aktiviran NF-κB (128). Ćelije sa previše eksprimiranim TGR5 pokazuju povećanu produkciju cAMP-a i smanjenje LPS-om indukovane ekspresije TNF-α. Ovi efekti nisu zapaženi kod ćelija sa niskom ekspresijom TGR5, što dokazuje da se ovi efekti žučnih kiselina ostvaruju aktivacijom TGR5 (120). TGR5 potiskuje inflamatorni odgovor putem antagoniziranja NF-κB, potiskivanjem fosforilacije njegovog inhibitora - IκBα (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha; NFKBIA*), translokacije NF-κB i njegove transkripcione aktivnosti (119). Kada se vežu za FXR ili TGR5, primarne i sekundarne žučne kiseline preusmjeravaju citokinski profil mijeloidnih ćelija ka antiinflamatornom fenotipu. Njihova agonistička djelovanja zavise od afiniteta pojedinačnih žučnih kiselina prema određenom receptoru (129).



Slika 5. Efekti interakcije žučnih kiselina sa njihovim receptorima na funkciju imunih ćelija

Balansiranje između imune aktivacije i supresije, kao i razumijevanje osnovnih molekularnih mehanizama u patogenezi endotoksemije i akutnog oštećenja jetre i pluća, izazvanih LPS-om, može pomoći u otkrivanju novih terapijskih strategija za ublažavanje sepse i oštećenja organa u sepsi. Potencijalno obećavajući terapijski pristup mogao bi se zasnivati na ulozi žučnih kiselina, obzirom da je sve više dokaza koji sugeriraju da žučne kiseline funkcioniraju kao signalne molekule koje reguliraju imunitet putem aktivacije specifičnih receptora koji su uključeni u imunološki sistem domaćina i u velikoj mjeri su prisutni u ćelijama urođenog imuniteta.

2. RADNE HIPOTEZE

Predtretman sa UDCA i CDCA može uticati na vrijednosti pokazatelja inflamacije, endotelne disfunkcije, oksidativnog stresa i apoptoze u endotoksemiji i akutnom oštećenju pluća izazvanim LPS-om na način da:

1. Smanjuju nivoe proinflamatornih citokina u plazmi.
2. Smanjuju markere oštećenja jetre.
3. Popravljaju lipidni profil.
4. Ublažavaju endotelnu disfunkciju.
5. Smanjuju koncentraciju prooksidanasa i povećavaju nivo antioksidanasa u plazmi i bronhoalveolarnoj tečnosti.
6. Smanjuju ekspresiju transkripcionih faktora kod akutnog oštećenja jetre i pluća.
7. Ublažavaju nastanak apoptoze ćelija kod akutnog oštećenja pluća.
8. Regulišu ekspresiju akvaporina kod akutnog oštećenja pluća.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

A. Ispitati efekte LPS-a kao induktora endotoksemije i akutnog oštećenja pluća na:

1. Nivoje proinflamatornih citokina TNF- α , GM-CSF, IL-2, IL-6, IL-1 β i IFN- γ u plazmi;
2. Biohemijske parametre i markere oštećenja jetre u serumu: glukoza, CK, AST, ALT, LDH, TnI, Hcy;
3. Koncentraciju TC, LDL, HDL i TG u serumu;
4. Koncentraciju markera endotelne disfunkcije ICAM-1 u serumu;
5. Prooksidativne markere O₂⁻ i H₂O₂ u plazmi;
6. Markere antioksidativne zaštite SOD, CAT i GSH u lizatu eritrocita;
7. Tjelesnu masu, masu jetre i odnos mase jetre i tjelesne mase;
8. Patohistološke promjene u jetri;
9. Ekspresiju transkripcionog faktora NF- κ B u jetri;
10. Prooksidativne markere TBARS i NO₂ u bronhoalveolarnoj tečnosti;
11. Markere antioksidativne zaštite SOD, CAT i GSH u bronhoalveolarnoj tečnosti;
12. Patohistološke promjene u plućima;
13. Ekspresiju transkripcionog faktora NF- κ B u plućima;
14. Ekspresiju antiapoptotskog markera BCL-2 i proapoptotskih markera kaspaza 3 i BAX u plućima;
15. Ekspresiju akvaporina 1 i akvaporina 5 u plućima.

B. Ispitati efekte primjene UDCA na navedene parametre u endotoksemiji i akutnom oštećenju pluća izazvanim primjenom LPS-a.

C. Ispitati efekte primjene CDCA na navedene parametre u endotoksemiji i akutnom oštećenju pluća izazvanim primjenom LPS-a.

4. MATERIJAL I METODE

4.1 Eksperimentalne životinje

Mušjaci *Wistar albino* pacova (n=36) držani su u pojedinačnim kavezima (6 po kavezu) u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (sobna temperatura $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12-h ciklus svjetlost/mrak, vlažnost $55 \pm 5\%$), i sa slobodnim pristupom za hranu i vodu. Pacovima je dozvoljeno da se prilagode okruženju nedjelju dana prije eksperimenata. Eksperimentalne životinje, protokole i procedure odobrila je Etička komisija za zaštitu dobrobiti eksperimentalnih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci (broj 18/1.190-1/22 od 09.03.2022. godine). Pri eksperimentima su poštovane odredbe propisanih akata (*EU Directive for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) i principa etičnosti.

4.2 Eksperimentalne grupe

Model endotoksemije pacova je zasnovan na aplikaciji lipopolisaharida *Escherichiae Coli* intraperitonealno u dozi od 5,5 mg/kg TM. Životinje će biti tretirane nesmrtonosnom pojedinačnom dozom LPS-a (0,25 LD50/kg), modelom koji je pokazao najjače inflamatorne efekte na različitim životinjskim modelima za sepsu (130). *Wistar* pacovi su podijeljeni u šest eksperimentalnih grupa, od kojih je svaka grupa imala po šest jedinki.

Kontrolna grupa: Propilen glikol, kao vehikulum, 0,5 mL/kg TM *per os* gastričnom sondom tokom uzastopnih 10 dana. Desetog dana aplikovan je fiziološki rastvor 1 mL/kg TM intraperitonealno.

LPS grupa: Propilen glikol 0,5 mL/kg TM *per os* gastričnom sondom tokom uzastopnih 10 dana. Desetog dana aplikovan je endotoksin 5,5 mg/kg TM intraperitonealno.

UDCA grupa: UDCA 25 mg/kg TM *per os* gastričnom sondom tokom uzastopnih 10 dana. Desetog dana aplikovan je fiziološki rastvor 1 mL/kg TM intraperitonealno.

UDCA+LPS grupa: UDCA 25 mg/kg TM *per os* gastričnom sondom tokom uzastopnih 10 dana. Desetog dana aplikovan je endotoksin 5,5 mg/kg TM intraperitonealno.

CDCA grupa: CDCA 25 mg/kg TM *per os* gastričnom sondom tokom uzastopnih 10 dana. Desetog dana aplikovan je fiziološki rastvor 1 mL/kg TM intraperitonealno.

CDCA+LPS grupa: CDCA 25 mg/kg TM *per os* gastričnom sondom tokom uzastopnih 10 dana. Desetog dana aplikovan je endotoksin 5,5 mg/kg TM intraperitonealno.

4.3 Uzimanje uzoraka krvi i njihova analiza

U okviru istraživanja isti eksperiment je sproveden dva puta. Po završetku eksperimenta (10 dana) životinje su žrtvovane - 2h nakon primjene LPS-a na kraju prvog, a 48h nakon primjene LPS-a na kraju drugi put sprovedenog eksperimenta.

Pacovi su anestetizirani kombinacijom ketamina (90 mg/kg) i ksilazina (10 mg/kg), učinjena im je torakotomija, te su iz aorte uzeti uzorci krvi u vakutajner epruvete za serum i epruvete za plazmu sa antikoagulansom (natrijum citrat). Uzorci plazme su centrifugirani 10 min na 3.000 obrtaja, a uzorci seruma su ostavljeni na sobnoj temperaturi 20 min da se formira ugrušak, a zatim centrifugirani 5 min na 3000 obrtaja.

Lizat eritrocita je dobijen nakon odvajanja plazme. Izolovani eritrociti su isprani tri puta u tri zapremine hladnog fiziološkog rastvora. Svi uzorci su zamrznuti na -80°C do mjerenja.

U uzorcima seruma su određivani biohemijski parametri: glukoza, kreatin kinaza (*Creatine kinase, CK*), aspartat aminotransferaza (*Aspartate transaminase, AST*), alanin aminotransferaza (*Alanine transaminase, ALT*), laktat dehidrogenaza (*Lactate dehydrogenase, LDH*), troponin I (*Troponine I, TnI*), homocistein (*Homocysteine, Hcy*), ukupni holesterol (*Total cholesterol, TC*), holesterol velike gustine (*High density lipoprotein, HDL*), holesterol male gustine (*Low density lipoprotein, LDL*), trigliceridi (*Triglycerides, TG*) i rastvorljivi ICAM-1.

Uzorci plazme su se koristili za određivanje markera oksidativnog stresa - H_2O_2 , O_2^- i nivoa $\text{TNF-}\alpha$, GM-CSF, IL-2, IFN- γ , IL-6 i IL-1 β .

U uzorcima lizata eritrocita su mjereni markeri antioksidativne zaštite: SOD, CAT, GSH.

Vrijednosti glukoze, Hcy, TnI, TG, TC, HDL, LDL, LDH, ALT, AST i CK mjerene su metodom hemiluminiscentnog imunoeseja (*Chemiluminescence immunoassay-CLIA*), a Hcy i TnI metodom hemiluminiscentnog imunoeseja mikropartilama (*Chemiluminescent microparticle immunoassay-CMIA*) na analizatoru Alinity c (*Abbot Laboratories, IL, USA*).

Nivoi TNF- α , GM-CSF, IL-2, IFN- γ , IL-6 i IL-1 β u plazmi su određeni korištenjem AimPlex Custom Rat 10 Plex Panel mikroperli baziranih na fluorescenciji (*AimPlex Biosciences, Pomona, CA, SAD*) i protočne citometrije (*BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD*). Koncentracija rastvorljivog međućelijskog adhezionog molekula 1 (ICAM-1) u serumu je određena ELISA metodom korištenjem pacovskog ICAM1 (*FineTest, Wuhan, China*). Obe analize su izvedene u skladu sa preporučenim protokolom proizvođača. Koncentracije istraživanih biomolekula su određene u skladu sa poznatim koncentracijama analita u standardima.

Antioksidansi (SOD, CAT i GSH) u lizatu eritrocita i prooksidansi (H_2O_2 i O_2^-) u plazmi su mjereni na aparatu *Shimadzu UV 1800, Japan*, metodom spektrofotometrije.

Aktivnost CAT i SOD i nivo GSH su analizirani Beutler-ovim metodama (131). Za određivanje aktivnosti CAT korišten je vodeni rastvor H_2O_2 , katalaza pufer i razblaženi uzorak lizata eritrocita. Aktivnost SOD je mjerena nakon miješanja lizata eritrocita sa karbonatnim puferom, a zatim i epinefrinom. Mjerenje je vršeno na talasnoj dužini 470 nm.

Nivo O_2^- u plazmi je određen u reakciji O_2^- sa nitro-tetrazolijevim plavim (*Nitro Blue Tetrazolium-NTB*) i TRIS puferom, na talasnoj dužini 530 nm (132).

Koncentracija H_2O_2 u plazmi je određena Pick i Keisari metodom, baziranoj na oksidaciji H_2O_2 sa fenol crvenim, na talasnoj dužini od 610 nm (133)

4.4 Uzimanje bronhoalveolarne tečnosti (*Bronchoalveolar lavage fluid, BALF*)

Nakon uzorkovanja krvi, izložen je dušnik u koji je postavljena kanila kroz kateter i BALF je prikupljen ubacivanjem i aspiracijom 0,7 mL hladnog fosfatnog puferisanog rastvora (*Phosphate-buffered saline, PBS*) tri puta. Uzorci su centrifugirani na 5000 obrtaja, 4°C, tokom 10 minuta, nakon čega je odvojen supernatant za analizu parametara oksidativnog stresa. Svi uzorci su čuvani na -80°C do mjerenja.

U uzorcima BALF-a su određivani pro- i antioksidativni markeri.

Prooksidativnih markeri: reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (*Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS*), kao marker lipidne peroksidacije, i NO, mjeren u formi nitrita (NO₂⁻), su mjereni spektrofotometrijski na aparatu *Shimadzu UV 1800, Japan*.

TBARS je mjereno u reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) i malondialdehida. Nakon miješanja uzorka plazme sa 1% tiobarbiturnom kiselinom i 0,05 NaOH, mjerenje je izvršeno na 530 nm talasne dužine (132).

Azot monoksid je nestabilan i brzo daje produkte kao što su nitriti, koji se mogu mjeriti Griess-ovom metodom u kojoj se koristi 30% sulfosalicilna kiselina i Griess-ov reagens. Mjerenje je vršeno na 550 nm (134).

Aktivnost SOD i CAT u BALF-u su određene Madesh i Balasubramanian (135) i Aebi (136) metodama, a nivo GSH Ellman-ovom metodom (137).

4.5 Uzimanje uzoraka tkiva, patohistološka i imunohistohemijska analiza

Nakon žrtvovanja jetra i pluća su ekstrahovani. Nakon fiksacije u 10% neutralnom puferovanom formalinu uzorci tkiva su obrađeni u automatskom tkivnom procesoru (*Leica TP1020, Leica Biosystems USA*). Po standardnom protokolu tkiva su dehidrirana u rastućim koncentracijama etil alkohola (70%, 96%, 100%), zatim prosvjetljena u ksilenu (tri izmjene), prožeta tečnim parafinom i ukalupljena u parafinske blokove. Za histološku i imunohistohemijsku analizu parafinski blokovi su na rotacionom mikrotomu (*Rotary 3003 pfm, pfmmedical, Germany*) sječeni na presjeke debljine 4-5 µm. Dobijeni presjeci su postavljeni na odgovarajuća predmetena stakalca i sušeni na 60°C.

4.5.1 Patohistološka analiza

U prvom koraku histološke procedure tkivni presjeci su deparafinsani u ksilolu (dvije izmjene po 5 minuta), zatim rehidrirani u opadajućim koncentracijama etil alkohola (100%, 96% i 70%, po 5 minuta za svaku izmjenu) i isprani destilovanom vodom. Nakon toga su bojani standardnom metodom hematoksilin-eozin (HE) i analizirani svjetlosnim mikroskopom *Leica DM2500 (Leica, Microsystems, Schweiz)*.

Oštećenje jetre i pluća je semikvantitativno procijenjeno. Mikrofotografije su snimane na povećanju 200x. Obzirom na težinu i procenat oštećenja tkiva izračunat je prosječni patohistološki skor po grupi.

Za procjenu histoloških promjena koje ukazuju na oštećenje jetre izvršeno je skorovanje od 0 do 4:

Skor 0-označava normalno tkivo jetre bez patoloških promjena;

Skor 1- označava manje od 24% oštećenja tkiva jetre;

Skor 2-označava 26-50% oštećenja tkiva jetre;

Skor 3-označava oštećenje tkiva jetre u rasponu od 51-75%;

Skor 4-označava oštećenje tkiva jetre veće od 75%.

Kriterijumi za procjenu oštećenja jetre, posmatrani od strane dva nezavisna patologa na slijep način, uključivali su: ispitivanje arhitekture lobula jetre, procjenu vaskularne kongestije, hemoragije i ekstravazacije, utvrđivanje nekroze hepatocita i prisustvo inflamatornih ćelija.

Za procjenu histoloških promjena koje ukazuju na oštećenje pluća izvršeno je skorovanje od 1 do 4:

Skor 1- nema patoloških promjena u plućima;

Skor 2-blago oštećenje plućnog tkiva, sa multifokalnom degeneracijom i blagom infiltracijom zapaljenskih ćelija ili fokalnim oštećenjem ćelija pluća;

Skor 3- umjereno oštećenje plućnog tkiva, sa teškom degeneracijom tkiva i/ili difuznom upalom;

Skor 4- teška oštećenja plućnog tkiva, nekroza sa difuznom inflamacijom.

4.5.2 Imunohistohemijska analiza

Za imunohistohemijsku analizu tanki presjeci tkiva su postavljani na pozitivno naelektrisana Super Frost predmetna stakla (*Menzel-glaser*). Nakon deparafinizacije (u ksilenu), rehidratacije (u opadajućim koncentracijama etil-alkohola), ispiranja u destilovanoj vodi, imunohistohemijsko bojenje je nastavljeno provođenjem metode toplotnog oporavka antigena i blokiranjem aktivnosti endogene peroksidaze. Oporavak antigena je obavljen pod kontrolisanim uslovima u PT modulu (*Pretreatment Module™, Lab Vision Corporation, USA*)

zagrijavanjem tkiva na temperaturi 97°C u citratnom puferu pH 6.0, 20 minuta. Nakon hlađenja (na sobnoj temperaturi) u tkivima je blokirana aktivnost endogene peroksidaze. U ovom koraku, tkiva su inkubirana u vodenoj otopini 3% vodonik peroksida, 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon kratkotrajnog ispiranja TBS puferom (*Tris buffered saline*) pH 7.4, na tkiva su aplikovana primarna antitijela odgovarajuće koncentracije i inkubirana preko noći na 4°C u vlažnoj komori.

Da bi se izbjeglo nespecifično bojenje pozadine i/ili da bi se minimiziralo nespecifično vezivanje antitijela sa endogenim imunoglobulinima G, presjeci tkiva su kratko prije aplikacije primarnih antitijela tretirani sa komercijalno pripremljenim blokatorima neželjenih proteinskih reakcija (*Ultra V Block, Thermo Fisher Scientific, USA*).

Za detekciju antigenih determinanti NF-κB, BCL-2, kaspaze 3, BAX, AQP1 i AQP5 upotrebljena su komercijalno dostupna koncentrovana antitijela, koja su pripremljena za rad prema uputstvima proizvođača.

Korištena su sljedeća antitijela;

-Za NF-κB/p65: *anti-NF-kB p65 polyclonal rabbit antibody*, razblaženje 1:100, ab16502, *Abcam, USA*;

-Za BCL-2: *anti-Bcl-2 polyclonal rabbit antibody*, razblaženje 1:200, ab196495, *Abcam, USA*;

-Za kaspazu 3: *anti-Rabbit monoclonal antibody Cleaved Caspase-3 (Asp175), Clone 5A1E*, razblaženje 1:200, Cat#9664L *Cell Signaling Technology, USA*;

-Za BAX: *anti-Rabbit monoclonal antibody Bax, Clone E63*, razblaženje 1:300, ab32503, *Abcam, USA*;

-Za AQP1: *anti-Mouse monoclonal antibody Aquaporin 1/AQP1 Clone B-11*, razblaženje 1:75, sc-25287, *Santa Cruz Biotechnology, inc. USA*;

-Za AQP5: *anti-Mouse monoclonal antibody Aquaporin 5/AQP5 Clone D-7*, razblaženje 1:50, sc-514022, *Santa Cruz Biotechnology, inc. USA*.

Po isteku inkubacije, naredni dan, višak antitijela je ispran TBS puferom pH 7,4, a specifičnost interakcije između primarnih antitijela i njihovih antigenih determinanti su otkrivena primjenom osjetljivih detekcionih sistema, komponovanih od sekundarnih, anti-mišijih i/ili anti-zečijih IgG, konjugovanih sa peroksidazom hrena (HRP). Korišten je *ready to use* polivalentni, polimerni detekcioni sistem (*UltraVision Detection sistem HRP polimer & DAB Plus Chromogen, Thermo Fischer Scientific, USA*). U prvom koraku vizualizacije je

primjenjen pojačivač (*enhancer*) primarnog antitijela (10 minuta), a zatim HRP polimer (15 minuta); oba na sobnoj temperaturi. Poslije svake izmjene (primarno antitijelo, pojačivač i polimer) tkiva su kratko isprana TBS puferom pH 7,4. Mjesto vezivanja antitijela u tkivu je postalo vidljivo nakon kratkotrajnog bojenja (5 minuta) sa 3,3'-diaminobenzidin tetrahlorid (DAB) hromogenom, koji daje smeđu boju precipitata na mjestu pozitivne reakcije. Nakon ispiranja viška hromogena presjeci tkiva su kontrastirani *Maier*-ovim hematoksilinom (30 sekundi), isprani tekućom vodom, dehidrirani u rastućoj koncentraciji etanola (70%, 90% i 100%), prosvjetljeni u ksilolu i trajno uklopljeni u kanada balzam. Za kontrolisano praćenje imunohistohemijskih reakcija na tkivu (pozitivna i negativna kontrola) poštovane su preporuke proizvođača. Za pozitivnu kontrolu AQP1 i AQP5 je korišteno tkivo bubrega, a za NF- κ B, kaspazu 3, BCL-2 i BAX tkivo slezene. Za negativnu kontrolu reakcije je na ista kontrolna tkiva, umjesto primarnih antitijela, aplikovan TBS pufer zbog čega se u njima nije mogla očekivati nikakva imunološka aktivnost. Nakon imunohistohemijskog bojenja, mikroskopski preparati su pregledani na svjetlosnom mikroskopu Leica DM2500 opremljenim digitalnom kamerom MC170HD (*Leica, Microsystems, Schweiz*). Mikrofotografije su snimane na povećanju 400x pod istim optičkim uslovima i arhivirane u "Tiff" formatu (2592 × 1944 piksela).

U imunohistohemijskoj analizi jetre, na dvadeset slučajno odabranih polja po pacovu procenjen je broj pozitivnih hepatocita koji eksprimiraju NF- κ B, koristeći softver ImageJ (*National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*). Kvantifikacija imunopozitivnih hepatocita na NF- κ B je izračunata korištenjem formule: % pozitivno obojenih ćelija = (Broj pozitivno obojenih ćelija × 100) / Ukupan broj ćelija.

Fotometrijska analiza rezultata imunohistohemijskog obilježavanja tkiva pluća obavljena je u softveru za analizu bioloških slika Fiji (*National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*) [verzija 1.54f]), uz upotrebu opcije za dekonvoluciju boja i izdvajanju matrice iz mikrofotografija, sa specifično vezanim imunohistohemijskim hromogenom-DAB. Softverskom fotometrijom su određene površine dijelova tkivne frakcije, imunohistohemijski obilježene DAB-om, kao i srednje vrijednosti optičke gustine DAB-a, za svih šest analiziranih antigena (NF- κ B, BCL-2, kaspaza 3, BAX, AQP1 i AQP5) u pozitivnom alveolarnom parenhimu. Ukupno je analizirano 1440 HDAB mikrofotografija. Podaci su predstavljeni kao

srednja optička gustina \pm standardna devijacija za 10 vidnih polja po pacovu. Prosječna srednja optička gustina je upoređena između grupa.

4.6 Statistička analiza

Statistička analiza je obavljena pomoću softvera *IBM-SPSS Statistic* verzija 20.0 (*SPSS, Inc., Chicago IL, USA*). Za statističku obradu rezultata korištene su metode deskriptivne statistike (srednja vrijednost, standardna greška, standardna devijacija i varijansa). Nakon ispitivanja raspodjele varijabli *Shapiro-Wilk's* testom normalnosti, korišteni su odovarajući parametrijski ili neparametrijski testovi. Za testiranje razlika između grupa korišten je ANOVA test za upoređivanje srednjih parametrijskih, a *Kruskall-Wallis* i *Mann-Witney U* testovi za poređenje neparametrijskih karakteristika između grupa. *Tukey* i *Bonferonni* testovi su korišteni za *post hoc* analizu. Za tabelarno i grafičko predstavljanje rezultata istraživanja korišteni su sljedeći softveri *MS Office Word 2016*, *MS Office Excel* i *GraphPad Prism 6*.

5. REZULTATI

5.1 Rezultati primjene UDCA i CDCA u endotoksemiji izazvanoj LPS-om

5.1.1 Efekti primjene UDCA i CDCA na produkciju proinflammatoryh citokina u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a

Koncentracije TNF- α , GM-CSF, IL-2, IFN- γ , IL-6 i IL-1 β su bile signifikantno povećane 2h nakon aplikacije neletalne doze LPS-a ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$). UDCA i CDCA date kao predtretman oralno tokom 10 dana pokazale su antiinflamatorne efekte koji se manifestuju značajnim smanjenjem nivoa TNF- α , GM-CSF i IL-1 β u endotoksemiji izazvanoj LPS-om ($p < 0,05$). Samo predtretman sa UDCA je doveo do značajnog smanjenja nivoa IL-6 ($p < 0,05$), dok je samo predtretman sa CDCA doveo do značajnog smanjenja nivoa IFN- γ ($p < 0,01$) (Tabela 1).

Tabela 1. Efekti primjene UDCA i CDCA na koncentraciju proinflammatoryh citokina mjerenih 2h nakon primjene LPS-a

Parametri	Grupe					
	C	LPS	UDCA	UDCA+LPS	CDCA	CDCA+LPS
TNF- α (pg/mL)	4.48 \pm 2.06	19.41 \pm 8.01 $\dagger\dagger$	3.91 \pm 0.64	9.96 \pm 1.02*	4.69 \pm 2.12	6.36 \pm 3.84**
GM-CSF (pg/mL)	9.57 \pm 19.46	179.66 \pm 55.82 $\dagger\dagger\dagger$	6.67 \pm 4.49	85.24 \pm 64.95*	3.95 \pm 2.96	106.60 \pm 57.87*
IL-2 (pg/mL)	1.88 \pm 1.69	18.82 \pm 13.23 $\dagger\dagger$	5.16 \pm 5.08	10.70 \pm 6.28	6.54 \pm 4.44	8.38 \pm 2.55
IFN- γ (pg/mL)	6.97 \pm 5.63	14.52 \pm 5.90 \dagger	13.36 \pm 3.85	10.73 \pm 2.10	8.53 \pm 2.75	6.41 \pm 1.60**
IL-6 (pg/mL)	24.50 \pm 15.76	64.85 \pm 13.42 $\dagger\dagger$	28.52 \pm 22.66	43.83 \pm 15.23*	46.56 \pm 17.19	44.70 \pm 23.51
IL-1 β (pg/mL)	2.96 \pm 2.19	25.11 \pm 22.67 \dagger	1.61 \pm 1.07	2.19 \pm 1.58*	5.43 \pm 3.21	1.67 \pm 0.2*

C-kontrolna grupa; LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD ($n = 6$). *Mann-Whitney* test i zvjezdica (*) ukazuju na značajne razlike u poređenju sa LPS grupom * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$, a znak (\dagger) ukazuje na značajne razlike u poređenju sa C grupom $\dagger\dagger$ $p < .01$, $\dagger\dagger\dagger$ $p < .001$.

5.1.2 Efekti primjene UDCA i CDCA na biohemijske parametre i serumske markere oštećenja jetre u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a

AST, ALT i LDH su korišteni kao markeri akutnog oštećenja jetre. Povećana aktivnost AST i LDH u grupi tretiranoj LPS-om ($p < 0,01$) ukazuje na to da je LPS izazvao oštećenje jetre (Tabela 2). Aktivnost LDH je smanjena u UDCA+LPS grupi u poređenju sa LPS grupom, ukazujući da UDCA ublažava efekte LPS-a. Značajno povećanje nivoa glukoze u krvi, CK, TnI i Hcy je primjećeno kod svih pacova tretiranih LPS-om (Tabela 2). UDCA i CDCA nisu uticale na nivoe glukoze kod pacova tretiranih LPS-om. UDCA je zabilježila značajno smanjenje nivoa TnI i CK ($p < 0,01$). I UDCA i CDCA su pokazale značajno smanjenje Hcy ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Efekti primjene UDCA i CDCA na biohemijske parametre i serumske markere oštećenja jetre mjerene 48h nakon primjene LPS-a

Parametri	Grupe					
	C	LPS	UDCA	UDCA+LPS	CDCA	CDCA+LPS
Glukoza (mmol/L)	12.70 ± 2.37	17.70 ± 4.37††	9.02 ± 1.76	16.61 ± 3.22	8.35 ± 2.18	16.92 ± 2.55
CK (U/L)	274.83 ± 40.01	5467.33 ± 1346.34†††	627.27 ± 846.87	3514.67 ± 319.02*	1641.67 ± 1194.92	3038.03 ± 1648.39
AST (U/L)	100.83 ± 18.38	179.5 ± 71.73††	142.17 ± 28.06	154.67 ± 29.28	119.0 ± 30.49	150.00 ± 45.17
ALT (U/L)	71.67 ± 13.49	60.33 ± 22.39	59.33 ± 17.99	64.50 ± 21.24	64.00 ± 23.95	67.67 ± 17.12
LDH (U/L)	120.25 ± 56.67	955.33 ± 567.24††	187.16 ± 152.16	591.33 ± 143.25*	446 ± 270.92	899.00 ± 768.67
Troponin I (pg/mL)	8.22 ± 2.13	151.28 ± 48.14†††	14.62 ± 3.29	46.46 ± 8.75*	45.40 ± 17.47†	121.15 ± 66.58
Hcy (μmol/L)	4.78 ± 0.83	7.96 ± 0.71†††	5.83 ± 1.14	5.21 ± 0.70***	6.35 ± 1.39	4.58 ± 1.30***

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD ili srednja vrijednost ± SE. CK-kreatin kinaza; AST-aspartat aminotransferaza; ALT-alanin aminotransferaza; LDH-laktat dehidrogenaza; Hcy-homocistein; C-kontrolna grupa; LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidomom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* i *Mann-Whitney* testovi, a zvjezdica (*) ukazuje na značajne razlike u poređenju sa LPS grupom * $p < .05$, ** $p < .01$ *** $p < .001$ i znak (†) ukazuje na značajne razlike u poređenju sa C grupom †† $p < .01$, ††† $p < .001$.

5.1.3 Efekti primjene UDCA i CDCA na lipidni profil u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a

Lipidni profil je analiziran da bi se istražili efekti UDCA i CDCA na metabolizam lipida. Uočeno je povećanje TC, LDL i TG u LPS grupi ($p < 0,01$) u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 3). Predtretman sa UDCA doveo je do značajnog smanjenja nivoa TG ($p < 0,05$), a predtretman sa CDCA je rezultirao značajnim smanjenjem nivoa TG i LDL ($p < 0,05$) (Tabela 3).

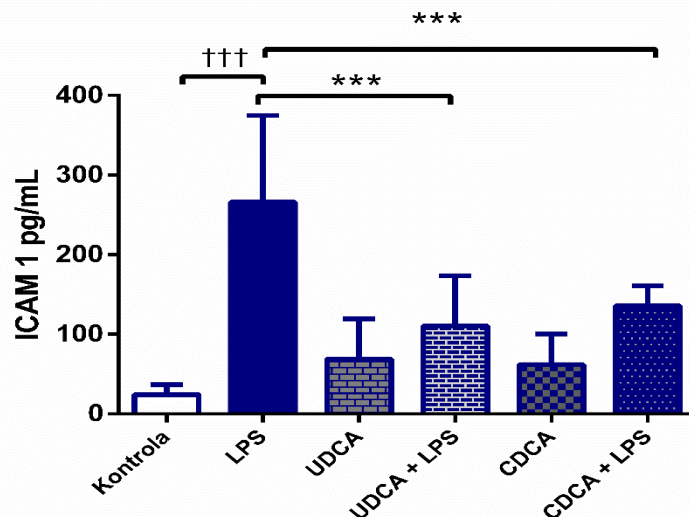
Tabela 3. Serumski lipidni profil kod pacova tretiranih sa UDCA i CDCA određivan 48h nakon primjene LPS-a

Parameters	Groups (mean \pm SD)					
	C	LPS	UDCA	UDCA+LPS	CDCA	CDCA+LPS
TC (mmol/L)	2.13 \pm 0.19	2.70 \pm 0.39 ^{††}	2.56 \pm 0.27 [†]	2.53 \pm 0.15	2.18 \pm 0.26	2.38 \pm 0.20
LDL (mmol/L)	0.28 \pm 0.04	0.43 \pm 0.08 ^{††}	0.35 \pm 0.05 [†]	0.35 \pm 0.05	0.31 \pm 0.04	0.30 \pm 0.06*
HDL (mmol/L)	0.83 \pm 0.08	0.85 \pm 0.54	0.88 \pm 0.11	0.80 \pm 0.12	0.75 \pm 0.10	0.80 \pm 0.09
TG (mmol/L)	0.50 \pm 0.06	0.88 \pm 0.22 ^{††}	0.48 \pm 0.13	0.67 \pm 0.05*	0.48 \pm 0.08	0.65 \pm 0.10*

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD. TC-ukupni kolesterol; LDL-lipoproteini niske gustine; HDL-lipoproteini visoke gustine; TG-trigliceridi; C-kontrolna grupa; LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidomom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Whitney* test, a zvjezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom * $p < .05$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom † $p < .05$; †† $p < .01$.

5.1.4 Efekti primjene UDCA i CDCA na endotelnu disfunkciju u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a

Rastvorljivi ICAM 1 je korišten kao marker endotelne disfunkcije. Nivo ICAM-1 u LPS grupi je značajno povećan u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$). UDCA i CDCA su pokazale koristan efekat u suzbijanju endotelne disfunkcije u endotoksemiji izazvanoj LPS-om. Obe žučne kiseline su dovele do značajnog smanjenja nivoa ICAM-1 u UDCA+LPS i CDCA+LPS grupi, u poređenju sa LPS grupom ($p < 0,001$) (Slika 6).

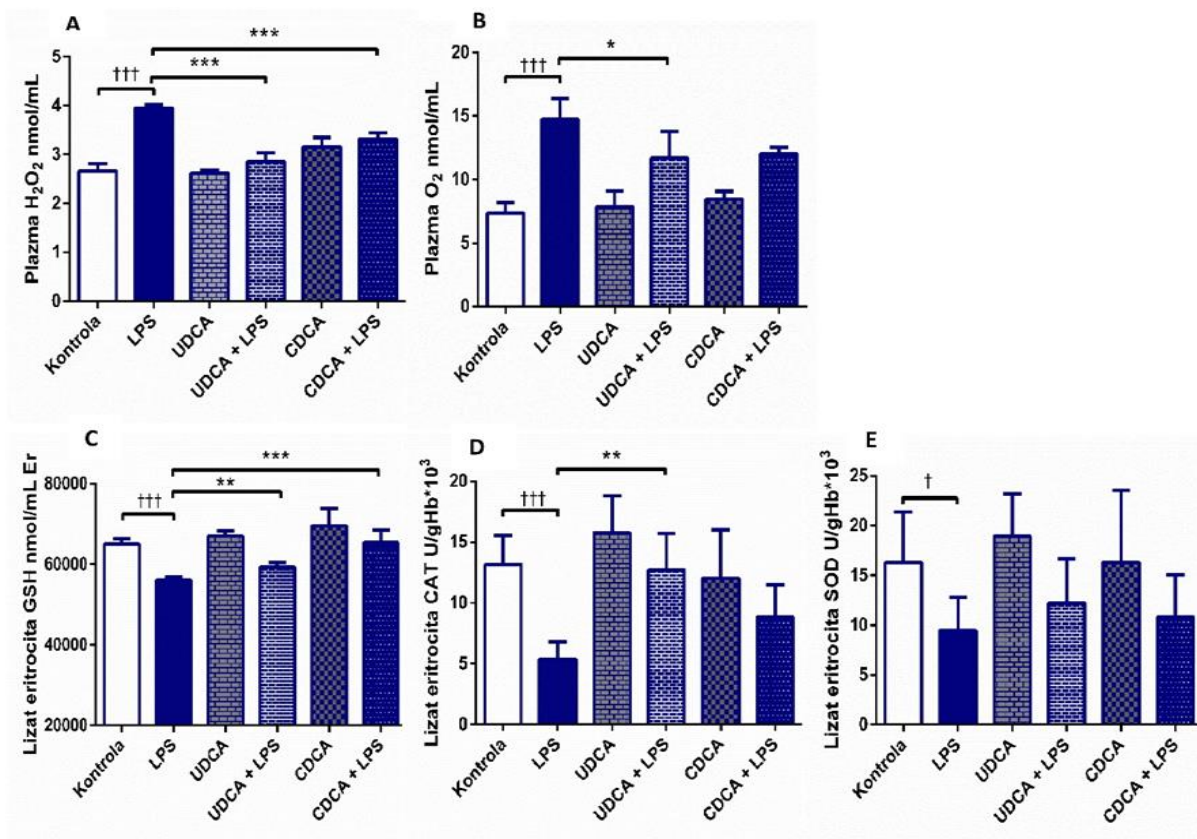


Slika 6. Efekat primjene UDCA i CDCA na nivo rastvorljivog ICAM-1 u serumu

LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Witney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom $*** p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom $††† p < .001$.

5.1.5 Efekti primjene UDCA i CDCA na markere oksidativnog stresa u plazmi u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a

UDCA i CDCA su pokazale antioksidativne efekte u endotoksemiji izazvanoj LPS-om (Slika 7). ROS igra ključnu ulogu u oksidativnom stresu i kao predstavnici ROS analizirani su H_2O_2 i O_2^- . Nivoi H_2O_2 i O_2^- su značajno povećani u LPS grupi u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0.001$), međutim primjena UDCA i CDCA je smanjila proizvodnju ROS u endotoksemiji izazvanoj LPS-om. Primjena UDCA i CDCA je značajno smanjila nivo H_2O_2 ($p < 0.001$) (Slika 7A). Samo je UDCA smanjila nivo O_2^- ($p < 0,05$), dok CDCA nije ispoljila efekat na nivo O_2^- (Slika 7B). SOD, CAT i GSH su ispitivani kao komponente antioksidativne odbrane. CAT, GSH i SOD su pokazali smanjenje u grupi tretiranoj LPS-om ($p < 0,001$, $p < 0,001$ i $p < 0,05$) (Slike 7C, 7D i 7E). UDCA i CDCA su pokazale svoje pozitivno dejstvo na nivo GSH ($p < 0,01$, $p < 0,001$) (Slika 7C), dok je samo UDCA pokazala dejstvo na aktivnost CAT ($p < 0,01$) (Slika 7D). Ni jedna žučna kiselina nije ispoljila efekat na aktivnost SOD (Slika 7E).



Slika 7. Efekti UDCA i CDCA na markere oksidativnog stresa u plazmi

(A) Nivo H_2O_2 u plazmi; (B) Nivo O_2^- u plazmi; (C) Nivo GSH u lizatu eritrocita; (D) Aktivnost CAT u lizatu eritrocita; (E) Aktivnost SOD u lizatu eritrocita. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD ili srednja vrijednost \pm SE. LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Whitney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom * $p < .05$, *** $p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom † $p < .05$; †† $p < .01$; ††† $p < .001$

5.1.6 Efekti primjene UDCA i CDCA na tjelesnu težinu (TT), težinu jetre (TJ) i odnos TJ/TT u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a

LPS nije izazvao značajan gubitak tjelesne težine (Tabela 4), ali je značajno povećao težinu jetre ($p < 0,01$), a predtretman sa CDCA je spriječio ovaj LPS-om indukovani efekat ($p < 0,05$). Desetodnevni predtretman sa UDCA i CDCA je umanjio promjene u odnosu TJ/TT u endotoksemiji izazvanoj LPS-om.

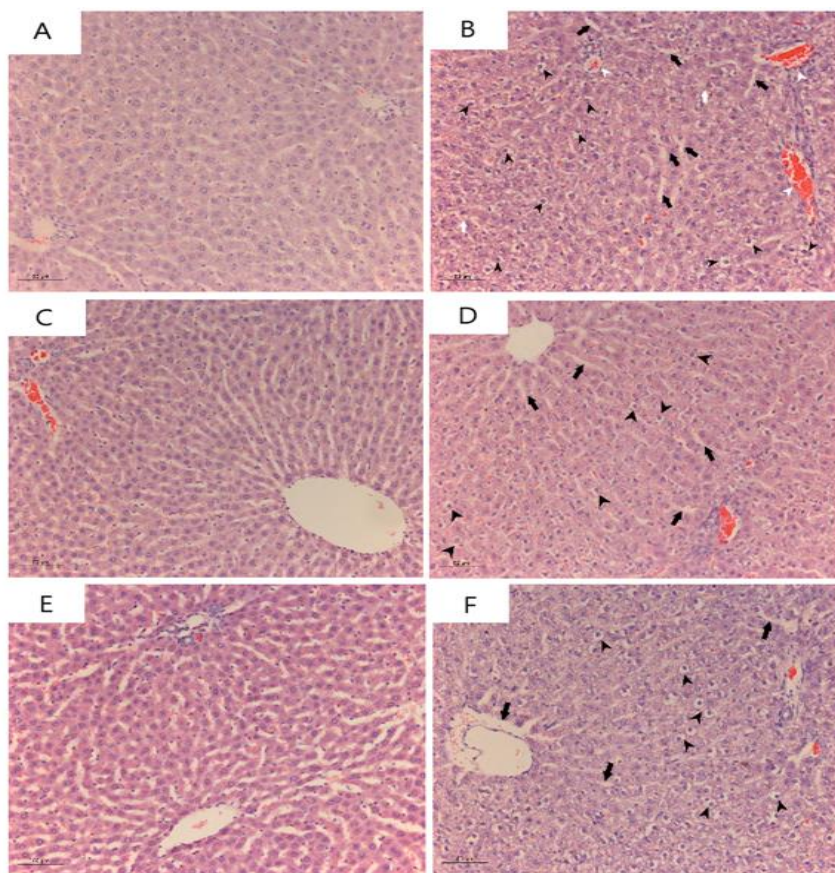
Tabela 4. Efekti UDCA i CDCA predtretmana na promjene u TT, TJ i TJ/TT

Parametri	Grupe (mean \pm SD)					
	C	LPS	UDCA	UDCA+LPS	CDCA	CDCA+LPS
TT (g)	218.33 \pm 7.20	212.00 \pm 13.25	228.00 \pm 13.61	207.50 \pm 17.62	218.83 \pm 16.95	206.00 \pm 10.54
TJ (g)	6.59 \pm 0.32	10.92 \pm 1.02 $\dagger\dagger$	6.43 \pm 0.32	9.35 \pm 1.42	6.00 \pm 0.44	9.62 \pm 0.53*
TJ/TT	0.030 \pm 0.002	0.052 \pm 0.003 $\dagger\dagger$	0.028 \pm 0.001	0.045 \pm 0.003*	0.027 \pm 0.002	0.047 \pm 0.002*

Podaci su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD. TT-tjelesna težina; TJ-težina jetre; TJ/TT-odnos težine jetre i tjelesne težine. C-kontrolna grupa; LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. *Mann-Whitney* test i zvjezdica (*) ukazuju na značajne razlike u poređenju sa LPS grupom * $p < .05$, a znak (\dagger) ukazuje na značajne razlike u poređenju sa C grupom $\dagger p < .05$, $\dagger\dagger p < .01$.

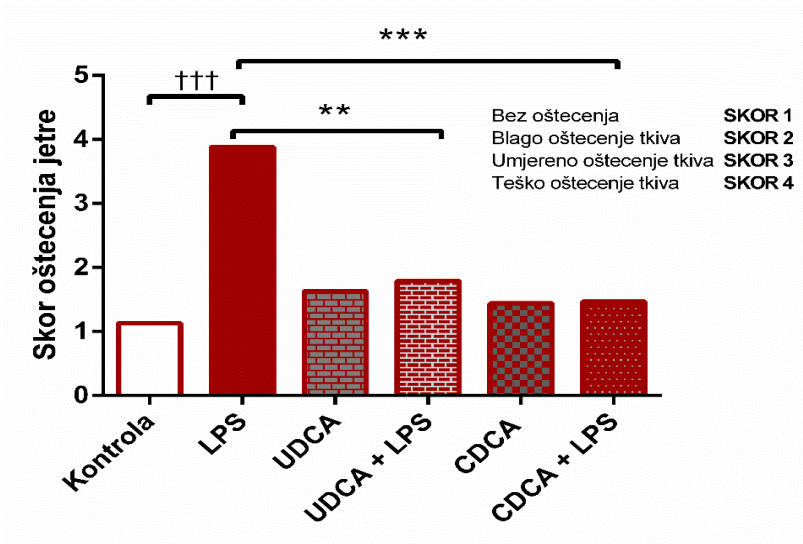
5.1.7 Efekti primjene UDCA i CDCA na patohistološke karakteristike jetre u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a

Primjena UDCA i CDCA je značajno ublažila oštećenje jetre izazvano LPS-om ($p < 0,01$, $p < 0,001$) (Slike 8 i 9). Mikroskopski, tkiva jetre kontrolnih životinja su pokazala normalnu histologiju (Slika 8A). Kod pacova tretiranih samo LPS-om primjećeno je značajno oštećenje jetre. Svjetlosne mikrofotografije pokazale su gubitak lobularne arhitekture i disocijaciju hepatocitne ploče. Uočena je blaga sinusna dilatacija i perisinusoidalni prostorni edem. Hepatociti su pokazali balonsku degeneraciju sa prisutnim multifokalnim nekrotičnim ćelijama. Kongestija je primjećena u centralnoj veni i portalnim krvnim sudovima (Slika 8B). Kod pacova tretiranih samo sa UDCA, mikrofotografije su pokazale normalno tkivo jetre sa blagom dilatacijom i ekstravazacijom u perisinusoidnim prostorima (Slika 8C). U UDCA+LPS grupi pacova je otkriveno tkivo jetre sa djelimično očuvanom lobularnom arhitekturom, blagom sinusoidnom dilatacijom i balonskom degeneracijom u hepatocitima zone II. Hepatociti zone I i zone III su pokazali normalno jezgro i citoplazmu (Slika 8D). Kod pacova tretiranih samo sa CDCA, svetlosne mikrofotografije su pokazale normalno tkivo jetre sa blagom sinusoidnom dilatacijom i ekstravazacijom u perisinusoidnim prostorima (Slika 8E). U CDCA+LPS grupi pacova, naši rezultati su pokazali tkivo jetre sa djelimično očuvanom lobularnom arhitekturom i blagim perivaskularnim i sinusoidnim edemom. Neki hepatociti zone I i zone II su bili vakuolisani, dok su hepatociti zone III pokazali normalno jezgro i citoplazmu (Slika 8F).



Slika 8. Preparat jetre (H&E bojenje). Uvećanje 200x

(A) Kontrolna grupa. Svjetlosna mikrofotografija prikazuje normalno tkivo jetre. (B) LPS grupa. Svjetlosna mikrofotografija prikazuje gubitak lobularne arhitekture i disocijaciju ploča hepatocita (označeno bijelim strelicama). Pored toga, vidljiva je blaga sinusna dilatacija i edem u perisinusoidnom prostoru (označeno crnim strelicama). Hepatociti pokazuju balonsku degeneraciju i multifokalne nekrotične ćelije su evidentne (označene crnim vrhovima strelica). Kongestija se primjećuje i u centralnoj veni i u portalnim krvnim sudovima (označeno bijelim vrhovima strelica). (C) UDCA grupa. Svjetlosna mikrofotografija prikazuje normalno tkivo jetre sa blagom sinusoidnom dilatacijom. (D) UDCA + LPS grupa. Mikrofotografija prikazuje tkivo jetre sa djelimično očuvanom lobularnom arhitekturom, sa blagom sinusoidnom dilatacijom (označeno crnim strelicama). Ploče hepatocita održavaju svoju normalnu strukturu, a balonska degeneracija ćelija je očigledna samo u zoni II (označena crnim strelicama). Hepatociti zone I i zone III pokazuju normalno jezgro i citoplazmu. (E) CDCA grupa. Svjetlosna mikrofotografija prikazuje normalno tkivo jetre sa blagom sinusoidnom dilatacijom i ekstravazacijom u perisinusoidnim prostorima. (F) CDCA+ LPS grupa. Svjetlosna mikrofotografija ilustruje tkivo jetre sa djelimično očuvanom lobularnom arhitekturom, praćeno blagim perivaskularnim i sinusoidnim edemom (označeno crnim strelicama). Pored toga, neki hepatociti zone I i zone II pokazuju vakuolaciju (označeno crnim strelicama), dok hepatociti zone III održavaju normalno jezgro i citoplazmatski izgled.

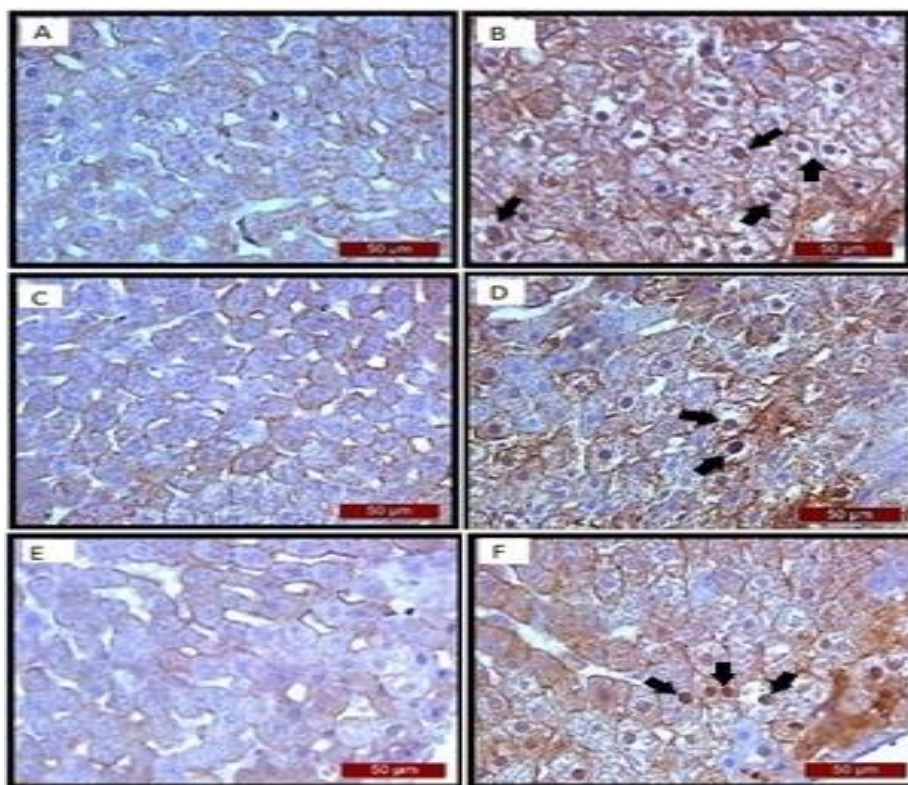


Slika 9. Semikvantitativni patološki skor zasnovan na težini oštećenja tkiva jetre

Ocjena oštećenja jetre je izračunata na osnovu slika bojenih HE. LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Witney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom *** $p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom †† $p < .01$, ††† $p < .001$.

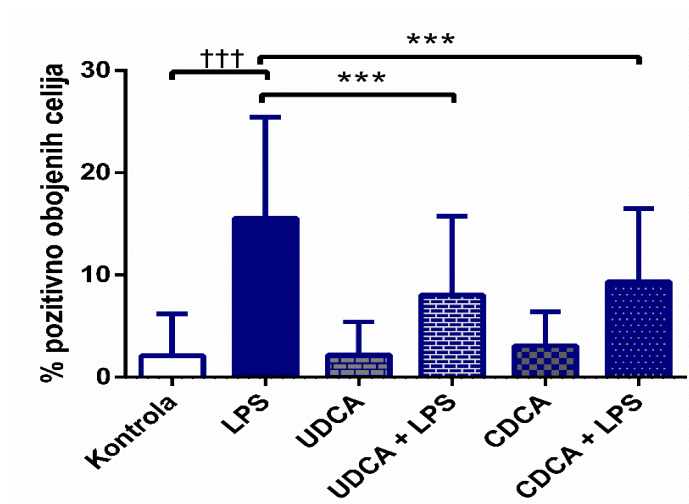
5.1.8 Efekti primjene UDCA i CDCA na ekspresiju NF- κ B u hepatocitima u endotoksemiji izazvanoj primjenom LPS-a

U našem istraživanju imunohistohemijska analiza jetre pacova (Slika 10 A-F, Slika 11) je pokazala značajno povećanje imunoreaktivnosti NF- κ B u hepatocitima nakon primjene LPS-a u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$). Nasuprot tome, pacovi prethodno tretirani sa UDCA i CDCA su pokazali značajno smanjenje prekomjerne ekspresije NF- κ B izazvane LPS-om u hepatocitima ($p < 0,001$). Pacovi koji su primali samo UDCA ili CDCA su pokazali negativno imunološko bojenje na NF- κ B u tkivu jetre, što liči na obrazac primjećen u kontrolnoj grupi. Ovi rezultati snažno ukazuju na značajno slabljenje ekspresije NF- κ B u endotoksemiji izazvanoj LPS-om kroz davanje UDCA i CDCA



Slika 10. Imunohistohemijska procjena NF- κ B u tkivu jetre pacova (uvećanje 400x)

(A) Kontrolna grupa nije pokazala ekspresiju NF- κ B. (B) LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunoreaktivnosti NF- κ B unutar hepatocita (nuklearno bojenje). Smeđa boja ukazuje na NF- κ B pozitivnost (označeno crnim strelicama). (C) UDCA grupa nije pokazala ekspresiju NF- κ B. (D) UDCA+LPS grupa je pokazala značajno smanjenje NF- κ B imunobojenja. (E) CDCA grupa takođe nije pokazala ekspresiju NF- κ B. (F) CDCA+LPS grupa je pokazala značajno smanjenje u NF- κ B imunološkom bojenju.



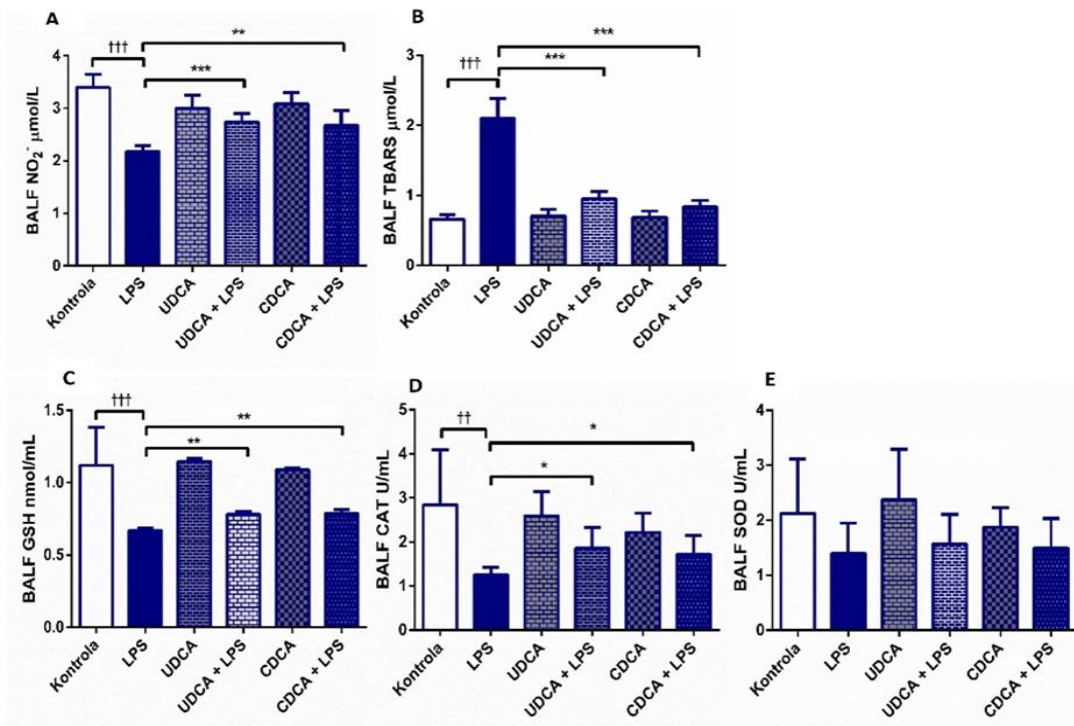
Slika 11. Procenat pozitivno obojenih hepatocita na NF- κ B

LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Witney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom *** $p < .001$, dok znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa kontrolnom grupom ††† $p < .001$.

5.2 Rezultati primjene UDCA i CDCA kod akutnog oštećenja pluća izazvanog LPS-om

5.2.1 Efekti primjene UDCA i CDCA na markere oksidativnog stresa u BALF-u kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a

UDCA i CDCA su pokazale antioksidativne efekte i kod akutnog oštećenja pluća izazvanog LPS-om (Slika 12). LPS je izazvao smanjenje nivoa NO_2^- ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolom, ali primjena UDCA i CDCA je značajno ublažila ovaj efekat ($p < 0,001$, $p < 0,01$) (Slika 12A). TBARS, kao marker lipidne peroksidacije, pokazao je značajno povećanje u LPS grupi u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$), što ukazuje na učešće LPS-a u oksidativnom stresu kod akutnog oštećenja pluća. Primjena UDCA i CDCA je značajno smanjila vrijednost TBARS ($p < 0,001$) (Slika 12B). GSH, CAT i SOD su ispitivani kao komponente antioksidativne odbrane. GSH i CAT su pokazali smanjenje u grupi tretiranoj LPS-om ($p < 0,001$, $p < 0,01$), a predtretman sa UDCA i CDCA je pokazao njihov antioksidativni efekat povećanjem nivoa GSH ($p < 0,01$) i aktivnosti CAT ($p < 0,05$) (Slika 12C i 12D). Ni jedna od žučnih kiselina nije uticala na aktivnost SOD (Slika 12E).



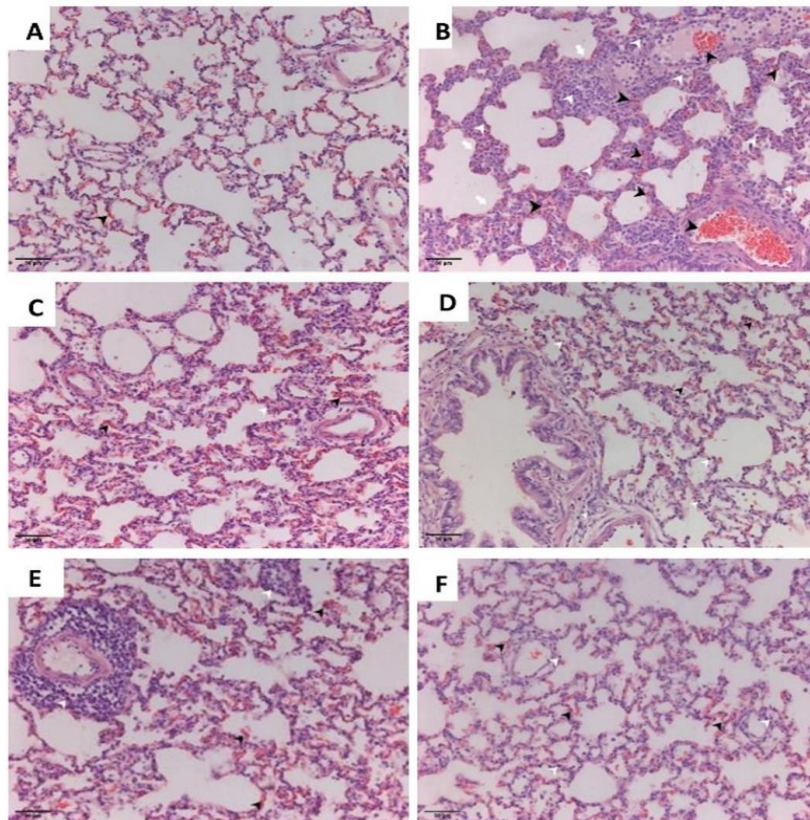
Slika 12. Efekti primjene UDCA i CDCA na markere oksidativnog stresa u BALF-u

(A) Nivo TBARS; (B) Nivo NO₂⁻; (C) Nivo GSH; (D) Aktivnost CAT; (E) Aktivnost SOD. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± SD ili srednja vrijednost ± SE. LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Whitney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom * $p < .05$, *** $p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom † $p < .05$; †† $p < .01$; ††† $p < .001$

5.2.2 Efekti primjene UDCA i CDCA na patohistološke karakteristike pluća kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a

Naše istraživanje je pokazalo fiziološku morfologiju pluća u kontrolnoj grupi (Slika 13A). Primjena UDCA i CDCA nije oštetila strukturu pluća, plućni parenhim je očuvan (Slika 13C i 13E). Grupa tretirana LPS-om je pokazala znatno oštećenje plućnog tkiva u poređenju sa kontrolnom grupom, sa vidljivim intersticijalnim krvarenjem, zapaljenjem, zadebljanjem interalveolarnih septi, vaskularnom kongestijom i perivaskularnim inflamatornim infiltratom (Slika 13B). Primjena UDCA i CDCA je ublažila oštećenje pluća izazvano LPS-om, što se može vidjeti i na histološkom preparatu pluća grupa pacova koji su u predtretmanu primali UDCA ili CDCA, a potom LPS. Kod ovih pacova je primjećeno smanjenje intersticijalne

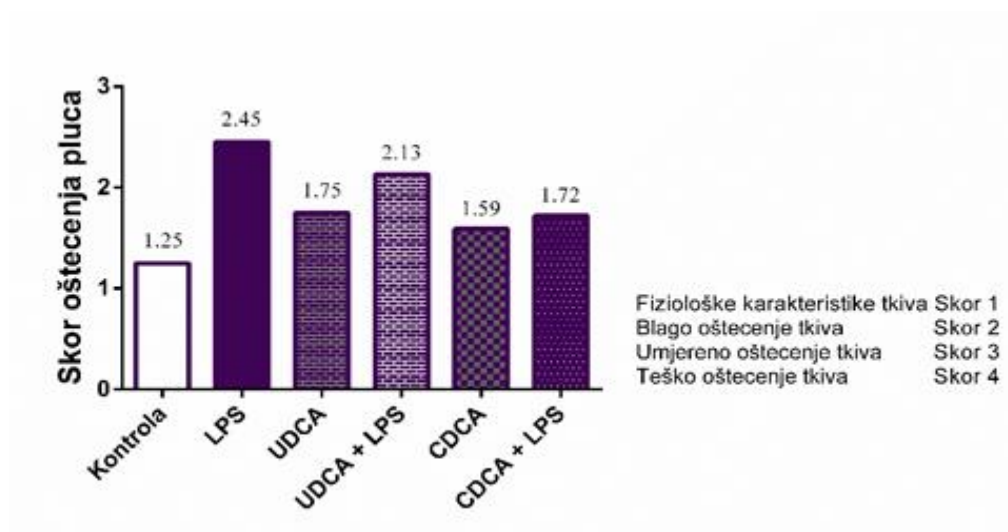
ekstravazacije i inflamatornog infiltrata i očuvanje vaskularnih zidova bez luminalne kongestije (Slika 13D i 13F). To ukazuje na efikasnost predtretmana UDCA i CDCA u smanjenju LPS-om indukovano oštećenja pluća.



Slika 13. Preparat pluća (H&E bojenje). Uvećanje 200x

A) Kontrolna grupa. Uzorak prikazuje očuvano plućno tkivo sa blagom ekstravazacijom. B) LPS grupa. Uzorak pokazuje akutnu povredu plućnog parenhima. Uočava se intersticijalno krvarenje, zapaljenje, kao i zadebljanje interalveolarnih septi. Evidentna je vaskularna kongestija i perivaskularni inflamatorni infiltrat. C) UDCA grupa. Na uzorku se nalazi očuvan plućni parenhim sa umjerenom ekstravazacijom i intersticijski inflamatorni infiltrat. D) UDCA + LPS grupa. Uzorak pokazuje očuvan plućni parenhim sa smanjenom intersticijalnom ekstravazacijom i inflamatornim infiltratom. Vaskularni zidovi su očuvani bez luminalne kongestije. E) CDCA grupa. Uzorak prikazuje očuvan plućni parenhim sa ekstravazacijom. Prisutan je pretežno perivaskularno lokalizovan inflamatorni infiltrat. F) CDCA + LPS grupa. Uzorak predstavlja očuvan plućni parenhim sa smanjenom ekstravazacijom i pretežno perivaskularno lokalizovan intersticijski inflamatorni infiltrat. Vaskularni zidovi ostaju očuvani bez luminalne kongestije.

Urađena patohistološka analiza pluća je potvrdila povoljne efekte primjene UDCA i CDCA u akutnom oštećenju pluća izazvanom primjenom LPS-a. Izvršeno je skorovanje od 1 do 4, pri čemu skor 1 označava fiziološke karakteristike tkiva, a veće vrijednosti skora ukazuju na oštećenje tkiva. Što je oštećenje tkiva veće, veća je vrijednost skora. Smanjenje skora oštećenja pluća u UDCA+LPS i CDCA+LPS grupama ukazuje na potencijalno zaštitno dejstvo ovih kiselina na pluća (Slika 14).

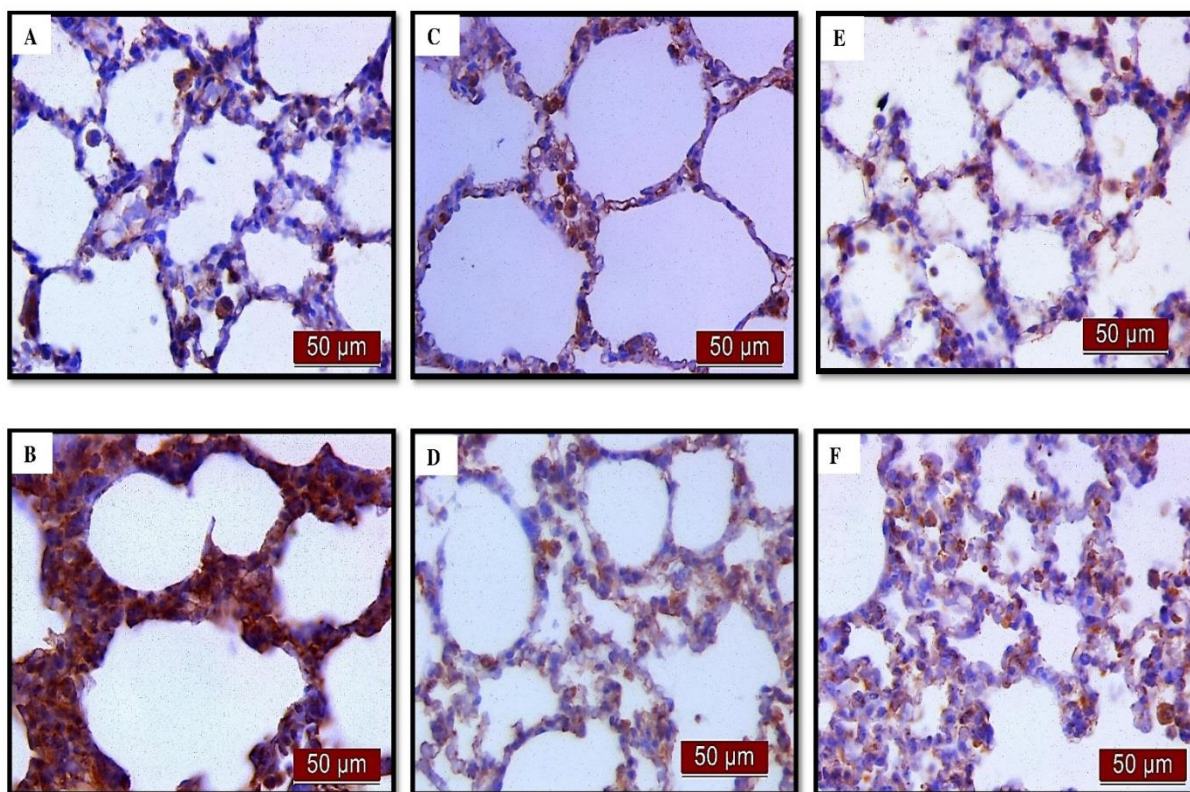


Slika 14. Semikvantitativni patološki skor zasnovan na težini oštećenja tkiva pluća

Ocjena oštećenja pluća je izračunata na osnovu slika bojenih HE. LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom.

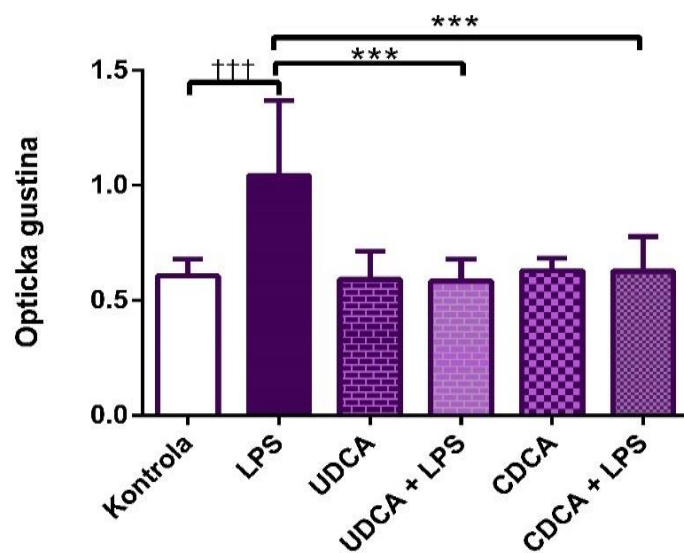
5.2.3 Efekti primjene UDCA i CDCA na ekspresiju NF- κ B kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a

Imunohistohemijska procjena NF- κ B (Slika 15) i vrijednost optičke gustine NF- κ B (Slika 16) u alveolarnom parenhimu pacova pokazale su značajan porast ekspresije NF- κ B nakon primjene LPS-a, u poređenju sa kontrolnom grupom ($p < 0,001$). Nasuprot tome, pacovi koji su prethodno tretirani sa UDCA i CDCA pokazali su značajno smanjenje LPS-om indukovane prekomjerne ekspresije NF- κ B u alveolarnom parenhimu (obe $p < 0,001$). Pacovi koji su primali samo UDCA ili CDCA, slično kontrolnoj grupi, imali su negativne imunohistohemijske nalaze za NF- κ B u plućnom tkivu. Ovi rezultati snažno ukazuju na značajno smanjenje ekspresije NF- κ B u plućima oštećenim primjenom LPS-a putem primjene UDCA i CDCA.



Slika 15. Imunohistohemijska procjena NF- κ B u tkivu pluća pacova (uvećanje 400x)

(A) Kontrolna grupa nije pokazala ekspresiju NF- κ B. (B) LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunoreaktivnosti NF- κ B u alveolarnom parenhimu. Smeđa boja ukazuje na NF- κ B pozitivnost. (C) UDCA grupa nije pokazala ekspresiju NF- κ B. (D) UDCA+LPS grupa je pokazala značajno smanjenje imunobojenja na NF- κ B. (E) CDCA grupa takođe nije pokazala ekspresiju NF- κ B. (F) CDCA+LPS grupa je pokazala značajno smanjenje imunobojenja na NF- κ B.

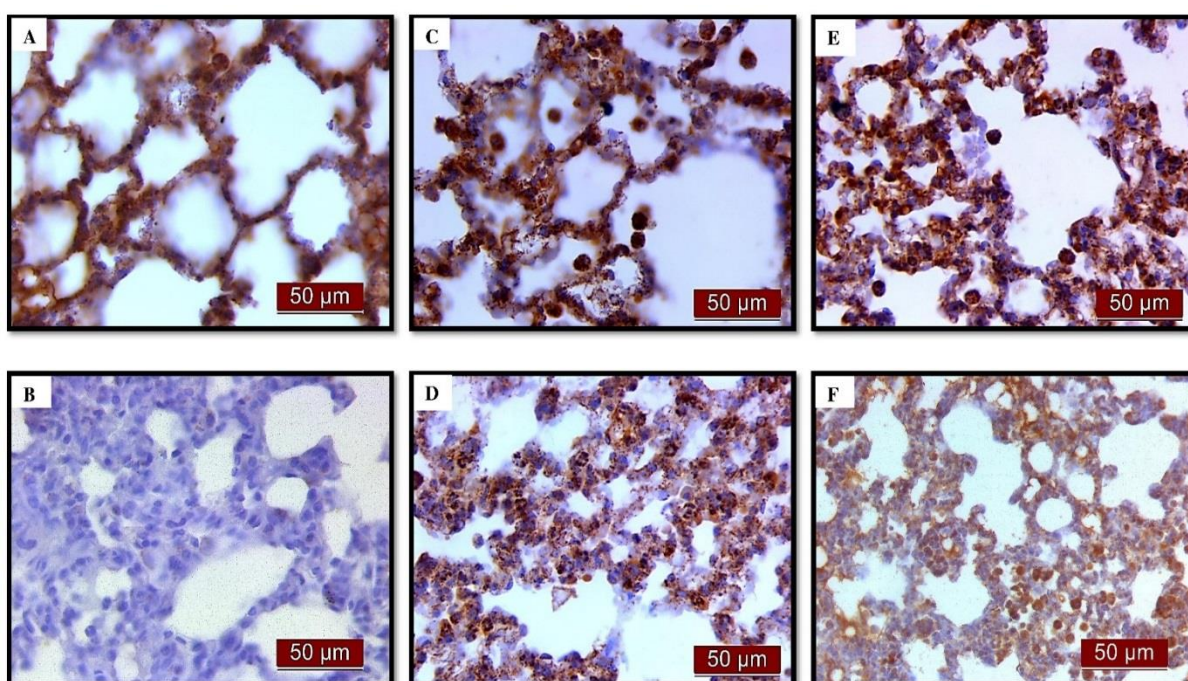


Slika 16. Vrijednost optičke gustine NF-κB u plućnom tkivu pacova

LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA- grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA- grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS- grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Witney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom *** $p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom ††† $p < .001$.

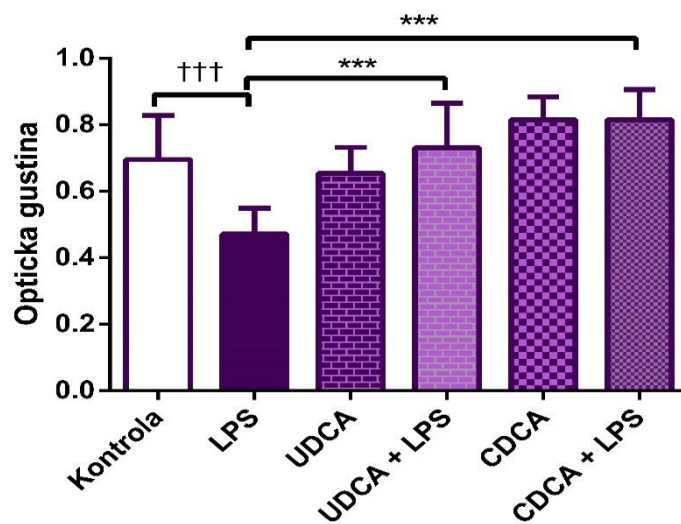
5.2.4 Efekti primjene UDCA i CDCA na markere apoptoze kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a

Imunohistohemijaska analiza je otkrila značajno smanjenje BCL-2 imunoreaktivnosti u alveolarnom parenhimu pacova tretiranih LPS-om, dok je povećanje imunoreaktivnosti primjećeno u grupama koje su tretirane sa UDCA i CDCA (Slika 17). Najniža vrednost optičke gustine BCL-2 pronađena je u grupi tretiranoj LPS-om ($p < 0,001$), dok su UDCA i CDCA značajno povećale optičku gustinu BCL-2, pokazujući zaštitne efekte ($p < 0,001$) (Slika 18).



Slika 17. Imunohistohemijaska procjena BCL-2 u tkivu pluća pacova (uvećanje 400x)

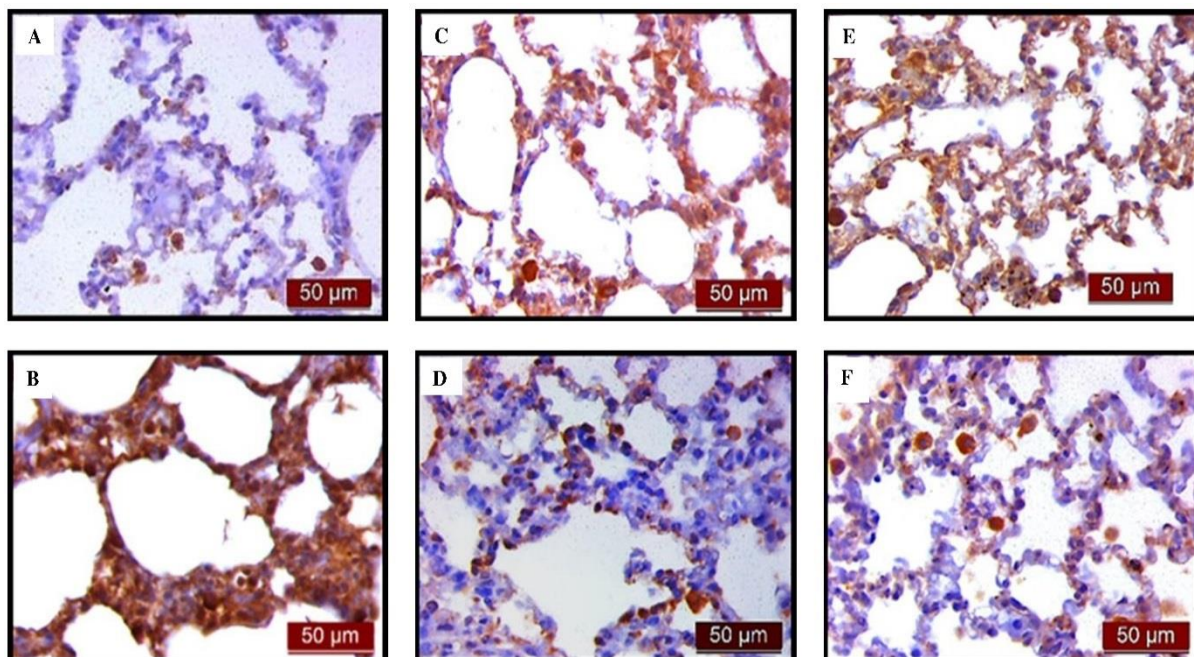
(A) Kontrolna grupa je pokazala značajnu ekspresiju BCL-2. (B) LPS grupa je pokazala značajno smanjenje imunoreaktivnosti BCL-2 u alveolarnom parenhimu. Smeđa boja ukazuje na BCL-2 pozitivnost. (C) UDCA grupa je pokazala ekspresiju BCL-2. (D) UDCA+LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunobojenja na BCL-2. (E) CDCA grupa takođe je pokazala ekspresiju BCL-2. (F) CDCA+LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunobojenja na BCL-2.



Slika 18. Vrijednost optičke gustine BCL-2 u plućnom tkivu pacova

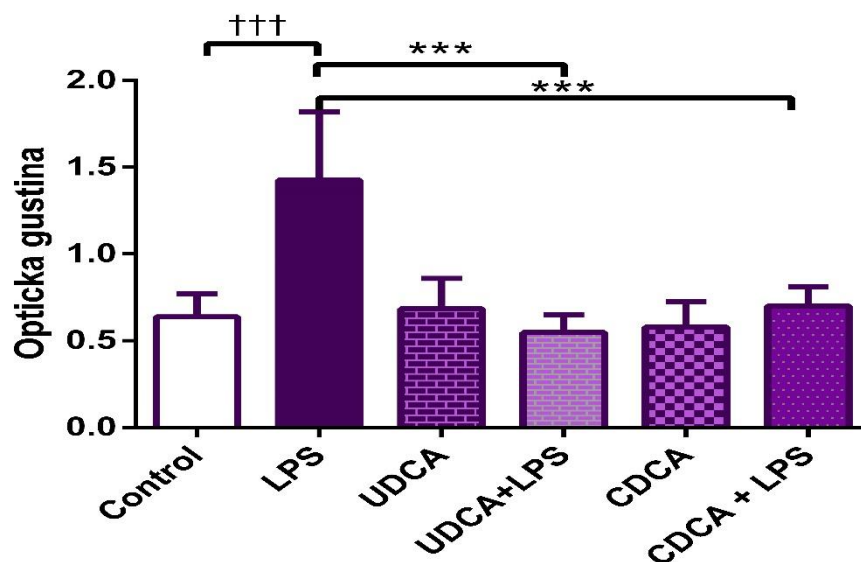
LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Witney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom $*** p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom $††† p < .001$.

Rezultati analize pro-apoptotskog markera kaspaze 3 pokazali su da je prethodni tretman sa UDCA i CDCA značajno smanjio ($p < 0,001$) ekspresiju kaspaze 3 kod LPS-om izazvanog akutnog oštećenja pluća. Slika 19 prikazuje imunohistohemijsko bojenje kaspaze 3 u alveolarnom parenhimu pacova u svim eksperimentalnim grupama, dok slika 20 prikazuje vrijednost optičke gustine kaspaze 3.



Slika 19. Imunohistohemijska procjena kaspaze 3 u tkivu pluća pacova (uvećanje 400x)

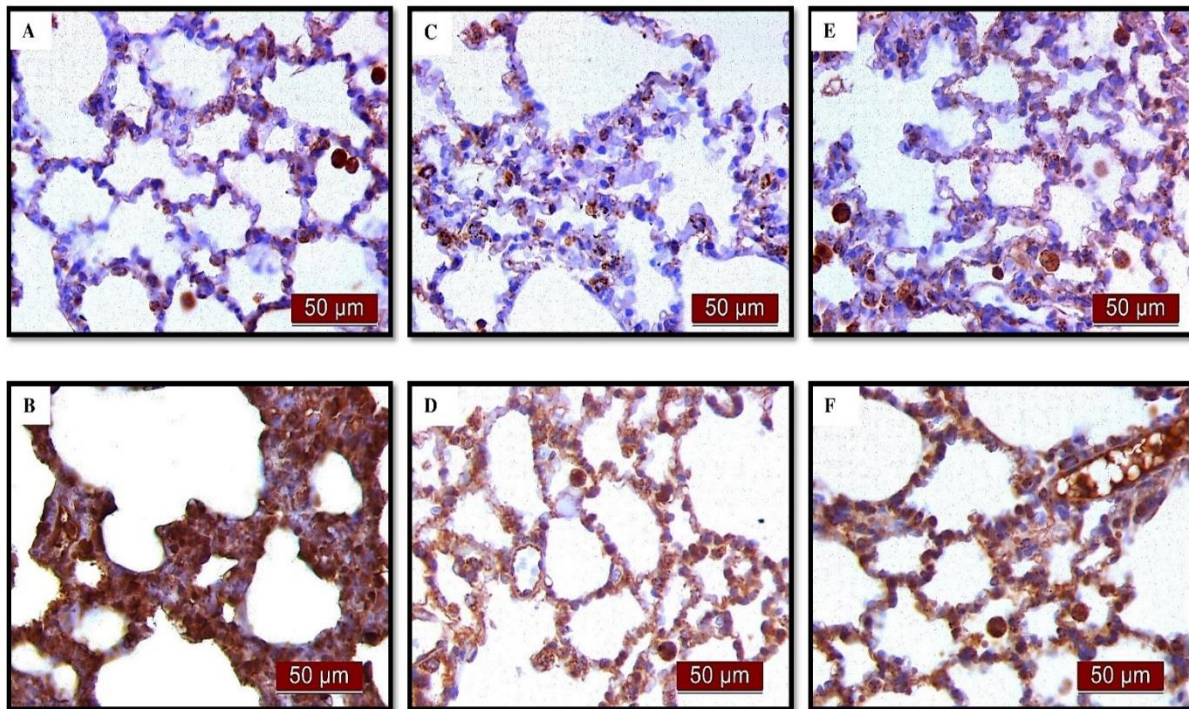
(A) Kontrolna grupa nije pokazala ekspresiju kaspaze 3. (B) LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunoreaktivnosti kaspaze 3 u alveolarnom parenhimu. Smeđa boja ukazuje na kaspazu 3 pozitivnost. (C) UDCA grupa nije pokazala ekspresiju kaspaze 3. (D) UDCA+LPS grupa je pokazala značajno smanjenje imunobojenja na kaspazu 3. (E) CDCA grupa takođe nije pokazala ekspresiju kaspaze 3. (F) CDCA+LPS grupa je pokazala značajno smanjenje imunobojenja na kaspazu 3



Slika 20. Vrijednost optičke gustine kaspaze 3 u plućnom tkivu pacova

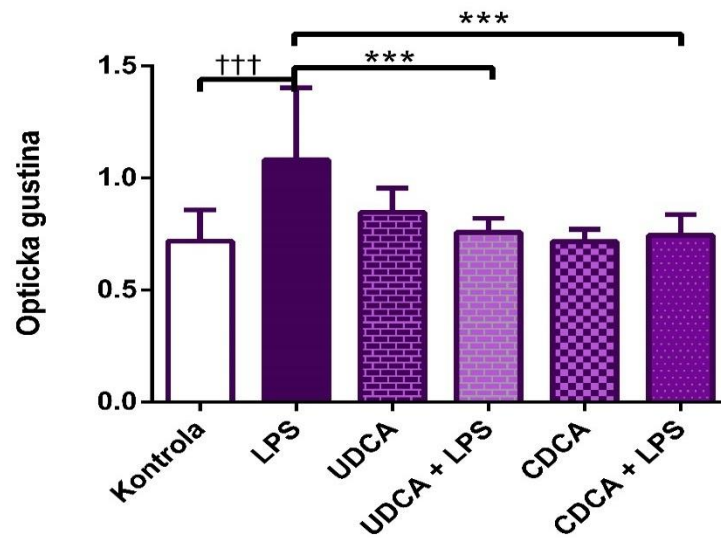
LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Witney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom *** $p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom ††† $p < .001$.

Slike 21 i 22 prikazuju rezultate imunohistohemijske analize proapoptotskog markera BAX u tkivu pluća pacova, koji je pokazao značajno povećanje imunoreaktivnosti u LPS grupi ($p < 0,001$). Nasuprot tome, UDCA i CDCA su pokazale zaštitni efekat značajnim smanjenjem imunoreaktivnosti, odnosno ekspresije ovog markera ($p < 0,001$).



Slika 21. Imunohistohemijska procjena BAX u tkivu pluća pacova (uvećanje 400x)

(A) Kontrolna grupa nije pokazala ekspresiju BAX. (B) LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunoreaktivnosti BAX u alveolarnom parenhimu. Smeđa boja ukazuje na BAX pozitivnost. (C) UDCA grupa nije pokazala ekspresiju BAX. (D) UDCA+LPS grupa je pokazala značajno smanjenje imunobojenja na BAX. (E) CDCA grupa takođe nije pokazala ekspresiju BAX. (F) CDCA+LPS grupa je pokazala značajno smanjenje imunobojenja na BAX.

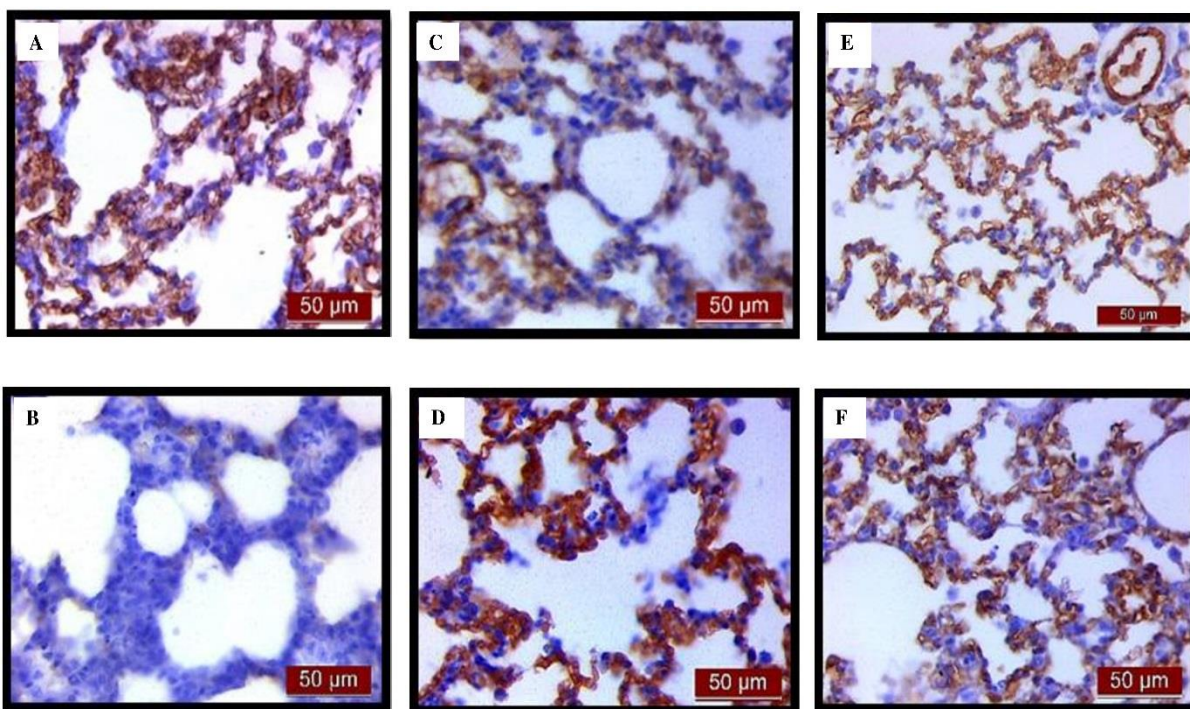


Slika 22. Vrijednost optičke gustine BAX u plućnom tkivu pacova

LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Witney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom *** $p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom ††† $p < .001$.

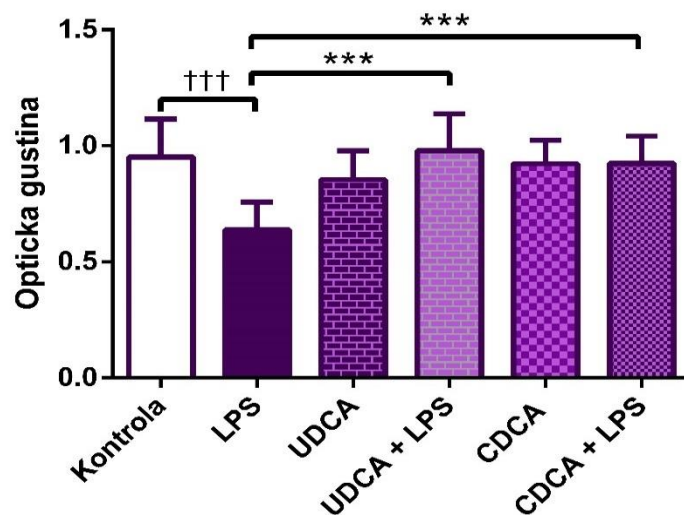
5.2.5 Efekti primjene UDCA i CDCA na ekspresiju akvaporina 1 i 5 kod akutnog oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a

Imunohistohemijska analiza je pokazala značajno smanjenje imunoreaktivnosti AQP1 u alveolarnom parenhimu pacova u LPS grupi i povećanje iste u grupama koje su prethodno tretirane sa UDCA i CDCA (Slika 23). Dodatno, najniža vrijednost optičke gustine AQP1 zabilježena je u grupi tretiranoj LPS-om ($p < 0,001$), dok su obe žučne kiseline, UDCA i CDCA, ponovo pokazale zaštitne efekte kod LPS-om izazvanog oštećenja pluća značajnim povećanjem optičke gustine AQP1 u plućnom tkivu pacova ($p < 0,001$) (Slika 24).



Slika 23. Imunohistohemijska procjena akvaporina 1 u tkivu pluća pacova (uvećanje 400x)

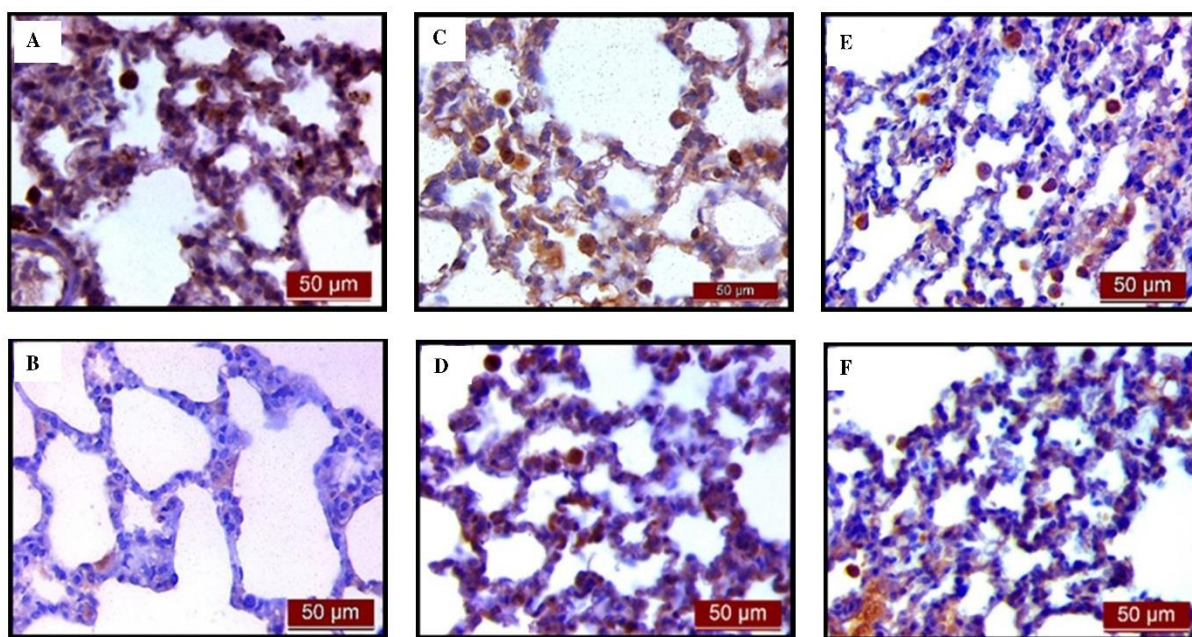
(A) Kontrolna grupa je pokazala značajnu ekspresiju AQP1. (B) LPS grupa je pokazala značajno smanjenje imunoreaktivnosti AQP1 u alveolarnom parenhimu. Smeđa boja ukazuje na AQP1 pozitivnost. (C) UDCA grupa je pokazala ekspresiju AQP1. (D) UDCA+LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunobojenja na AQP1. (E) CDCA grupa takođe je pokazala ekspresiju AQP1. (F) CDCA+LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunobojenja na AQP1.



Slika 24. Vrijednost optičke gustine akvaporina 1 u plućnom tkivu pacova

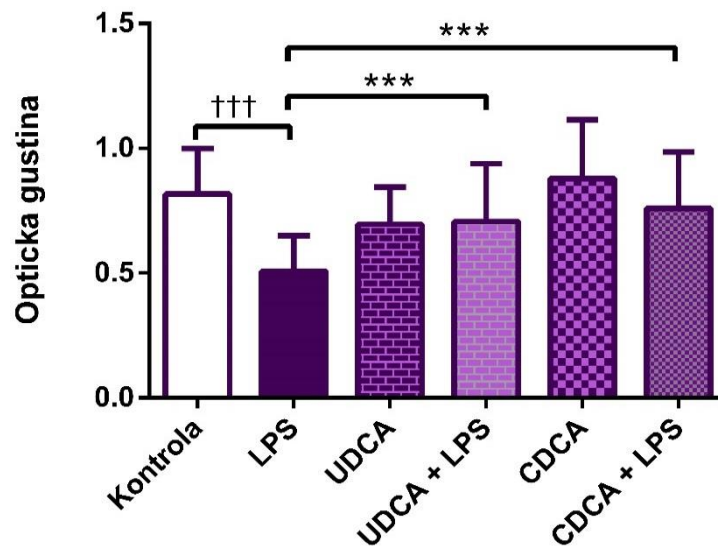
LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Witney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom *** $p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom ††† $p < .001$.

Rezultati ove studije pokazali su da je LPS značajno smanjio ($p < 0,001$) ekspresiju AQP5 u tkivu pluća pacova u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je tretman sa UDCA i CDCA doveo do značajnog povećanja ($p < 0,001$) ekspresije ovog AQP kod oštećenja pluća izazvanog primjenom LPS-a (Slika 25 i 26).



Slika 25. Imunohistohemijska procjena akvaporina 5 u tkivu pluća pacova (uvećanje 400x)

(A) Kontrolna grupa je pokazala značajnu ekspresiju AQP5. (B) LPS grupa je pokazala značajno smanjenje imunoreaktivnosti AQP5 u alveolarnom parenhimu. Smeđa boja ukazuje na AQP5 pozitivnost. (C) UDCA grupa je pokazala ekspresiju AQP5. (D) UDCA+LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunobojenja na AQP5. (E) CDCA grupa takođe je pokazala ekspresiju AQP5. (F) CDCA+LPS grupa je pokazala značajno povećanje imunobojenja na AQP5.



Slika 26. Vrijednost optičke gustine akvaporina 5 u plućnom tkivu pacova

LPS-grupa tretirana lipopolisaharidom; UDCA-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom; UDCA+LPS-grupa tretirana ursodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom; CDCA-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom; CDCA+LPS-grupa tretirana henodeoksiholnom kiselinom i lipopolisaharidom. Urađeni su *one-way* ANOVA, *Bonferroni* test i *Mann-Witney* test. Zvezdica (*) označava značajne razlike u poređenju sa LPS grupom *** $p < .001$, a znak (†) označava značajne razlike u poređenju sa C grupom ††† $p < .001$.

6. DISKUSIJA

Rezultati provedene studije su pokazali da UDCA i CDCA imaju anti-inflamatorni, antioksidativni, antiapoptotski i zaštitni efekat na jetru i pluća u eksperimentalnom modelu endotoksemije i akutnog oštećenja pluća, izazvanih primjenom LPS-a. Obe žučne kiseline su smanjile nivo proinflamatornih citokina i enzima jetre, normalizovale lipidni status i smanjile nivo rastvorljivog ICAM-1 u serumu; smanjile prooksidativne, a povećale antioksidativne markere u plazmi, ublažile oštećenje jetre i smanjile ekspresiju NF- κ B u jetri. Takođe, obe kiseline su pokazale antioksidativni efekat u BALF-u, ublažile oštećenje pluća, smanjile ekspresiju NF- κ B i proapoptotskih faktora BAX i kaspaze 3, a povećale ekspresiju antiapoptotskog BCL-2, i ekspresiju AQP1 i AQP5 u plućima.

LPS je široko poznat kao stimulator MAPK signalnih puteva, a posebno ERK, JNK i p38, koji imaju ključnu ulogu u regulaciji inflamatornih odgovora. Ovi putevi prolaze kroz fosforilaciju kao odgovor na LPS, a NF- κ B služi kao ključni regulator u proinflamatornim signalnim putevima, dovodeći do proizvodnje citokina, prvenstveno TNF- α i IL-1, koji imaju ključnu ulogu u promovisanju proinflamatornog stanja, pokrećući oslobađanje dodatnih citokina poput IL-6, IL-8, INF- γ i drugih citokina urođenog i stečenog imuniteta (18). Nedavno istraživanje je pružilo značajan uvid u dinamiku inflamatornog odgovora nakon primjene nesmrtonosne doze LPS-a, i pokazano je da primjena LPS-a dovodi do brzog i značajnog povećanja koncentracija ključnih proinflamatornih citokina, TNF- α , IL-1 β i IL-6, unutar prva dva sata nakon izlaganja (138). Ovi rezultati su potvrđeni i u našem istraživanju i prošireni na GM-CSF, IL-2 i IFN- γ . Ovaj inicijalni porast koncentracija ovih citokina sugerise intenzivnu aktivaciju imunološkog sistema, pri čemu TNF- α , IL-1 β i IL-6 igraju centralnu ulogu u pokretanju inflamatornih procesa. Ovi citokini doprinose regrutovanju i aktivaciji različitih imunoloških ćelija na mjestu inflamacije, što dalje pogoršava inflamatorni odgovor. Nakon ovog inicijalnog pika, navedeno istraživanje je pokazalo da dolazi do sporog i kontinuiranog smanjenja koncentracija ovih citokina u narednim satima (138). Ovaj pad sugerise aktivaciju mehanizama regulacije i povratne sprege koji su uključeni u kontrolu inflamatornog odgovora i spriječavanje prekomjernog oštećenja tkiva. Kontinuirano praćenje dinamike ovih proinflamatornih citokina pruža važne informacije o temporalnoj regulaciji inflamatornog odgovora, što može biti od suštinskog značaja za razumijevanje patofiziologije akutnih inflamatornih stanja izazvanih LPS-om. Ovi nalazi naglašavaju potrebu za daljim istraživanjima kako bi se bolje razumjeli mehanizmi koji kontrolišu početak i regulaciju

inflamacije, kao i potencijalne terapijske intervencije koje bi mogle modulirati ove procese u kliničkim uslovima.

Obimna literatura o UDCA ukazuje na njena citoprotektivna, imunomodulatorna i anti-inflamatorna dejstva (139–141). Studije su pokazale da UDCA ima potencijal da smanji proizvodnju proinflammatoryh citokina (142). Sličan efekat je objavljen i za CDCA (143), ali neke studije su sugerisale njenu proinflammatoryu ulogu (144).

Rezultati studije Ko i saradnika su pokazali da UDCA smanjuje LPS-om stimulirano oslobađanje inflamatornog medijatora NO i proinflammatoryh citokina TNF- α , IL-1, IL-1 β i IL-6, a povećava anti-inflamatorni citokin IL-10 (141). Studije imunih ćelija izvedene iz nekoliko različitih tkiva pokazuju da UDCA može da inhibiše aktivaciju mastocita, eozinofila i makrofaga i da promijeni fenotip i funkciju limfocita (145). UDCA može da inhibiše TNF- α indukovano oslobađanje IL-8 iz monocita (146). Preporučeno je i kliničko ispitivanje UDCA kod pacijenata sa ranim simptomima i kao profilaktički tretman u nastanku Covid 19 infekcije, ali o tome još uvijek nema dostupnih prekliničkih podataka (147). Joo i saradnici su u modelu inflamatornog procesa stimuliranog LPS-om u kulturi mikroglijalnih ćelija pokazali da UDCA smanjuje nivoe TNF- α i IL-1 β i tako inhibiše inflamatorni proces u ovim ćelijama (148).

I dok je UDCA konzistentno pokazivala svoje citoprotektivne efekte, studije sa CDCA su pokazale različite rezultate. Neke studije su prikazale njenu proinflammatoryu ulogu kroz sposobnost aktivacije NLRP3 inflamazoma i posljedičnog oslobađanja IL-1 β , podsticanjem proizvodnje ROS i efluksa K⁺ putem TGR5 receptora, kroz nizvodnu TGR5/EGFR (Receptor epidermalnog faktora rasta, *Epidermal growth factor receptor*, *EGFR*) signalizaciju, uključujući Akt, ERK i c-JNK signalni put (144). Međutim, neka istraživanja sa CDCA su pokazala njenu citoprotektivnu aktivnost (149). Neke studije su pokazale da CDCA vrši inhibitorni efekat na proizvodnju proinflammatoryh citokina IL-1, IL-6 i TNF- α u makrofazima stimuliranim LPS-om, uglavnom preko TGR5-AC-cAMP zavisnog puta (150). Shaik i saradnici su pokazali anti-inflamatorno dejstvo CDCA u tkivima sa prisutnim FXR, koje prvenstveno aktivira CDCA, sugerišući da je ovaj efekat postignut putem aktivacije anti-inflamatornih osobina samog FXR (151).

Naši rezultati su pokazali da obe žučne kiseline mogu da oslabe proizvodnju proinflammatoryh citokina IL-1 β , TNF- α , IL-6, GM-CSF i IFN- γ , indukovanu primjenom LPS-a, što sugeriše na njihov povoljan efekat u suzbijanju sistemske upale. Neke uočene razlike (supresija IFN- γ od strane CDCA, ili supresija IL-6 putem UDCA) mogu biti posljedica interindividualne varijabilnosti između grupa ili različitog afiniteta ovih žučnih kiselina prema FXR i TGR5

(152). UDCA i CDCA, kao strukturno različite žučne kiseline, mogu djelovati na različite receptore i signalne molekule u datoj imunoj ćeliji, pa stoga ishod može biti rezultat takmičenja između različitih receptora i generisanih signala (153). U ovom kontekstu, pokazalo se da CDCA inhibiše autofagiju mehanizmom zavisnim od FXR, dok UDCA stimuliše formiranje autofagozoma nezavisno od FXR i pojačava autofagični tok (154). Naši rezultati su pokazali da ni CDCA ni UDCA, kada se primjenjuju same, nemaju značajan uticaj na proizvodnju proinflamatornih citokina. Ovaj nalaz je od izuzetnog značaja, jer sugerije da ove žučne kiseline ne ometaju homeostazu imunološkog sistema u zdravim tkivima, niti uzrokuju nenamjerno pokretanje inflamatornih procesa. Odsustvo proinflamatornih efekata u normalnim uslovima dodatno podržava njihovu potencijalnu upotrebu kao terapijskih agenasa. Međutim, neophodno je daljnje istraživanje kako bi se u potpunosti razumjeli mehanizmi djelovanja ovih kiselina u različitim patološkim i fiziološkim uslovima.

Prisustvo LPS-a pokretanjem inflamatornog odgovora dovodi do značajnih promjena u metabolizmu glukoze. Hiperglikemija se obično otkriva kod bakterijskih infekcija i služi kao indikator nepovoljne kliničke prognoze (155). Žučne kiseline posjeduju svojstva slična hormonima u regulisanju metabolizma glukoze. Istraživanja su pokazala da je primjena UDCA rezultirala smanjenim nivoom glukoze, povišenim nivoom GLP-1 u serumu i ublažavanjem hiperinsulinemije (156). Regulacija metabolizma glukoze sa CDCA i UDCA se odvija putem FXR i TGR5. Signalizacija putem FXR/RXR podstiče toleranciju na glukozu i povećava osjetljivost na insulin (118), a putem TGR5 podstiče stvaranje cAMP-a i aktivira Epac put, što rezultira povećanim oslobađanjem GLP-1 (119).

Međutim, naši rezultati su pokazali da UDCA i CDCA ne utiču na nivoe glukoze kod pacova tretiranih LPS-om, a prema rezultatima najnovije kliničke studije, sprovedene u našem istraživačkom centru, primjena UDCA takođe nije dovela do značajnog smanjenja nivoa glukoze u krvi natašte kod pacijenata oboljelih od šećerne bolesti (157). Razlika u opaženim nivoima glukoze u našoj studiji sa UDCA i CDCA, u poređenju sa literaturom, mogla bi poticati iz nekoliko različitih faktora, kao što su razlike u eksperimentalnom dizajnu studije, doza i trajanje tretmana, vrijeme mjerenja nivoa glukoze u odnosu na primjenu UDCA i CDCA, a i prisustvo LPS-a možda može modulirati efekte UDCA i CDCA na nivo glukoze na drugačiji način nego u studijama bez LPS-a.

Sepsa je često povezana sa rbdomiolizom koja se može definisati kao patološki proces koji se manifestuje razaranjem skeletnih mišića, pri čemu dolazi do oslobađanja unutarćelijskih

komponenti mišićnog tkiva u ekstracelularni prostor. Ključni klinički indikator u razvoju rabdomiolize je povišenje nivoa CK (158).

U ovoj studiji, primjetili smo povećanje nivoa CK u LPS grupi, a ovo povećanje je ublaženo primjenom UDCA. Međutim, i sama UDCA, kao i CDCA, bez primjene LPS-a, su dovele do povećanja nivoa CK, što bi moglo biti posljedica odgovora mišića na primjenu navedenih žučnih kiselina, koje mogu uticati na mišićne ćelije (159) i dovesti do povećanja CK kao odgovor na promjene u mišićnom tkivu, što ne mora da ukazuje na prisustvo rabdomiolize. Pored toga, povećanje CK može biti povezano sa individualnom osetljivošću na UDCA i CDCA.

Serumski ALT, AST i LDH su najosetljiviji biohemijski markeri hepatične disfunkcije. U slučajevima oštećenja izazvanog LPS-om nekroza hepatocita dovodi do oslobađanja ovih enzima u krvotok (160). Prvi izvještaj o efikasnosti UDCA na biohemijske markere oštećenja jetre datira iz 1987. godine kada su Poupon i saradnici prijavili značajno poboljšanje ovih biohemijskih parametara kod pacijenata sa primarnim bilijarnim holangitisom, koji su primali UDCA tokom dvije godine. Ovi nalazi su kasnije potvrđeni u dvostruko slijepom ispitivanju (161).

Naši rezultati su pokazali značajno povećanje nivoa AST i LDH u grupi koja je tretirana LPS-om, što ukazuje na ozbiljno oštećenje tkiva usljed indukovane inflamacije i ćelijske nekroze. Međutim, u grupi koja je primala UDCA došlo je do smanjenja nivoa LDH. Ovo smanjenje aktivnosti LDH u prisustvu UDCA ukazuje na njenu sposobnost da stabilizuje ćelijske membrane i smanji ćelijsku smrt, čime doprinosi očuvanju tkivne funkcije u uslovima akutnog inflamatornog procesa.

Najvažniji srčani proteini koji se primenjuju u dijagnostici akutnog oštećenja miokarda uključuju troponin C (TnC), troponin I (TnI) i troponin T (TnT). Troponin I predstavlja ključnu proteinsku podjedinicu unutar srčanog mišića, koja, u saradnji sa troponinom C i T, formira kompleks odgovoran za regulaciju kontrakcije i relaksacije miokarda omogućavajući interakcije između aktina i miozina. Povišene koncentracije TnI specifično su indikativne za oštećenje miokarda, budući da se ovaj enzim oslobađa isključivo kao rezultat nekroze srčanih miocita. Osim u kontekstu srčane traume, povišeni nivoi TnI mogu se povezati i sa infektivnim procesima, čime se dodatno ističe njegova dijagnostička važnost u različitim patološkim stanjima (162). U sepsi često postoji povećan nivo srčanog TnI, čak i u odsustvu koronarne arterijske bolesti (163). Istraživanja su pokazala da povećan nivo TnI može identifikovati septičke pacijente sa povećanim rizikom od smrtnosti (164).

Naša studija je pokazala značajan porast nivoa TnI kod pacova tretiranih LPS-om, što ukazuje na ozbiljno oštećenje miokarda u uslovima endotoksemije. Primjena UDCA je ublažila efekte LPS-a na koncentraciju TnI, sugerišući da UDCA može pružiti zaštitni efekat na srčani mišić u ovakvim inflamatornim uslovima. Nasuprot tome, primjena CDCA nije rezultirala smanjenjem nivoa CK, LDH, niti TnI, što ukazuje na različite biološke efekte ovih žučnih kiselina u kontekstu LPS-om indukovano oštećenja tkiva. Obrazloženje ovih rezultata može se naći u strukturnom sastavu žučnih kiselina, gdje na citotoksičnost utiču njihovi specifični molekularni aranžmani. UDCA i CDCA su, naime, strukturno različite žučne kiseline. UDCA, koja nastaje dehidroksilacijom slobodne CDCA, pokazuje se kao manje toksična i potencijalno efikasnija u zaštiti tkiva u poređenju sa CDCA.

Homocistein je identifikovan kao proinflamatorno jedinjenje koje može stimulisati proizvodnju specifičnih citokina, potencijalno doprinoseći razvoju kardiovaskularnih bolesti (165). Povišeni nivoi Hcy u sepsi su povezani sa većom stopom mortaliteta zbog svog proinflamatornog i prokoagulantnog dejstva. Povišena koncentracija Hcy ima značajnu ulogu i u indukciji oksidativnog stresa, s obzirom na to da visok nivo Hcy može stimulisati proizvodnju ROS i RNS. Ova produkcija reaktivnih molekula dodatno doprinosi oksidativnim procesima, što može rezultirati oštećenjem ćelijskih struktura i disfunkcijom različitih bioloških sistema (166). Nedavna istraživanja su pokazala da UDCA ima povoljan efekat na dislipidemiju i rizik od ateroskleroze zbog antioksidativnih svojstava (167). UDCA inhibiše produkte lipidne peroksidacije i sprječava oksidativni stres izazvan putem ROS kroz aktivaciju PI3K/Akt/Nrf2 puta u hepatocitima (168).

Naše istraživanje je pokazalo da je LPS doveo do povećanja nivoa Hcy, a to povećanje su spriječile UDCA i CDCA, sugerišući time da ove dvije žučne kiseline imaju potencijal da modulišu metaboličke reakcije povezane sa inflamatornim procesom, pružajući uvid u njihovu ulogu u regulaciji Hcy u kontekstu endotoksinemije.

Žučne kiseline, zbog osobina sličnih hormonima, učestvuju u regulisanju metabolizma lipida. UDCA je poznata po svom potencijalu da ublaži dislipidemiju. Sistematski pregled i meta-analiza randomiziranih placebo-kontrolisanih ispitivanja, učinjenih sa ciljem da se ispita efikasnost UDCA na snižavanje lipida, je pokazala značajno smanjenje TC primjenom UDCA, ali LDL, TG i HDL se nisu značajno mijenjali (169). Takođe je primjećeno smanjene nivoa glukoze, TC i masnih kiselina kod svinja tretiranih sa CDCA, što implicira da tretman sa CDCA može dovesti do značajnog poboljšanja lipolize i korištenja glukoze. Slični rezultati su primjećeni i kod gojaznih miševa, gdje je suplementacija sa CDCA smanjila netoleranciju

glukoze i dislipidemiju izazivanjem termogeneze posredovane razdvojenim proteinom 1 (*Uncoupling protein 1,UCPI*) u smeđem masnom tkivu (170).

U našem istraživanju lipidni profil je procenjen analizom nivoa TC, HDL, LDL i TG. Pacovi tretirani LPS-om su pokazali povišene nivoe TC, LDL i TG i ovi nalazi su u skladu sa rezultatima Brigatta i saradnika (169), osim povećanja koncentracije HDL. Naši rezultati su pokazali da su UDCA i CDCA ispoljile značajan protektivni efekat na lipidni profil u endotoksemiji. Ovi rezultati su ukazali na ulogu ovih žučnih kiselina u očuvanju homeostaze metabolizma lipida u uslovima inflamatornog stanja izazvanog LPS-om.

Endotelne ćelije takođe mogu imati različite imunološke funkcije i igrati ključnu ulogu u sistemskom odgovoru na bakterijske infekcije, radeći na ograničavanju njihovog širenja. Tokom sepse, endotelne ćelije se transformišu u proapoptotski, proinflamatorni, proadhezivni i prokoagulantni fenotip. Pored toga, oštećenje glikokaliksa i poremećen vaskularni tonus remete mikrocirkulacijski protok krvi, što dovodi do oštećenja organa i potencijala za razvoj MODS-a (171). LPS izaziva apoptozu i disfunkciju endotelnih ćelija. TLR4, koji prepoznaje LPS, izražavaju i endotelne ćelije. Istovremeno, LPS indukcijom lučenja proinflamatornih citokina takođe uzrokuje disfunkciju endotelnih ćelija (172, 173). Studija Cai i saradnika je sugerisala da Angiopoetin-1 (*Angiopoietin-1, Ang-1*), esencijalni regulator vaskularnog razvoja, štiti endotelne ćelije od apoptoze u endotoksemiji indukovanoj LPS-om. Iako Ang-1 mogu regulisati NF- κ B, PI3K/Akt i p38 MAPK signalni putevi njihova studija je sugerisala da Ang1/NF- κ B put, regulisan proinflamatornim citokinima, ima ključnu ulogu u nastanku apoptoze i disfunkcije kultivisanih endotelnih ćelija (174). VCAM-1 i ICAM-1 su uključeni u ćelijske interakcije tokom upalnog odgovora i kao odgovor na povećanje TNF- α i IL-1 β , VCAM-1 i ICAM-1 se značajno aktiviraju (175). Ispitivan je i uticaj žučnih kiselina na vaskularni tonus, na različitim krvnim sudovima. Nakajima i saradnici su pokazali da žučne kiseline, u zavisnosti od njihove vrste i koncentracije, povećavaju koncentraciju Ca²⁺ i time proizvodnju NO u vaskularnim endotelnim ćelijama (176). Pokazano je i da CDCA, DCA i LCA mogu promovisati aktivaciju endotela povećanjem ekspresije ICAM-1 i VCAM-1 kroz stimulaciju NF- κ B i p38MAPK signalnih puteva, putem indukcije ROS (177). Rezultati eksperimentalne studije na pacovima sa akutnim oštećenjem pluća, izazvanim masnom embolijom, su pokazali da predtretman sa UDCA može značajno da ublaži ekspresiju adhezivnih molekula ICAM-1 i VCAM-1 u plućnom mikrovaskularnom endotelu (175). U endotelnim ćelijama, UDCA suzbija endotelnu disfunkciju inhibicijom stresa endoplazmatskog retikuluma, smanjujući ekspresiju receptora za krajnje proizvode napredne

glikacije, prigušujući inflamatorni odgovor (uključujući aktivaciju NF- κ B) i potiskujući proizvodnju ROS. Ovi efekti su posebno važni u hiperglikemijskim uslovima, koji su prisutni i kod sepse (178).

Rezultati sprovedene studije su pokazali da obe ispitivane žučne kiseline značajno doprinose ublažavanju endotelne disfunkcije u endotoksemiji izazvanoj LPS-om, što se ogleda u smanjenju nivoa rastvorljivog ICAM-1. Ova zapažanja sugerišu da žučne kiseline mogu imati protektivnu ulogu u modulaciji inflamatornih procesa i na nivou endotela.

Prisustvo oksidativnog stresa u endotoksemiji izazvanoj LPS-om je već dokumentovano (179,180). Rezultati više studija su pokazali da UDCA sprječava stvaranje ROS, a njen antioksidativni mehanizam se ogleda u smanjenju nivoa peroksidacije lipida kroz aktivaciju aktivnosti antioksidativnih enzima u ćelijama (181). Istraživanja su pokazala da i CDCA dovodi do aktivacije Nrf2 antioksidativnih puteva, što doprinosi smanjenju oksidativnog stresa (182). CDCA tretman, u odgovarajućoj koncentraciji, smanjuje proizvodnju ROS i nivo MDA, povećava mitohondrijalni membranski potencijal i aktivnost antioksidativnih enzima (170).

Naši rezultati ukazuju na značajne antioksidativne efekte UDCA i CDCA u endotoksemiji, indukovanoj primjenom LPS-a. Konkretno, ove žučne kiseline su značajno smanjile nivo H_2O_2 , dok je samo UDCA smanjila nivo O_2^- , što je pokazatelj njihove sposobnosti da ublaže oksidativni stres na ćelijskom nivou. Pored toga, primjena UDCA i CDCA je dovela do povećanja aktivnosti CAT, jednog od ključnih enzima u neutralizaciji H_2O_2 , kao i do povećanja nivoa GSH, glavnog endogenog antioksidansa. Ovi nalazi sugerišu da UDCA i CDCA ne samo da smanjuju proizvodnju štetnih oksidativnih molekula, već i pojačavaju endogene antioksidativne odbrambene mehanizme. Ovi rezultati su od velikog značaja jer ukazuju na ulogu ovih žučnih kiselina u modulaciji oksidativnog stresa, koji je često centralni patofiziološki mehanizam u raznim inflamatornim bolestima.

Hepatomegalija, koju često karakteriše povećanje težine jetre, je uobičajeno zapažanje tokom sepse i može se pripisati različitim patofiziološkim mehanizmima. Odnos težine jetre prema tjelesnoj težini služi kao indikator hepatomegalije i funkcioniše kao marker bolesti jetre (183). Anti-inflamatorna i antioksidativna svojstva UDCA imaju ulogu u očuvanju funkcije jetre, smanjenju hepatomegalije i poboljšanju ukupne prognoze sepse (161).

Rezultati naše studije su ukazali na značajno povećanje odnosa TJ i TJ/TT u grupi pacova tretiranoj LPS-om. Ovaj nalaz sugeriše da je izloženost LPS-u izazvala hepatomegaliju, koja je vjerovatno posljedica inflamatornih i oksidativnih procesa indukovanih endotoksinom.

Međutim, primjena UDCA i CDCA dovela je do smanjenja odnosa TJ/TT, što ukazuje na njihov zaštitni efekat protiv LPS-om izazvanog povećanja jetre. CDCA je pokazala dodatnu efikasnost smanjujući apsolutnu težinu jetre, čime je direktno spriječila hepatomegaliju izazvanu LPS-om.

Patohistološka analiza tkiva jetre pokazala je očuvanu, homogenu strukturu u kontrolnoj grupi pacova, bez znakova oštećenja ili odstupanja u arhitekturi jetrenih lobula. Nasuprot tome, u grupi tretiranoj LPS-om primjećena su značajna patološka oštećenja jetre, uključujući izražene promjene u strukturi hepatocita i sinusoida, što ukazuje na ozbiljnu inflamatornu reakciju i oštećenje tkiva. Međutim, primjena UDCA i CDCA je značajno ublažila ove patološke efekte izazvane LPS-om. Histološka analiza u grupama koje su tretirane ovim žučnim kiselinama pokazala je značajno smanjenje patohistološkog skora zasnovanog na težini oštećenja tkiva jetre. Ovi nalazi jasno ukazuju na protektivni efekat UDCA i CDCA u spriječavanju i ublažavanju oštećenja jetre izazvanog endotoksinom.

Sve je izraženije prepoznavanje jetre kao organa sa značajnim imunološkim funkcijama, gdje urođeni imuni sistem jetre zauzima centralno mesto u odbrani organizma od infekcija i sepse. Jetra, kao ključna barijera u spriječavanju širenja bakterija, aktivira različite tipove ćelija u okviru ove odbrane, uključujući prirodne ćelije ubice, CD4 i CD8 T ćelije, neutrofile, monocite, Kupferove ćelije i hepatocite. Posebno je značajna uloga hepatocita u iniciranju i modulisanju urođenog imunološkog odgovora na različite stimulse, pri čemu se ovaj odgovor smatra temeljnim elementom urođenog imuniteta jetre (184).

Patofiziologija oštećenja jetre u endotoksemiji je povezana sa nekoliko međusobno povezanih inflamatornih i oksidativnih puteva, uključujući aktivaciju Kupferovih ćelija, oslobađanje citokina, proizvodnju ROS, povećanje nivoa adhezionih molekula i infiltraciju neutrofila, što na kraju dovodi do oštećenja hepatocita (124). Značajna uloga NF- κ B u patofiziologiji oštećenja jetre izazvanog endotoksinom dokazana je i u našoj sprovedenoj studiji, što je u skladu sa rezultatima drugih studija (184). Povećan procenat NF- κ B pozitivnih hepatocita ide u prilog tome da je NF- κ B dio signalnog puta kojim LPS izaziva oštećenje jetre (18).

Studije su pokazale da primjena UDCA ima potencijal da inhibiše ekspresiju NF- κ B, putem ometanja njegove aktivacije i ublažavanjem fosforilacije ERK, JNK i p38 signalnih puteva (141, 142), što je u skladu sa dobijenim rezultatima naše studije. Naime, naši rezultati su jasno pokazali da primjena UDCA, ali i CDCA, dovodi do značajnog smanjenja broja hepatocita pozitivnih na NF- κ B kod pacova sa akutnim oštećenjem jetre izazvanim LPS-om. Ovi nalazi

ukazuju da ove žučne kiseline mogu efikasno suzbiti oštećenje jetre izazvano inflamatornim stimulusom. Posebno je zanimljivo što rezultati upućuju na to da je NF- κ B ključna meta dejstva UDCA i CDCA, s obzirom na njegovu centralnu ulogu u regulaciji inflamatornih i apoptotskih procesa. Inhibicija ovog faktora transkripcije mogla bi biti mehanizam kojim ove kiseline ostvaruju svoj povoljan efekat u zaštiti jetrenog tkiva. Iako NF- κ B predstavlja centralnu metu njihovog delovanja, nije isključeno da UDCA i CDCA utiču i na druge signalne puteve uključene u ćelijski odgovor na stres i inflamaciju, kao što su Akt, ERK, JNK i p38 (141). Ovi signalni putevi poznati su po svojoj ulozi u regulaciji ćelijskog preživljavanja, proliferacije i odgovora na oksidativni stres, te bi njihova potencijalna uključenost mogla dodatno objasniti kompleksne mehanizme zaštitnog delovanja ovih žučnih kiselina.

Izveštaji o širokom spektru zaštitnih efekata UDCA, koja je prepoznata kao najsigurnija među žučnim kiselinama, su pokazani i u akutnom oštećenju pluća. Istraživanje koje su sprovedli Niu i saradnici je pokazano da je predtretman sa UDCA ublažio patološke i bihemijske promjene u akutnom oštećenju pluća uzrokovanom masnom embolijom (175). Takođe, pokazano je da UDCA ima sposobnost da modulira imuni odgovor i transport epitelnih jona (185). Nedavno istraživanje je otkrilo da UDCA stimuliše klirens alveolarne tečnosti u slučaju plućnog edema izazvanog LPS-om, putem ALX/cAMP/PI3K puta (186). Rezultati studije He Y i saradnika su pokazali da UDCA efikasno inhibiše plućni edem, infiltraciju inflamatornih ćelija, proizvodnju proinflamatornih citokina i oksidativni stres (187). Retrospektivna studija Khalida i saradnika je pokazala da upotreba UDCA kod kritično bolesnih odraslih pacijenata sa sepsom nije dovela do poboljšanja težine ili izlječenja, ali postojala je veća vjerovatnoća da pacijentima koji su primili UDCA neće biti potrebna mehanička ventilacija trećeg dana od prijema u intenzivnu njegu (188). Kako bi se istražila efikasnost CDCA u upali disajnih puteva, korišten je eksperimentalni model akutne astme. Rezultati ove studije su pokazali da primjena CDCA u kombinaciji sa FXR u plućnom tkivu smanjuje ozbiljnost alergijske bolesti disajnih puteva (189). Istraživanjem efekata različitih žučnih kiselina na oštećenje epitela disajnih puteva, pokazano je da je održivost ćelija zavisila od koncentracije žučnih kiselina, pri čemu je bila potrebna znatno viša koncentracija CDCA u poređenju sa LCA da bi se indukovala smrt ćelija (190).

Analiza pro i antioksidativnih markera u tečnosti iz pluća može biti osetljiviji pokazatelj respiratornih bolesti u poređenju sa analizom krvi (191). Studija iz 2017. godine, koju su sprovedli Jarikre i saradnici, ispitala je parametre oksidativnog stresa u BALF-u kod zdravih i pneumoničnih goveda. Njihovi rezultati su pokazali značajan porast nivoa MDA, H₂O₂ i MPO

u supernatantu BALF-a pneumoničnih koza, uz istovremeno smanjenje nivoa GSH i aktivnosti SOD (192). Ovi rezultati su u skladu sa našim nalazima, gde je LPS značajno povećao nivo prooksidativnih markera NO i TBARS u BALF-u. Paralelno sa tim, primjećeno je smanjenje aktivnosti CAT, kao i nivoa GSH u BALF-u, što sugerše intenzivno oksidativno oštećenje plućnog tkiva u ovom modelu. Primjena UDCA i CDCA značajno je smanjila nivo prooksidativnih markera NO i TBARS, dok je istovremeno dovela do povećanja nivoa GSH i aktivnosti CAT. Ovi rezultati ukazuju na izražene antioksidativne efekte UDCA i CDCA u kontekstu akutnog oštećenja pluća uzrokovanog LPS-om. Međutim, nijedna od žučnih kiselina nije imala značajan uticaj na aktivnost SOD u BALF-u, što se može djelimično objasniti izazovima u kvantifikaciji biomarkera u BALF-u. Naime, nedostatak pouzdanih markera za razblaživanje fiziološkog ispiranja može da doprinese varijabilnosti u mjerenjima, naročito u studijama sa ograničenim uzorcima (191). Ova varijabilnost može otežati precizno ocjenjivanje efekata na SOD, kao i interpretaciju rezultata u kontekstu antioksidativne aktivnosti.

Histološka analiza plućnog tkiva u našem istraživanju je pokazala značajno oštećenje pluća kod pacova tretiranih isključivo LPS-om. Ova oštećenja uključivala su izraženo intersticijalno krvarenje, zadebljanje interalveolarnih septi, vaskularnu kongestiju i perivaskularni inflamatorni infiltrat. Ovakvi dobijeni nalazi su u skladu sa prethodnim istraživanjima, koja su takođe ukazala na ozbiljan stepen oštećenja pluća usljed primjene LPS-a (193). Primjena UDCA i CDCA pokazala je značajnu sposobnost ovih žučnih kiselina da ublaže oštećenje pluća, što se vidjelo kroz smanjenje patohistološkog skora zasnovanog na težini oštećenja plućnog tkiva. Ovi rezultati su ukazali potencijalne zaštitne efekte UDCA i CDCA u modelu akutnog oštećenja pluća izazvanog inflamatornim i oksidativnim procesima povezanim sa LPS-om.

Već je istaknuto da je LPS stimulator MAPK signalnih puteva i da NF- κ B služi kao ključni regulator u proinflamatornim signalnim putevima (18).

Naši rezultati su još jednom ukazali na citoprotektivne efekte UDCA i CDCA, kroz njihovu sposobnost da smanje povećanu ekspresiju i vrijednost optičke gustine NF- κ B u plućnom tkivu, indukovanu primjenom LPS-a. Ova redukcija u optičkoj gustini NF- κ B, koja predstavlja indikator nivoa aktivnosti ovog ključnog transkripcijskog faktora u inflamatornim procesima, sugerše da ove žučne kiseline mogu modulirati molekularne puteve povezane sa inflamacijom, smanjujući time stepen akutnog oštećenja pluća izazvanog LPS-om.

Hidrofobnost žučnih kiselina (LCA>DCA>CDCA>CA>UDCA), uslovljena različitom raspodjelom njihovih hidroksilnih grupa, igra ključnu ulogu u određivanju njihove biološke

aktivnosti. Iako postoji tijesna veza između hidrofobnosti i citotoksičnosti žučnih kiselina u pogledu indukcije apoptoze, ova korelacija nije uvijek konzistentna. Pojava apoptoze zavisi od koncentracije žučnih kiselina ili njihovog konjugacijskog statusa (194). Rezultati *in vivo* i *in vitro* eksperimenata su ukazali da različiti oblici konjugata žučnih kiselina imaju različite uticaje na apoptozu ćelija jetre. Npr. glikohenodeoksiholna kiselina (*Glycochenodeoxycholic acid, GCDCA*) je pokazala proapoptotski efekat na hepatocite, a taurohenodeoksiholna (*Taurochenodeoxycholic acid, TCDCA*) nije, dok je UDCA pokazala antiapoptotski efekat. Stoga, žučne kiseline održavaju ravnotežu između receptora ćelijske smrti i citoprotektivnih signalnih puteva, pri čemu se ravnoteža ili njen pomak na jednu stranu razlikuju u zavisnosti od specifične vrste žučne kiseline. U vezi sa tim, pokazano je da žučne kiseline imaju i sposobnost aktivacije signala za preživljavanje ćelije i inhibicije citotoksičnosti (195). Utvrđeno je da je inhibicija apoptoze ćelija jedan od osnovnih protektivnih mehanizama UDCA, a njeni antiapoptotski efekti su pokazani u *in vivo* i *in vitro* uslovima. UDCA je pokazala antiapoptotsko dejstvo u Amyloid- β indukovanim neuronima inhibicijom proizvodnje proinflamatornih citokina i NO putem deaktivacije NF- κ B (148). Istraživanja u drugim ćelijskim linijama su sugerisala da UDCA može ciljati na domen vezivanja glukokortikoidnog receptora (GR), kako bi njegovom aktivacijom suprimirala aktivnosti NF- κ B, čime je sugerisano da UDCA može regulisati različite apoptotske puteve i modulacijom aktivnosti GR (196). UDCA ima ulogu u modulaciji unutrašnjeg mitohondrijalnog puta apoptoze u različitim tipovima ćelija, ali i spoljašnjeg puta apoptoze. UDCA spriječava translokaciju BAX, oslobađanje citohroma c, aktivaciju kaspaza i posljedičnu razgradnju unutarćelijskih komponenti. U kulturi hepatocita miša u kokulturi sa fibroblastima koji ekspresiraju Fas ligand, UDCA je takođe pokazala potencijal da modulira i spoljašnji put apoptoze, preko receptora ćelijske smrti. Protektivni efekat vjerovatno nije u vezi sa smanjenjem oligomerizacije Fas-a, nego u vezi sa direktnim efektima na nivou mitohondrijalne membrane. Dokazana je modulacija apoptoze sa tauro-UDCA putem inhibicije transkripcionih faktora AP-1, E2F-1 i p53 nezavisno od efekta na mitohondrije i/ili kaspaze (197).

CDCA je hidrofobnija žučna kiselina od UDCA. Pokazano je da hidrofobne žučne kiseline izazivaju apoptozu (198). Veći broj istraživanja je sugerisao o proapoptotskim efektima CDCA podsticanjem stvaranja ROS, koji zatim aktiviraju enzime ćelijske membrane; ili promovišu apoptozu ćelija povećavajući ekspresiju p53 putem signalnog puta integrina $\alpha 5\beta 1$ (199). Ali postoje i istraživanja koja su ukazala na antiapoptotsko dejstvo CDCA. Kod ljudi, CDCA se povezuje sa glicinom ili taurinom, a pokazano je da TCDCA u hepatocitima pacova djeluje

antiapoptotski aktivirajući PI3 kinazu, koja je ključni signalni put preživljavanja. Ovo je sugerisalo da netoksične, ali hidrofobne žučne kiseline, ne pokreću apoptozu, jer aktiviraju put preživljavanja. Aktivacija NF- κ B je bitna u inhibiranju apoptoze. U svom istraživanju Schoemaker i saradnici su pokazali da su anti-apoptotski gen A1/Bfl-1 i inhibitori proteina apoptoze (*Inhibitors of apoptosis protein, cIAP*) visoko eksprimirani putem aktivacije NF- κ B. IAP porodica, (koja uključuje *cIAP-1*, *cIAP-2*, *XIAP* i *Survivin*), direktno vezuje i potiskuje aktivaciju kaspaza kao što su kaspaza 3 i 9, koje su ključni izvršiooci apoptoze, što je ukazalo na to da ekspresija IAP pod kontrolom NF- κ B ima jednu od ključnih uloga u antiapoptotskom putu CDCA. Istraživanja su pokazala da CDCA indukuje ekspresiju cIAP-1 u ljudskim hepatocitima posredstvom protein kinaza C i p38MAPK puta (200). U istraživanju koje je sproveo Xu sa saradnicima, pokazano je da CDCA inhibiše apoptozu i unapređuje funkciju mitohondrija putem povećanja membranskog potencijala i antioksidativnog kapaciteta smanjujući nivo intracelularnih ROS i MDA u ćelijama (201).

Rezultati imunohistohemijske analize našeg istraživanja ukazuju na to da primjena UDCA i CDCA značajno ublažava apoptozu plućnih ćelija kod pacova tretiranih LPS-om. Konkretno, ove žučne kiseline su smanjile vrijednost optičke gustine proapoptotskih proteina kaspaze 3 i BAX, dok su povećale vrijednost optičke gustine antiapoptotskog proteina BCL-2 u alveolarnom parenhimu. Ovi nalazi sugerišu da UDCA i CDCA imaju značajnu ulogu u zaštiti plućnog tkiva od akutnog oštećenja izazvanog LPS-om i kroz smanjenje apoptotskih procesa. Smanjenje aktivnosti proapoptotskih proteina i povećanje nivoa antiapoptotskog proteina ukazuje na to da ove žučne kiseline mogu da doprinesu očuvanju ćelijskog integriteta u endotoksemiji. Dalje, rezultati opet sugerišu da ovi efekti UDCA i CDCA mogu biti povezani sa smanjenjem aktivnosti NF- κ B i JNK signalnih puteva, koji imaju centralnu ulogu u patofiziologiji inflamacije i apoptoze.

Rezultati eksperimenata na pacovima u kojima je proučavana uloga AQP1 i AQP5 u oštećenju pluća izazvanom primjenom LPS-a su ukazali na smanjenu regulaciju oba ova AQP, što dovodi do povećanja inflamatornih faktora i apoptoze ćelija (83). Smanjena regulacija AQP5 nakon primarnog oštećenja endotela kapilara i alveolarnog epitela dovodi do povećane vaskularne permeabilnosti i ćelijske infiltracije (202). U vezi sa tim, ispitan je efekat i mehanizam dejstva različitih supstanci na ekspresiju AQP u oštećenju pluća, u različitim modelima sepse. Tanshinol, vodenasti polifenol, je povećao ekspresiju AQP5 inhibiranjem TNF- α i IL-6 u plućnom tkivu pacova u modelu sepse izazvane podvezivanjem i punkcijom slijepog crijeva (203). Fasudil, selektivni inhibitor Rho kinaze, je povećao ekspresiju AQP5

ublažavajući LPS-om indukovano akutno oštećenje pluća, putem smanjenja ekspresije Rho-asocirane protein kinaze-2 (*Rho-associated protein kinase-2, Rock2*), NF- κ B i ICAM-1, zajedno sa smanjenim nivoima IL-6, infiltracijom neutrofila i aktivnošću enzima MPO (204). Studije Ba i saradnika objasnile su zaštitnu ulogu Lipoksina A4 putem povećanja ekspresije AQP5 u mišijem modelu akutnog oštećenja pluća, izazvanog LPS-om, smanjenjem nivoa TNF- α i IL-6 u BALF-u, niskom aktivnošću MPO i smanjenjem nivoa fosforilacije p38 i JNK signalnih puteva (205). TNF- α je smanjio ekspresiju AQP5 u kultivisanim mišijim epitelnim ćelijama pluća putem aktivacije TNFR1 i translokacije NF- κ B, uz interakciju sa vezivnim mjestima na genu za AQP5 (206). Smanjenje ekspresije AQP1 u LPS-om indukovanim ćelijama RAW264.7 je dovelo do povećanog lučenja inflamatornih faktora, uključujući inhibitore NO sintaze, TNF- α i IL-8 (207).

Veza između žučnih kiselina i AQP nije potpuno razjašnjena, ali postoje rezultati studija koji sugerišu da određene žučne kiseline mogu uticati na ekspresiju AQP, budući da su oni zbog svoje osnovne uloge u prometu vode ključni za formiranje žuči, jer voda čini 95% žuči. U tom kontekstu, ispitivani su efekti žučnih kiselina na AQP u holestazi, ali funkcija i regulacija AQP u holestazi nisu potpuno jasne. Lehmann i saradnici su otkrili da LPS smanjuje ekspresiju AQP8 u hepatocitima kod pacova, što pogoršava holestazu. Nedavna istraživanja pokazala su da je ekspresija AQP8 i AQP9 smanjena u jetri pacova sa ligiranim bilijarnim kanalima, dok je povećana ekspresija AQP1 smanjila holestazu. Kod pacijenata sa opstruktivnom holestazom, ekspresija AQP10 je značajno smanjena i negativno povezana sa nivoom ukupnih žučnih kiselina u serumu. Povećana ekspresija AQP10 smanjila je oštećenje jetre i nakupljanje žučnih kiselina kod pacova sa ligiranim bilijarnim kanalima. Konjugovane žučne kiseline (kao TCA) i inflamatorni TNF- α smanjivali su ekspresiju AQP10. Takođe, NF κ B p65/p50 se direktno vezao za promotor AQP10 i smanjio njegovu aktivnost u jetri pacijenata sa opstruktivnom holestazom (208).

Pokazano je i da određene žučne kiseline mogu uticati na ekspresiju AQP u debelom crijevu, ali uticaj žučnih kiselina na regulaciju AQP u crijevima takođe nije potpuno razjašnjen. Istraživano je kako prirodne žučne kiseline utiču na ekspresiju AQP u ljudskim epitelnim ćelijama debelog crijeva, i pokazano je da je primjena natrijum-deoksiholata povećala ekspresiju AQP3, dok su natrijum-ursodeoksiholat i agonist FXR GW4064 povećali ekspresiju AQP8 (209). Pretpostavlja se da različiti AQP postoje u epitelnim ćelijama debelog crijeva i da se njihova prisutnost mijenja u animalnom modelu proliva izazvanog žučnim kiselinama.

Rezultati ukazuju da prekomjerni nivoi žučnih kiselina mogu uticati na ekspresiju AQP3, 7 i 8, što implicira njihovu ulogu u patofiziologiji proлива uzrokovanog žučnim kiselinama (210).

Uloga i funkcija žučnih kiselina na ekspresiju AQP kod LPS-om izazvanog oštećenja pluća još nije dokumentovana.

Nasi rezultati su pokazali značajno smanjenje vrijednosti optičke gustine AQP1 i AQP5 u plućima pacova tretiranih LPS-om. Ovi rezultati su u skladu sa drugim istraživanjima (94, 97) i sugerišu da je tokom akutnog oštećenja pluća poremećena sinteza ovih AQP. U okviru ove studije, ćelije alveolarnog parenhima su pokazale značajne apoptotske promjene usljed tretmana sa LPS-om, a čini se da je apoptoza ovih ćelija uticala na sintezu akvaporina. Stoga, smanjena ekspresija AQP1 i AQP5 bi mogla dovesti do poremećaja u transportu vode iz plućnih mikrovaskularnih i alveolarnih epitelnih ćelija, što bi ometalo promet tečnosti u okolnim tkivima i klirens alveolarne tečnosti, rezultirajući pogoršanjem oštećenja pluća kod pacova tretiranih sa LPS-om.

Našim istraživanjem je prvi put pokazano da primjena UDCA i CDCA rezultira značajnim povećanjem ekspresije i vrijednosti optičke gustine AQP1 i AQP5 u alveolarnom parenhimu pacova tretiranih LPS-om. Povećanje ekspresije ovih akvaporina može indukovati poboljšanje u funkcionalnosti alveolarne barijere i potencijalnu zaštitu od razvoja edema pluća, a naši rezultati sugerišu da UDCA i CDCA, povećanjem ekspresije ovih akvaporina, mogu imati modulirajući efekat na homeostazu tečnosti i pozitivno uticati na regulaciju vodenog balansa u plućnom tkivu i funkcionalne kapacitete alveola tokom akutnog oštećenja izazvanog LPS-om. Uzimajući u obzir rezultate našeg nedavnog istraživanja, koje je pokazalo da UDCA i CDCA smanjuju ekspresiju NF- κ B u jetri i i nivo proinflammatoryh citokina u endotoksemiji (211), NF- κ B bi mogao biti glavna meta povoljnog efekta ovih žučnih kiselina i na ekspresiju AQP1 i AQP5 u akutnom oštećenju pluća izazvanog LPS-om. Međutim, neophodna su dalja istraživanja kako bi se razjasnili tačni mehanizmi kroz koje ove žučne kiseline utiču na ekspresiju akvaporina i njihovu potencijalnu kliničku primjenu.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata eksperimentalne studije na pacovima mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Primjena UDCA i CDCA ima sveobuhvatan zaštitni potencijal u različitim aspektima endotoksemije i akutnog oštećenja jetre i pluća izazvanih LPS-om.
2. UDCA i CDCA su pokazale anti-inflamatorne, antioksidativne i antiapoptotske efekte, kao i sposobnost regulacije ekspresije ključnih proteina tokom endotoksemije.
 - **Anti-inflamatorni efekti:** UDCA i CDCA pokazuju značajan potencijal u modulaciji inflamatornog odgovora, smanjujući lučenje proinflamatornih citokina, što doprinosi ublažavanju inflamatorne reakcije u jetri i plućima tokom endotoksemije.
 - **Ublažavanje endotelne disfunkcije:** UDCA i CDCA ublažavaju endotelnu disfunkciju, što može značajno doprinijeti očuvanju vaskularnog integriteta u endotoksemiji.
 - **Antioksidativni efekti:** UDCA i CDCA smanjuju oksidativni stres kroz redukciju prooksidativnih markera i povećanje antioksidativne zaštite u krvi i BALF-u, ukazujući na njihovu ulogu u zaštiti organizma od oksidativnog oštećenja u endotoksemiji i akutnom oštećenju pluća izazvanim LPS-om.
 - **Antiapoptotski efekti:** UDCA i CDCA samnjuju apoptozu ćelija pluća kroz utišavanje ekspresije transkripcionog faktora NF- κ B, povećanjem ekspresije antiapoptotskih i smanjenjem ekspresije proapoptotskih proteina, što doprinosi očuvanju ćelijskog integriteta tokom akutnog oštećenja izazvanog LPS-om.
 - **Regulacija ekspresije akvaporina:** UDCA i CDCA povećavaju ekspresiju akvaporina 1 i 5 u plućima, poboljšavajući homeostazu tečnosti u plućnom tkivu tokom akutnog oštećenja izazvanog LPS-om.

8. LITERATURA

1. Shokrizadeh H, Babaei H, Imani M, Kheirandish R. Short-and long-term effects of lipopolysaccharide-induced endotoxemia on mice ovarian tissue: Histomorphometrical evaluation. *Vet Arh.* 2019;89(5):669-682.
2. Mohammad S, Thiemermann C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Front Immunol.* 2021;11:594150.
3. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker H V., Cho RJ, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature.* 2005;437(7061):1032-1037.
4. Jang JH, Shin HW, Lee JM, Lee HW, Kim EC, Park SH. An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:794143.
5. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;5:461.
6. Kuzmich NN, Sivak K V, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines (Basel).* 2017;5(4):34.
7. Oh SJ, Lee JK, Shin OS. Aging and the immune system: The impact of immunosenescence on viral infection, immunity and vaccine immunogenicity. *Immune Netw.* 2019;19(6).
8. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023.
9. Buchholz BM, Billiar TR, Bauer AJ. Dominant role of the MyD88-dependent signaling pathway in mediating early endotoxin-induced murine ileus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299(2):G531-538.
10. Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, Kellie S, Kobe B. TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *J Leukoc Biol.* 2016;100(1):27-45.
11. Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis.* 2020;8(3):287-297.

12. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a001651.
13. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4+ T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-489.
14. Oh H, Ghosh S. NF-κB: Roles and regulation in different CD4+ T-cell subsets. *Immunol Rev.* 2013;252(1):41-51.
15. Yu M, Zhou H, Zhao J, Xiao N, Roychowdhury S, Schmitt D, et al. MyD88-dependent interplay between myeloid and endothelial cells in the initiation and progression of obesity-associated inflammatory diseases. *J Exp Med.* 2014;211(5):887-907.
16. Tegowski M, Baldwin A. Noncanonical NF-κB in cancer. *Biomedicines.* 2018;6(2):66.
17. Catorce MN, Gevorkian G. LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(2):155-164.
18. De Jong HK, Van Der Poll T, Wiersinga WJ. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J Innate Immun.* 2010;2(5):422-430.
19. Asim M, Amin F, El-Menyar A. Multiple organ dysfunction syndrome: Contemporary insights on the clinicopathological spectrum. *Qatar Med J.* 2020;2020(1):22.
20. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997;112(1):235-243.
21. Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N Engl J Med.* 2015;372(17):1629-1638.
22. Xaus J, Nica Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Ló Pez-Soriano F, Argilé JM, et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood.* 2000;95(12):3823-3831.
23. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011;117(14):3720-3732.
24. Wang KY, Yu GF, Zhang ZY, Huang Q, Dong XQ. Plasma high-mobility group box 1 levels and prediction of outcome in patients with traumatic brain injury. *Clin Chim Acta.* 2012;413(21-22):1737-1741.
25. Ogura H, Gando S, Iba T, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, et al. SIRS-associated coagulopathy and organ dysfunction in critically ill patients with thrombocytopenia. *Shock.* 2007;28(4):411-417.

26. Amaral JD, Viana RJ, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CM. Bile acids: Regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res.* 2009;50(9):1721-1734.
27. Jan R, Chaudhry GE. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019;9(2):205-218.
28. Sangaran PG, Ibrahim ZA, Chik Z, Mohamed Z, Ahmadiani A. LPS Preconditioning Attenuates Apoptosis Mechanism by Inhibiting NF- κ B and Caspase-3 Activity: TLR4 Pre-activation in the Signaling Pathway of LPS-Induced Neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2021;58(5):2407-2422.
29. Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell.* 2011;21(1):92-101.
30. Diepstraten ST, Young S, La Marca JE, Wang Z, Kluck RM, Strasser A, et al. Lymphoma cells lacking pro-apoptotic BAX are highly resistant to BH3-mimetics targeting pro-survival MCL-1 but retain sensitivity to conventional DNA-damaging drugs. *Cell Death Differ.* 2023;30(4):1005-1017.
31. Opferman JT, Kothari A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):37-45.
32. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013;41(2):580-637.
33. Levi M, Schultz M. Coagulopathy and platelet disorders in critically ill patients. *Minerva Anesthesiol.* 2010;76(10):851-859.
34. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: A review. *Crit Care.* 2010;14(1):R15.
35. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):776-787.
36. Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood coagulation: Hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg.* 2009;108(5):1433-46.
37. Fourrier F. Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: Dead end or one way? *Crit Care Med.* 2012;40(9):2704-2708.
38. Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med.* 2006;259(4):351-363.

39. Perez MJ, Britz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009;15(14):1677-1689.
40. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
41. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
42. Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* 2002;84(2-3):131-141.
43. Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401-426.
44. Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol Res.* 2012 Aug;42(8):741-749.
45. Hammad M, Raftari M, Cesário R, Salma R, Godoy P, Emami SN, et al. Roles of Oxidative Stress and Nrf2 Signaling in Pathogenic and Non-Pathogenic Cells: A Possible General Mechanism of Resistance to Therapy. *Antioxidants (Basel).* 2023;12(7):1371.
46. Hiemstra S, Fehling-Kaschek M, Kuijper IA, Bischoff LJM, Wijaya LS, Rosenblatt M, et al. Dynamic modeling of Nrf2 pathway activation in liver cells after toxicant exposure. *Sci Rep.* 2022;12(1):7336.
47. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:89-116.
48. Deng Y, Lu L, Zhang H, Fu Y, Liu T, Chen Y. The role and regulation of Maf proteins in cancer. *Biomark Res.* 2023;11(1):17.
49. Pouremamali F, Pouremamali A, Dadashpour M, Soozangar N, Jeddi F. An update of Nrf2 activators and inhibitors in cancer prevention/promotion. *Cell Commun Signal.* 2022;20(1):100.
50. Panieri E, Pinho SA, Afonso GJM, Oliveira PJ, Cunha-Oliveira T, Saso L. NRF2 and Mitochondrial Function in Cancer and Cancer Stem Cells. *Cells.* 2022;11(15):2401.
51. Kageyama S, Saito T, Obata M, Koide RH, Ichimura Y, Komatsu M. Negative Regulation of the Keap1-Nrf2 Pathway by a p62/Sqstm1 Splicing Variant. *Mol Cell Biol.* 2018;38(7):e00642-17.

52. Fujita KI, Maeda D, Xiao Q, Srinivasula SM. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(4):1427-1432.
53. Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*. 2020;25(22):5474.
54. Jenkins T, Gouge J. Nrf2 in cancer, detoxifying enzymes and cell death programs. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(7):1030.
55. Yadav E, Yadav N, Hus A, Yadav JS. Aquaporins in lung health and disease: Emerging roles, regulation, and clinical implications. *Respir Med*. 2020;174:106193.
56. Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med*. 2012;63:303-316.
57. Bhattacharya SS, Yadav B, Yadav E, Hus A, Yadav N, Kaur P, et al. Differential modulation of lung aquaporins among other pathophysiological markers in acute (Cl₂ gas) and chronic (carbon nanoparticles, cigarette smoke) respiratory toxicity mouse models. *Front Physiol*. 2022;13:880815.
58. Verkman AS. Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;159(3):324-330.
59. Ruddy MK, Drazen JM, Pitkanen OM, Rafii B, O'brodovich HM, Harris HW. Modulation of aquaporin 4 and the amiloride-inhibitable sodium channel in perinatal rat lung epithelial cells. *Am J Physiol*. 1998;274(6):L1066-72.
60. Lotsios NS, Keskinidou C, Dimopoulou I, Kotanidou A, Orfanos SE, Vassiliou AG. Aquaporin Expression and Regulation in Clinical and Experimental Sepsis. *Int J Mol Sci*. 2023;25(1):487.
61. Verkman AS. Aquaporins. *Curr Biol*. 2013;23(2):R52-55.
62. Yepes-Molina L, Bárzana G, Carvajal M. Controversial regulation of gene expression and protein transduction of aquaporins under drought and salinity stress. *Plants*. 2020;9(12):1-18.
63. Ohinata A, Nagai K, Nomura J, Hashimoto K, Hisatsune A, Miyata T, et al. Lipopolysaccharide changes the subcellular distribution of aquaporin 5 and increases plasma membrane water permeability in mouse lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;326(3):521-526.
64. Sakamoto Y, Hisatsune A, Katsuki H, Horie I, Isohama Y. Aquaporin 5 increases keratinocyte-derived chemokine expression and NF- κ B activity through ERK activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448(4):355-360.

65. Rabolli V, Wallemme L, Lo Re S, Uwambayinema F, Palmari-Pallag M, Thomassen L, et al. Critical role of aquaporins in interleukin 1 β (IL-1 β)-induced inflammation. *J Biol Chem*. 2014;289(20):13937-13947.
66. Chen SN, Tan Y, Xiao XC, Li Q, Wu Q, Peng YY, et al. Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis. *Acta Pharm Sin*. 2021;42:1610-1619.
67. Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:55-66.
68. Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol*. 2002;8(6):961-965.
69. Molema G, Zijlstra JG, van Meurs M, Kamps J. Renal microvascular endothelial cell responses in sepsis-induced acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2022;18:95-112.
70. Liu Z, Tang C, He L, Yang D, Cai J, Zhu J, et al. The negative feedback loop of NF-kappaB/miR-376b/NFKBIZ in septic acute kidney injury. *JCI Insight*. 2020;5:e142272.
71. Jang J, Song J, Lee H, Sim I, Kwon YV, Jho EH, et al. LGK974 suppresses lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice by modulating the crosstalk between the Wnt/beta-catenin and NF-kappaB pathways. *Exp Mol Med*. 2021;53:407-421.
72. Dusabimana T, Je J, Yun SP, Kim HJ, Kim H, Park SW. GOLPH3 promotes endotoxemia-induced liver and kidney injury through Golgi stress-mediated apoptosis and inflammatory response. *Cell Death Dis*. 2023;14(7):458.
73. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intensive Care Med*. 1994;20(3):225-232.
74. Hasan Z, Palani K, Rahman M, Thorlacius H. Targeting CD44 expressed on neutrophils inhibits lung damage in abdominal sepsis. *Shock*. 2011;35(6):567-572.
75. Wang T, Lin S, Liu R, Li H, Liu Z, Xu H, et al. Acute lung injury therapeutic mechanism exploration for Chinese classic prescription Qingzao Jiufei Decoction by UFLC-MS/MS quantification of bile acids, fatty acids and eicosanoids in rats. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;189:113463.
76. Bezerra FS, Lanzetti M, Nesi RT, Nagato AC, Silva CP e., Kennedy-Feitosa E, et al. Oxidative Stress and Inflammation in Acute and Chronic Lung Injuries. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(3):548.

77. Sun B, Lei M, Zhang J, Kang H, Liu H, Zhou F. Acute lung injury caused by sepsis: how does it happen? *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1289194.
78. Guillott L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M, et al. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: Evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem*. 2004;279(4):2712-2718.
79. Schnyder-Candrian S, Quesniaux VFJ, Di Padova F, Maillet I, Noulin N, Couillin I, et al. Dual Effects of p38 MAPK on TNF-Dependent Bronchoconstriction and TNF-Independent Neutrophil Recruitment in Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Immunol*. 2005;175(1):262-269.
80. Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Couillin I, Maillet I, Bihl F, et al. TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation. *J Leukoc Biol*. 2006;80(3):451-457.
81. Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Ernst RK, Miller SI, Wilson CB. Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287:143-152.
82. Noulin N, Quesniaux VFJ, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Maillet I, Robert T, et al. Both Hemopoietic and Resident Cells Are Required for MyD88-Dependent Pulmonary Inflammatory Response to Inhaled Endotoxin. *J Immunol*. 2005;175(10):6861-6869.
83. Jiao G, Li E, Yu R. Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2002;115(7):963-967.
84. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*. 2006;86(1):9-22.
85. Baumgarten G, Knuefermann P, Wrigge H, Putensen C, Stapel H, Fink K, Meyer R, et al. Role of Toll-like receptor 4 for the pathogenesis of acute lung injury in Gram-negative sepsis. *Eur J Anaesthesiol*. 2006;23(12):1041-1048.
86. Andonegui G, Bonder CS, Green F, Mullaly SC, Zbytnuik L, Raharjo E, et al. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest*. 2003;111(7):1011-1020.
87. Hu R, Xu H, Jiang H, Zhang Y, Sun Y. The role of TLR4 in the pathogenesis of indirect acute lung injury. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013;18(4):1244-1255.

88. Wu X, Kong Q, Zhan L, Qiu Z, Huang Q, Song X. TIPE2 ameliorates lipopolysaccharide-induced apoptosis and inflammation in acute lung injury. *Inflamm Res.* 2019;68(11):981-992.
89. Abd Uljaleel AQ, Hassan ES. Protective Effect of Ertugliflozin against Acute Lung Injury Caused by Endotoxemia Model in Mice. *IJWPH.* 2023;15(1):67-75.
90. Johnson KJ, Fantone Iii JC, Kaplan J, Ward PA. In Vivo Damage of Rat Lungs by Oxygen Metabolites. *J Clin Invest.* 1981;67(4):983-993.
91. Z'Graggen BR, Tornic J, Müller-Edenborn B, Reyes L, Booy C, Beck-Schimmer B. Acute lung injury: Apoptosis in effector and target cells of the upper and lower airway compartment. *Clin Exp Immunol.* 2010;161(2):324-331.
92. Kawasaki M, Kuwano K, Hagimoto N, Matsuba T, Kunitake R, Tanaka T, et al. Protection from Lethal Apoptosis in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice by a Caspase Inhibitor. *Am J Pathol.* 2000;157(2):597-603.
93. Niu F, Xu X, Zhang R, Sun L, Gan N, Wang A. Ursodeoxycholic acid stimulates alveolar fluid clearance in LPS-induced pulmonary edema via ALX/cAMP/PI3K pathway. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):20057-20065.
94. Shen Y, Wang X, Wang Y, Wang X, Chen Z, Jin M, et al. Lipopolysaccharide decreases aquaporin 5, but not aquaporin 3 or aquaporin 4, expression in human primary bronchial epithelial cells. *Respirology.* 2012;17(7):1144-1149.
95. Guo R, Li Y, Han M, Liu J, Sun Y. Emodin attenuates acute lung injury in Cecal-ligation and puncture rats. *Int Immunopharmacol.* 2020;85:106626.
96. Li D, Sun T, Chi L, Zhao D, Li W. Acupoint Catgut Embedding Improves the Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats. *Biomed Res Int.* 2020;2020:2394734.
97. Rump K, Adamzik M. Function of aquaporins in sepsis: A systematic review. *Cell Biosci.* 2018;8:10.
98. Carter EP, Umenishi F, Matthay MA, Verkman AS. Developmental changes in water permeability across the alveolar barrier in perinatal rabbit lung. *J Clin Invest.* 1997;100(5):1071-1078.
99. Song Y, Yang B, Matthay MA, Verkman AS, Ma T. Role of aquaporin water channels in pleural fluid dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(6):C1744-1750.

100. Shen Y, Chen Z, Wang Y, Song Z, Zhang Z, Jin M, et al. Aquaporin 5 expression inhibited by LPS via p38/JNK signaling pathways in SPC-A1 cells. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;171(3):212-217.
101. Mezzasoma L, Cagini L, Antognelli C, Puma F, Pacifico E, Talesa VN. TNF- α regulates natriuretic peptides and aquaporins in human bronchial epithelial cells BEAS-2B. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:159349.
102. Guzior D V, Quinn RA. Review: microbial transformations of human bile acids. *Microbiome.* 2021;9(1):140.
103. Di Gregorio MC, Cautela J, Galantini L. Physiology and physical chemistry of bile acids. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):1780.
104. Monte MJ, Marin JJG, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 2009;15(7):804-816.
105. Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Danić M, Stanimirov B, Al-Salami H, Stankov K, et al. Bile acids and their derivatives as potential modifiers of drug release and pharmacokinetic profiles. *Front Pharmacol.* 2018;9:1283.
106. Fleishman JS, Kumar S. Bile acid metabolism and signaling in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):97.
107. Li T, Chiang JY. Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug Metab Rev.* 2013;45(1):145-155.
108. Cai J, Rimal B, Jiang C, Chiang JYL, Patterson AD. Bile acid metabolism and signaling, the microbiota, and metabolic disease. *Pharmacol Ther.* 2022;237:108238.
109. Šarenac TM, Mikov M. Bile acid synthesis: From nature to the chemical modification and synthesis and their applications as drugs and nutrients. *Front Pharmacol.* 2018;9:939.
110. Pandak WM, Kakiyama G. The acidic pathway of bile acid synthesis: Not just an alternative pathway. *Liver Res.* 2019;3(2):88-98.
111. Hofmann AF, Hagey LR. Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(16):2461-2483.
112. Chiang JY. Bile acids: Regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 2009;50(10):1955-1966.
113. Hanafi NI, Mohamed AS, Kadir SHSA, Othman MHD. Overview of bile acids signaling and perspective on the signal of ursodeoxycholic acid, the most hydrophilic bile acid, in the heart. *Biomolecules.* 2018;8(4):159.

114. Stellaard F, Lütjohann D. Dynamics of the enterohepatic circulation of bile acids in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2021;321(1):G55-G66.
115. Staels B, Fonseca VA. Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care.* 2009;32(Suppl 2):S237-245.
116. Wan YY, Sheng L. Regulation of bile acid receptor activity. *Liver Res.* 2018;2(4):180-185.
117. Mueller M, Thorell A, Claudel T, Jha P, Koefeler H, Lackner C, et al. Ursodeoxycholic acid exerts farnesoid X receptor-antagonistic effects on bile acid and lipid metabolism in morbid obesity. *J Hepatol.* 2015;62(6):1398-1404.
118. Yu H, Nie R, Shen C. The role of bile acids in regulating glucose and lipid metabolism. *Endocr J.* 2023;70(4):359-374.
119. Guo C, Chen WD, Wang YD. TGR5, not only a metabolic regulator. *Front Physiol.* 2016;7:646.
120. Pols TWH, Noriega LG, Nomura M, Auwerx J, Schoonjans K. The bile acid membrane receptor TGR5: A valuable metabolic target. *Dig Dis.* 2011;29(1):37-44.
121. Gupta S, Stravitz RT, Dent P, Hylemon PB. Down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(19):15816-15822.
122. Li Z, Dai A, Yang M, Chen S, Deng Z, Li L. p38MAPK Signaling Pathway in Osteoarthritis: Pathological and Therapeutic Aspects. *J Inflamm Res.* 2022;15:723-734.
123. Masyuk AI, Huang BQ, Radtke BN, Gajdos GB, Splinter PL, Masyuk T V., et al. Ciliary subcellular localization of TGR5 determines the cholangiocyte functional response to bile acid signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;304(11).
124. Dent P, Fang Y, Gupta S, Studer E, Mitchell G, Spiegel S, et al. Conjugated bile acids promote ERK1/2 and AKT activation via a pertussis toxin-sensitive mechanism in murine and human hepatocytes. *Hepatology.* 2005;42(6):1291-1299.
125. Qiao L, Han SI, Fang Y, Park JS, Gupta S, Gilfor D, et al. Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol.* 2003;23(9):3052-3066.

126. Modica S, Bellafante E, Moschetta A. Master regulation of bile acid and xenobiotic metabolism via the FXR, PXR and CAR trio. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14(12):4719-4745.
127. Gou X, Qin L, Wu D, Xie J, Lu Y, Zhang Q, et al. Research Progress of Takeda G Protein-Coupled Receptor 5 in Metabolic Syndrome. *Molecules*. 2023;28(15):5870.
128. Holter MM, Chirikjian MK, Govani VN, Cummings BP. Tgr5 signaling in hepatic metabolic health. *Nutrients*. 2020;12(9):2598.
129. Grüner N, Mattner J. Bile acids and microbiota: Multifaceted and versatile regulators of the liver-gut axis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1397.
130. Nežić L, Škrbić R, Amidžić L, Gajanin R, Kuča K, Jaćević V. Simvastatin Protects Cardiomyocytes Against Endotoxin-induced Apoptosis and Up-regulates Survivin/NF- κ B/p65 Expression. *Sci Rep*. 2018;8(1):14652.
131. Beutler E. *Manual of biochemical Methods*. New York: Grune and Stratton; 1982. 105-106 p.
132. Ohkawa H ONYK. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-358.
133. Pick E KY. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cell in culture. *J Immunol Methods*. 1980;38(1–2):161-170.
134. Green LC. Analysis of nitrate, nitrite, and 15N nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131-138.
135. Madesh M BK. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian J Biochem Biophys*. 1998;35:184-188.
136. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-126.
137. Eftekhari N, Moghimi A, Boskabady MH. The Effects of *Ocimum basilicum* Extract and Its Constituent, Rosmarinic Acid on Total and Differential Blood WBC, Serum Levels of NO, MDA, Thiol, SOD, and CAT in Ovalbumin Sensitized Rats. *Iran J Pharm Res*. 2018;17(4):1371-1385.
138. Nežić L, Škrbić R, Amidžić L, Gajanin R, Milovanović Z, Nepovimova E, et al. Protective effects of simvastatin on endotoxin-induced acute kidney injury through activation of tubular epithelial cells' survival and hindering cytochrome c-mediated apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19):1–18.

139. Ainosah RH, Hagraas MM, Alharthi SE, Saadah OI. The effects of ursodeoxycholic acid on sepsis-induced cholestasis management in an animal model. *J Taibah Univ Med Sci.* 2020;15(4):312-320.
140. Meng F, Kennedy L, Hargrove L, Demieville J, Jones H, Madeka T, et al. Ursodeoxycholate inhibits mast cell activation and reverses biliary injury and fibrosis in *Mdr2*^{-/-} mice and human primary sclerosing cholangitis. *Lab Invest.* 2018;98(11):1465-1477.
141. Ko WK, Lee SH, Kim SJ, Jo MJ, Kumar H, Han IB, et al. Anti-inflammatory effects of ursodeoxycholic acid by lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages. *PLoS One.* 2017;12(6):e0180673.
142. Li X, Hu Y, He B, Li L, Tian Y, Xiao Y, Shang H, Zou Z. Design, synthesis and evaluation of ursodeoxycholic acid-cinnamic acid hybrids as potential anti-inflammatory agents by inhibiting Akt/NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Eur J Med Chem.* 2023;260:115785.
143. Dai J, Wang H, Dong Y, Zhang Y, Wang J. Bile acids affect the growth of human cholangiocarcinoma via NF- κ B pathway. *Cancer Invest.* 2013;31(2):111-120.
144. Gong Z, Zhou J, Zhao S, Tian C, Wang P, Xu C, et al. Chenodeoxycholic acid activates NLRP3 inflammasome and contributes to cholestatic liver fibrosis. *Oncotarget.* 2016;7(51):83951-83963.
145. Keely SJ, Steer CJ, Lajczak-Mcginley NK. Ursodeoxycholic acid: a promising therapeutic target for inflammatory bowel diseases? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2019;317:872-881.
146. Dwyer AM, Lajczak NK, Keyes JA, Ward JB, Greene CM, Keely SJ. Ursodeoxycholic acid inhibits TNF-induced IL-8 release from monocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;311:334-341.
147. Subramanian S, Iles T, Ikramuddin S, Steer CJ. Merit of an ursodeoxycholic acid clinical trial in COVID-19 patients. *Vaccines (Basel).* 2020;8(2):1-4.
148. Joo SS, Kang HC, Won TJ, Lee DI. Ursodeoxycholic acid inhibits pro-inflammatory repertoires, IL-1 beta and nitric oxide in rat microglia. *Arch Pharm Res.* 2003;26(12):1067-1073.
149. Zhu C, Fuchs CD, Halilbasic E, Trauner M. Bile acids in regulation of inflammation and immunity: friend or foe? *Clin Exp Rheumatol.* 2016;34(4 Suppl 98):25-31.

150. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem.* 2003;278(11):9435-9440.
151. Shaik FB, Prasad DV, Narala VR. Role of farnesoid X receptor in inflammation and resolution. *Inflamm Res.* 2015;64(1):9-20.
152. Godlewska U, Bulanda E, Wypych TP. Bile acids in immunity: Bidirectional mediators between the host and the microbiota. *Front Immunol.* 2022;13:949033.
153. Xiang J, Zhang Z, Xie H, Zhang C, Bai Y, Cao H, et al. Effect of different bile acids on the intestine through enterohepatic circulation based on FXR. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1949095.
154. Panzitt K, Jungwirth E, Krones E, Lee JM, Pollheimer M, Thallinger GG, et al. FXR-dependent Rubicon induction impairs autophagy in models of human cholestasis. *J Hepatol.* 2020;72(6):1122-1131.
155. Nguyen AT, Mandard S, Dray C, Deckert V, Valet P, Besnard P, et al. Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: Involvement of the GLP-1 pathway. *Diabetes.* 2014;63(2):471-482.
156. Bai XP, Du WJ, Xing HB, Yang GH, Bai R. Influence of ursodeoxycholic acid on blood glucose, insulin and GLP-1 in rats with liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Diabetol Metab Syndr.* 2023;15(1):18.
157. Lakić B, Škrbić R, Uletilović S, Mandić-Kovačević N, Grabež M, Šarić MP, et al. Beneficial Effects of Ursodeoxycholic Acid on Metabolic Parameters and Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study. *J Diabetes Res.* 2024;2024:4187796.
158. Kumar AA, Bhaskar E, Shantha GPS, Swaminathan P, Abraham G. Rhabdomyolysis in community acquired bacterial sepsis - A retrospective cohort study. *PLoS One.* 2009;4(9):e7182.
159. Orozco-Aguilar J, Tacchi F, Aguirre F, Valero-Breton M, Castro-Sepulveda M, Simon F, et al. Ursodeoxycholic acid induces sarcopenia associated with decreased protein synthesis and autophagic flux. *Biol Res.* 2023;56(1):28.
160. Wu L, Chen Q, Dong B, Geng H, Wang Y, Han D, et al. Resveratrol alleviates lipopolysaccharide-induced liver injury by inducing SIRT1/P62-mediated mitophagy in gibel carp (*Carassius gibelio*). *Front Immunol.* 2023;14:1177140.

161. Festi D, Montagnani M, Azzaroli F, Lodato F, Mazzella G, Roda A, Di Biase AR, Roda E, Simoni P, Colecchia A. Clinical efficacy and effectiveness of ursodeoxycholic acid in cholestatic liver diseases. *Curr Clin Pharmacol*. 2007;2(2):155-77.
162. Futterman ID, Jain H, McLaren RA Jr, Mays JK. Cord blood troponin I levels: biomarker evidence of fetal cardiac injury in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *AJOG Glob Rep*. 2024;4(3):100356.
163. Tiruvoipati R, Sultana N, Lewis D. Cardiac troponin I does not independently predict mortality in critically ill patients with severe sepsis. *Emerg Med Australas*. 2012;24(2):151-158.
164. Smith A, John M, Trout R, Davis E, Moningi S. Elevated cardiac troponins in sepsis: what do they signify? *W V Med J*. 2009;105(4):29-32.
165. Matsunaga N, Yoshioka Y, Fukuta Y. Extremely high troponin levels induced by septic shock: a case report. *J Med Case Rep*. 2021;15(1):466.
166. Ji J, Feng M, Niu X, Zhang X, Wang Y. Liraglutide blocks the proliferation, migration and phenotypic switching of Homocysteine (Hcy)-induced vascular smooth muscle cells (VSMCs) by suppressing proprotein convertase subtilisin kexin9 (PCSK9)/ low-density lipoprotein receptor (LDLR). *Bioengineered*. 2021;12(1):8057-8066.
167. Nadinskaia M, Maevskaya M, Ivashkin V, Kodzoeva K, Pirogova I, Chesnokov E, et al. Ursodeoxycholic acid as a means of preventing atherosclerosis, steatosis and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2021;27(10):959-975.
168. Mateu Campos L, Galarza Barrachina L, Arlandis Tomas M, Sanchez Morán F, Belenguer Muncharaz A, Ferrándiz Sellés D, et al. Homocysteine levels in septic shock. *Vol. Intensive Care Med Exp*. 2015;3(Suppl 1):A305.
169. Simental-Mendía M, Sánchez-García A, Simental-Mendía LE. Effect of ursodeoxycholic acid on liver markers: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled clinical trials. *Br J Clin Pharmacol*. 2020;86(8):1476-1488.
170. Chen M, Zhao Y, Ji H, Li L, Liu H, Wang S, et al. Chenodeoxycholic Acid Improves Embryo Implantation and Metabolic Health through Modulating Gut Microbiota-Host Metabolites Interaction during Early Pregnancy. *Antioxidants (Basel)*. 2023;13(1):8.
171. Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial responses in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(3):361-370.

172. Liu Z feng, Zheng D, Fan G chang, Peng T, Su L. Heat stress prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells by blocking calpain/p38 MAPK signalling. *Apoptosis*. 2016;21(8):896-904.
173. Eom Y, Kwon J, Heo JH, Yun C, Kang SY, Kim HM, Song JS. The effects of proinflammatory cytokines on the apoptosis of corneal endothelial cells following argon laser iridotomy. *Exp Eye Res*. 2016;145:140-147.
174. Cai GL, Yang ZX, Guo DY, Hu CB, Yan ML, Yan J. Macrophages enhance lipopolysaccharide induced apoptosis via Ang1 and NF- κ B pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep*. 2021;11(1):2918.
175. Niu F, Li H, Xu X, Sun L, Gan N, Wang A. Ursodeoxycholic acid protects against lung injury induced by fat embolism syndrome. *J Cell Mol Med*. 2020;24(24):14626-14632.
176. Nakajima T, Okuda Y, Chisaki K, Shin WS, Iwasawa K, Morita T, et al. Bile acids increase intracellular Ca²⁺ concentration and nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2000;130(7):1457-1467.
177. Qin P, Tang X, Elloso MM, Harnish DC. Bile acids induce adhesion molecule expression in endothelial cells through activation of reactive oxygen species, NF-B, and p38. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:741-747.
178. Chung J, An SH, Kang SW, Kwon K. Ursodeoxycholic Acid (UDCA) exerts anti-Atherogenic effects by inhibiting RAGE signaling in diabetic atherosclerosis. *PLoS One*. 2016;11(1):1–18.
179. Sul OJ, Ra SW. Quercetin Prevents LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Modulating NOX2/ROS/NF- κ B in Lung Epithelial Cells. *Molecules*. 2021;26(22):6949.
180. Bao M, Liang M, Sun X, Mohyuddin SG, Chen S, Wen J, et al. Baicalin Alleviates LPS-Induced Oxidative Stress via NF- κ B and Nrf2-HO1 Signaling Pathways in IPEC-J2 Cells. *Front Vet Sci*. 2022;8:808233.
181. Wang X, Liang G, Zhou Y, Ni B, Zhou X. Ameliorative effect and mechanism of ursodeoxycholic acid on hydrogen peroxide-induced hepatocyte injury. *Sci Rep*. 2024;14(1):4446.
182. Mooranian A, Jones M, Walker D, Ionescu CM, Wagle SR, Kovacevic B et al., Pharmacological Dose-Effect Profiles of Various Concentrations of Humanised Primary Bile Acid in Encapsulated Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2022;12(4):647.

183. Padiadpu J, Spooner MH, Li Z, Newman N, Löhr CV, Apperson KD, et al. Early transcriptome changes associated with western diet induced NASH in *Ldlr*^{-/-} mice points to activation of hepatic macrophages and an acute phase response. *Front Nutr.* 2023;10:1147602.
184. McCarthy WC, Sherlock LG, Grayck MR, Zheng L, Lacayo OA, Solar M, et al. Innate Immune Zonation in the Liver: NF- κ B (p50) Activation and C-Reactive Protein Expression in Response to Endotoxemia Are Zone Specific. *J Immunol.* 2023;210(9):1372-1385.
185. Mroz MS, Harvey BJ. Ursodeoxycholic acid inhibits ENaC and Na/K pump activity to restore airway surface liquid height in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Steroids.* 2019;151:108461.
186. Niu F, Xu X, Zhang R, Sun L, Gan N, Wang A. Ursodeoxycholic acid stimulates alveolar fluid clearance in LPS-induced pulmonary edema via ALX/cAMP/PI3K pathway. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):20057-20065.
187. He YQ, Deng JL, Zhou CC, Jiang SG, Zhang F, Tao X, et al. Ursodeoxycholic acid alleviates sepsis-induced lung injury by blocking PANoptosis via STING pathway. *Int Immunopharmacol.* 2023;125(Pt B):111161.
188. Al Sulaiman K, Kharbosh A, Bin Salah K, Alsulaiman T, Al Andas N, Aljuhani O, et al. Impact of Ursodeoxycholic Acid in Critically Ill Patients With Sepsis: A Retrospective Study. *J Pharm Pract.* 2023;36(3):566-571.
189. Shaik FB, Panati K, Narasimha VR, Narala VR. Chenodeoxycholic acid attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in murine model of asthma by inhibiting the TH2 cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;463(4):600-605.
190. Aldhahrani A, Verdon B, Ward C, Pearson J. Effects of bile acids on human airway epithelial cells: implications for aerodigestive diseases. *ERJ Open Res.* 2017;3(1):00107-2016.
191. Fois AG, Paliogiannis P, Sotgia S, Mangoni AA, Zinellu E, Pirina P, et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and therapeutic applications: A systematic review. *Respir Res.* 2018;19(1):51.
192. Jarikre TA, Ohore GO, Oyagbemi AA, Emikpe BO. Evaluation of oxidative stress in caprine bronchoalveolar lavage fluid of pneumonic and normal lungs. *Int J Vet Sci Med.* 2017;5(2):143-147.

193. Zhou W, Shao W, Zhang Y, Liu D, Liu M, Jin T. Glucagon-like peptide-1 receptor mediates the beneficial effect of liraglutide in an acute lung injury mouse model involving the thioredoxin-interacting protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2020;319:E568-E578.
194. Jang JY, Im E, Choi YH, Kim ND. Mechanism of Bile Acid-Induced Programmed Cell Death and Drug Discovery against Cancer: A Review. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7184.
195. Qiao L, Yacoub A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, et al. Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology.* 2002;35(4):779-789.
196. Huang F. Ursodeoxycholic acid as a potential alternative therapeutic approach for neurodegenerative disorders: Effects on cell apoptosis, oxidative stress and inflammation in the brain. *Brain Behav Immun Health.* 2021;18:100348.
197. Stanimirov B. Uticaj žučnih kiselina na prodor u ćelije i tkiva i farmakodinamiku doksorubicina. Doktorska disertacija. Novi Sad. 2017.
198. Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology.* 2001;33(3):616-626.
199. Shen D, Zeng Y, Zhang W, Li Y, Zhu J, Liu Z, et al. Chenodeoxycholic acid inhibits lung adenocarcinoma progression via the integrin $\alpha 5\beta 1$ /FAK/p53 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2022;923:174925.
200. Hirano F, Haneda M, Makino I. Chenodeoxycholic acid and taurochenodexycolic acid induce anti-apoptotic cIAP-1 expression in human hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(12):1807-1813.
201. Xu L, Li Y, Wei Z, Bai R, Gao G, Sun W, et al. Chenodeoxycholic Acid (CDCA) Promoted Intestinal Epithelial Cell Proliferation by Regulating Cell Cycle Progression and Mitochondrial Biogenesis in IPEC-J2 Cells. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(11):2285.
202. Vassiliou AG, Manitsopoulos N, Kardara M, Maniatis NA, Orfanos SE, Kotanidou A. Differential expression of aquaporins in experimental models of acute lung injury. *In Vivo.* 2017;31(5):885-894.
203. Xu J, Yang L, Dong L. Tanshinol upregulates the expression of aquaporin 5 in lung tissue of rats with sepsis. *Oncol Lett.* 2018;16(3):3290-3296.

204. Wang J, Kong H, Xu J, Wang Y, Wang H, Xie W. Fasudil alleviates LPS-induced lung injury by restoring aquaporin 5 expression and inhibiting inflammation in lungs. *J Biomed Res.* 2019;33(3):156-163.
205. Ba F, Zhou X, Zhang Y, Wu C, Xu S, Wu L, et al. Lipoxin A4 ameliorates alveolar fluid clearance disturbance in lipopolysaccharide-induced lung injury via aquaporin 5 and MAPK signaling pathway. *J Thorac Dis.* 2019;11(8):3599-3608.
206. Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, Menon AG. Tumor Necrosis Factor- α Inhibits Aquaporin 5 Expression in Mouse Lung Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(22):18657-18664.
207. Li B, Liu C, Tang K, Dong X, Xue L, Su G, et al. Aquaporin-1 attenuates macrophage-mediated inflammatory responses by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase activation in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *Inflamm Res.* 2019;68(12):1035-1047.
208. Liao M, Yu W, Xie Q, Zhang L, Pan Q, Zhao N, et al. Hepatic Aquaporin 10 Expression Is Downregulated by Activated NF κ B Signaling in Human Obstructive Cholestasis. *Gastro Hep Advances.* 2023;2(3):412-423.
209. Ginley N, O Dwyer A, Keely S, Fenton R. Role of Bile Acids for Regulation of Aquaporins in Rodent Large intestine. *FASEB J.* 2015;29(S1).
210. Yde J, Keely S, Wu Q, Borg JF, Lajczak N, O'Dwyer A, et al. Characterization of AQPs in Mouse, Rat, and Human Colon and Their Selective Regulation by Bile Acids. *Front Nutr.* 2016;3:46.
211. Milivojac T, Grabež M, Krivokuća A, Maličević U, Gajić Bojić M, Đukanović Đ, et al. Ursodeoxycholic and chenodeoxycholic bile acids attenuate systemic and liver inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. *Mol Cell Biochem.* 2024. doi: 10.1007/s11010-024-04994-2.

LISTA SKRAĆENICA

<i>Skraćenica</i>	<i>Engleski</i>	<i>Srpski</i>
AC	Adenylyl cyclase	Adenil ciklaza
AKT (PI3/Akt)	Protein kinase B (Phosphoinositide-3-kinase/Protein kinase B) pathway	Put protein kinaze B (fosfoinozimid-3-kinaza/protein kinaza B put)
ALX	Lipoxin receptor	Lipoksin receptor
Ang-1	Angiopoietin-1	Angiopoetin-1
AP-1	Activator protein-1	Aktivator proteina-1
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1	Faktor aktivacije apoptotičke proteaze 1
AQPs	Aquaporins	Akvaporini
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter	Apikalni natrijum-zavisni transporter žučnih kiselina
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain	Tačkasti apoptotski protein koji sadrži domen za vezivanje kaspaze
ATP	Adenosine triphosphate	Adenozin trifosfat
BAAT	Bile acid amino transferase	Enzim za prenos amino kiselina žučnih kiselina
BACS	Bile acid CoA synthetase	CoA sintetaza žučnih kiselina
BAK	BCL-2 antagonist/killer	BCL-2 antagonist

BAX	BCL-2-associated X protein	BCL-2-vezani X protein
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2	B-ćelijski limfom-2
BCL-W	BCL2 like 2	BCL-2 kao 2
BCL-XL	BCL2 X-linked protein	BCL-2 X-vezani protein
BFL-1	BCL2 related protein A1	BCL2 povezan protein A1
Bid	Bax-Like BH3 Protein	BH3 protein poput Bax-a
BSEP	Bile salt export pump	Pumpa za izvoz žučne soli
CA	Cholic acid	Holna kiselina
cAMP	Cyclic adenosine triphosphate	Ciklićni adenzin trifosfat
CAR	Constitutive androstan receptor	Konstitutivni androstan receptor
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome	Sindrom kompenzatornog antiinflamatornog odgovora
CAT	Catalase	Katalaza
CD14	Protein cluster of differentiation 14	Protein klaster diferencijacije 14
CDCA	Chenodeoxycholic acid	Henodeoksiholna kiselina
CoA	Coenzyme A	Koenzim A
CYP27A1		Sterol 27-hidroksilaza
CYP7A1		Holesterol 7 α -hidroksilaza
CYP7B		Oxisterol 7 α - hidroksilaza

CYP8B1			Sterol 12 α -hidroksilaza
DAMPs	Danger-Associated Patterns	Molecular	Stimulusi izvedeni iz oštećenih ćelija
DCA	Deoxycholic acid		Deoksiholna kiselina
DED	Death effector domain		Domen efektor smrti
DHCA	Dihydroxycholestanic acid		Dihidroksholestanoična kiselina
DISC	Death-inducing signaling complex		Smrtonosni indukujući signalni kompleks
DM	Diabetes mellitus		Šećerna bolest
EDCF	Endothelial-Derived Constricting Factors		Endotelni faktori kontrakcije
EDRF	Endothelial-Derived Relaxing Factors		Endotelni faktori relaksacije
EGFR	Epidermal growth factor receptor		Receptor epidermalnog faktora rasta
Epac	Exchange Protein Directly Activated by cAMP		Put proteina za razmjenu direktno aktiviran cAMP-om
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase pathway		Put kinaze regulisane vanćelijskim signalom
FADD	Fas associated death domain		Domen smrti vezan za Fas
FasL	Fas ligand		Fas ligand
FES	Fat embolism syndrome		Sindromom masne embolije

FXR	Farnesoid X receptor	Farnezoid X receptor
GCDC4	Glycochenodeoxycholic acid	Glikohenodeoksiholna kiselina
GLP-1	Glucagon-like peptide-1	Glukagonu sličan peptid-1
GPBAR1	G protein-coupled bile acid receptor 1	G-protein-spregnuti receptor žučnih kiselina 1
GPx	Glutathione peroxidase	Glutation peroksidaza
GR	Glucocorticoid receptor	Glukokortikoidni receptor
Grx	Glutathione	Glutation
GSH	Reduced glutathione	Redukovani glutation
HCA	Hyochoic acid	Hioholna kiselina
HO-1	Heme oxygenase-1	Hem-oksigenaza-1
IAP	Inhibitors of apoptosis protein	Inhibitori proteina apoptoze
IBABP	Intestinal bile acid binding protein	Intestinalni vezujući protein za žučne kiseline
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1	Intracelularni adhezioni molekul -1
IL-6	Interleukin-6	Interleukin-6
IκBα	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha	Inhibitor NF-κB
JNK	C-jun N-terminal kinases pathway	Put c-jun N-terminalnih kinaza

LBP	Lipopolysaccharide binding protein	Vezujući protein lipopolisaharida
LCA	Lytocholic acid	Litoholna kiselina
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolisaharid
MAF	Musculoaponeurotic fibrosarcoma	Proteini muskuloaponeurotičnog fibrosarkoma
MAPK	Mitogen activated protein kinase pathway	Put mitogenom aktivirane protein kinaze
MCL-1	Myeloid cell leukemia 1	Mijeloidna leukemija 1
MD-2	Myeloid differentiation factor 2	Faktor diferencijacije mijeloidnih ćelija 2
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome	Sindrom multiorganske disfunkcije
MT	Metallothionein	Metalotionin
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88	Gen primarnog odgovora diferencijacije mijeloidnih ćelija 88
NF-κB	Nuclear factor kappa B	Nuklearni faktor kapa B
NIK	NF-κB-inducing kinase	NF-κB-inducibilna kinaza
NLRP3	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3	Nukleotid-vezujući domen oligomerizacije nalik domenu receptora pirina
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2- related factor 2	Nuklearni eritroidni faktor 2

NTCP	Na ⁺ -taurocholate cotransporting polypeptid	Na ⁺ -zavisni kotransporter žučnih kiselina
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide	Organski anionski transportni polipeptid
OST α i OST β	Organic Solute Transporter α and β	Transporter organskih rastvora α i β
p38MAPK	p38 Mitogen activated protein kinases pathway	Put mitogenom aktivirane protein kinaze p38
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns	Stimulusi izvedeni iz različitih mikroba
PAR	Protease-activated receptors	Receptori aktivirani proteazom
PMP 70	70-kDa Peroxisomal mebrane protein	Peroksizomalni membranski protein 70-kDa
PRP	Pathern recognition receptors	Receptori za prepoznavanje
Prx	Peroxide reductase	Peroksid reduktaza
PXR	Pregnane X receptor	Pregnan X receptor
RNS	Reactive nitrogen species	Reaktivne vrste azota
Rock2	Rho-associated protein kinase-2	Rho-asocirane protein kinaze-2
ROS	Reactive oxygen spacies	Reaktivne vrste kiseonika
RXR	Retinoid X receptor	Retinoid X receptor
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome	Sindrom sistemskog inflamatornog odgovora

SOD	Superoxyde dismutase	Superoksid dismutaza
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Pretvarač signala i aktivator transkripcije 3
SULT2A1	Sulfotransferase 2A1	Sulfotransferaza 2A1
TAK1	TGF β -activated kinase 1	TGF- β -aktivirana kinaza 1
TCDC	Taurochenodeoxycholic acid	Taurohenodeoksiholna kiselina
TGR5	Takeda G protein-coupled receptor 5	Takeda G protein-spregnuti receptor 5
THCA	Trihydroxycholestanoic acid	Trihidrokisholestanoična kiselina
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein	Adapter protein koji sadrži TIR domen
TLR	Toll like receptors	
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	Faktor nekroze tumora- α
TRADD	TNF receptor I-associated death domain	Domen smrti povezan sa TNF receptorom I
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand	Ligand koji indukuje TNF-vezanu apoptozu
TRAM	TRIF-related adaptor molecule	TRIF-srodni adapter molekul
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β	Adapterski protein indukcije interferona β sa TIR domenom
Trx	Thioredoxin	Tioredoksin
TUDCA	Tauroursodeoxycholic acid	Tauroursodeoksiholna kiselina

UCP1	Uncoupling protein 1	Razdvojeni protein 1
UDCA	Ursodeoxycholic acid	Ursodeoksiholna kiselina
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1	Vaskularni adhezioni molekul-1
VDR	Vitamin D receptor	Receptor za vitamin D
VLDL	Very low density lipoproteine	Lipoproteini veoma niske gustine

BIOGRAFIJA

Tatjana Milivojac rođena je 28.05.1976. godine u Drvaru. Osnovnu školu završila je u Grahovu. Gimnaziju upisala 1991. godine u Bihaću, a 1995. godine završila u Banjaluci. Medicinski fakultet Univerziteta u Banjaluci upisala je 1995/1996. godine, a diplomirala u januaru 2003. godine sa prosječnom ocjenom 8,67. Od aprila 2003. godine. do juna 2022. godine bila zaposlena na Katedri za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjaluci. Od juna 2022. godine zaposlena u Centru za biomedicinska istraživanja na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjaluci i angažovana kao stručni saradnik na Katedri za patološku fiziologiju.

Postdiplomski studij „Biomedicinska istraživanja“ upisala je 2004/2005. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjaluci i tokom studija imala prosječnu ocjenu 10. Magistarski rad pod nazivom“ Uticaj manjka vitamina D na promjene nivoa kalcija i paratireoidnog hormona u postmenopauzalnoj osteoporozi“ odbranila je 10.12.2011. godine, te stekla zvanje magistar medicinskih nauka.

Specijalistički ispit iz pedijatrije položila 20.11.2013 godine. i stekla stručno zvanje specijalista pedijatrije.

Studijski program III ciklusa Biomedicinskih nauka na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjaluci upisala je školske 2020/2021. godine i tokom studija imala prosjek ocjena 9.23.

Autor je i koautor većeg broja naučnih i stručnih radova objavljenih međunarodnim i domaćim časopisima i učesnik međunarodnih i domaćih naučnih i stručnih skupova.

Član je udruženja doktora medicine Republike Srpske, udruženja pedijatara Republike Srpske i udruženja patofiziologa Bosne i Hercegovine.

Udata je i majka dvoje djece.

**Izjavljujem
da je doktorska disertacija**

Naslov rada "UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA, INFLAMATORNOG ODGOVORA I ENDOTELNE DISFUNKCIJE IZAZVANE ENDOTOKSINOM *E.coli* KOD PACOVA"

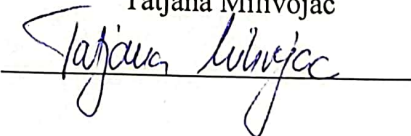
Naslov rada na engleskom jeziku " THE EFFECT OF BILE ACIDS ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS, INFLAMMATORY RESPONSE, AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION INDUCED BY *E. coli* ENDOTOXIN IN RATS"

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da doktorska disertacija, u cjelini ili dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/-la autorska prava i koristila svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, dana 17.06.2024. godine

Potpis doktoranta

Tatjana Milivojac



Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom "UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA, INFLAMATORNOG ODGOVORA I ENDOTELNE DISFUNKCIJE IZAZVANE ENDOTOKSINOM *E.coli* KOD PACOVA" koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

Doktorsku disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

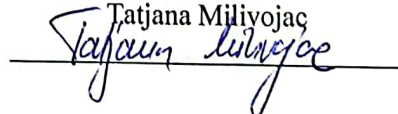
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

- Autorstvo
- Autorstvo - nekomercijalno
- Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
- Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima
- Autorstvo - bez prerade
- Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, dana 17.06.2024. godine

Potpis doktoranta

Tatjana Miliyojac



Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora Tatjana Milivojac

Naslov rada "UTICAJ ŽUČNIH KISELINA NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA,
INFLAMATORNOG ODGOVORA I ENDOTELNE DISFUNKCIJE
IZAZVANE ENDOTOKSINOM *E.coli* KOD PACOVA"

Mentor Prof. dr Ranko Škrbić

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predao/la za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, dana 17.06.2024. godine

Potpis doktoranta
Tatjana Milivojac
